

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Noppon Lertwattanasakul
審査委員	主査 山田 守 ⑩ 副査 滝本 晃一 ⑩ 副査 川向 誠 ⑩ 副査 松下一 信 ⑩ 副査 森 信寛 ⑩
題目	Molecular biological study on alcohol dehydrogenases in ethanologenic thermotolerant yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i> (エタノール生産性の耐熱性酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> のアルコール脱水素酵素の分子生物学的研究)
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>アルコール脱水素酵素 (Adh) は、微生物、酵母、昆虫、動物、植物を含むほとんど全ての生物に存在し、エタノールの合成や分解に関わっている。Adh は酵母において一次構造上高く保存されているが、その数や発現様式は異なっている。<i>Kluyveromyces marxianus</i> はエタノール生産において <i>Saccharomyces cerevisiae</i> に代わる酵母として注目されている。本酵母は、「比較的高い温度で生育できる」、「安い様々な炭素源を利用できる」、「増殖が速い」などの特徴をもっており、生物工学的利用分野は潜在的に広く、冷却費などコスト削減を可能にする高温エタノール発酵に利用できると期待される。しかしながら、本酵母のエタノール代謝に関する報告は少なく、応用のための基礎的情報が極めて不足している。</p> <p>本研究では、まず、耐熱性酵母 <i>K. marxianus</i> の4つの <i>ADH</i> 遺伝子をクローニングし、詳細な解析を行っている。4つの Adh (KmAdh) は、一次構造上高い相同性を持ち、その内、KmAdh3 と KmAdh4 はミトコンドリア移行配列をもっていることが分かった。また、他の生物の Adh との構造比較から、4つの KmAdh は亜鉛含有 Adh ファミリーに属すると推測している。これらの結果やサザンブロット解析の結果から、本酵母は少なくとも4つの Adh をもち、その内、2つが細胞質、残りがミトコンドリアに局在することを示唆した。また、発現解析の結果、KmAdh1 と KmAdh2 は、グルコース存在下において、エタノール生産に関与しているようである。KmAdh3 と KmAdh4 の生理学的機能は定かでないが、<i>KmADH3</i> はグリセロールなどの非発酵性炭素源の存在下において発現し、<i>KmADH4</i> はエタノール濃度が高く、グルコース濃度が低い場合に発現することを確認している。また、両遺伝子はグルコース存在下でほとんど発現しない。<i>S. cerevisiae</i> や <i>K. lactis</i> の2つのミトコンドリア Adh も炭素源に応じた特異的な発現調節を受けている。加えて、<i>KIADH3</i> の発現は、コハク酸脱水素酵素遺伝子の発現と関連しているようである。従って、これらの Adh はミトコンドリア代謝において異なった貢献をしていると考えられる。しかし、それらの機能についての研究はこれまでほとんど報告されていなかった。</p> <p>そこでさらに、KmAdh3 の生理学的機能を明らかにするために、遺伝子破壊株を構築し</p>	

その変異の影響を解析している。本破壊株は、コハク酸やグリセロールなどの非発酵性炭素源の存在下において生育不良、NADH 脱水素酵素やコハク酸脱水素酵素の活性上昇、過酸化水素に対する感受性の亢進、活性酸素種発生の増加などいくつかの表現型を示した。その活性酸素種発生や生育への異常はアスコルビン酸の添加によって回避されることを示した。これらの結果などから、*KmADH3* 破壊によって呼吸鎖の NADH などの基質が増加し、それによって呼吸鎖初発酵素の発現が誘導され、さらにそれが活性酸素種発生の増大につながり、結果的に増殖抑制が引き起こされると推測している。この推測によると、*KmAdh3* はミトコンドリア内の NADH/NAD<sup>+</sup> のバランス調節に重要な役割を担っていると考えられる。一方、*KmADH4* は、非発酵性炭素源の存在下ではほとんど発現せず、例外的にエタノールがミトコンドリア内に蓄積した場合にエタノール分解に働く。これによって、エタノール発酵時にミトコンドリア内で不足する NADH を生産して、NADH/NAD<sup>+</sup> のバランスをとっていると予測している。

得られた結果に基づいて、ミトコンドリア膜を介したエタノール-アセトアルデヒドシャトルを提唱している。同様なシャトルはこれまででも予測されているが、*KmADH1-4* の発現解析や *KmAdh3* の機能解析から、それぞれの Adh の生理的役割に基づいた新たなモデルとなっている。そのモデルでは、グルコース存在条件において *KmAdh1* と *KmAdh2* とが細胞質でエタノール合成を行い、ミトコンドリア内の *KmAdh4* とシャトルを形成し、*KmAdh4* はエタノールを酸化すると同時に NADH を生産する。これによって発酵時に必要な NADH を確保する。一方、非発酵性炭素源存在条件では、ミトコンドリア内の *KmAdh3* が非発酵性炭素源の代謝によって蓄積した NADH をアセトアルデヒドを用いて酸化し、その結果できたエタノールは細胞質で *KmAdh1* によって酸化される。これによって細胞質の NADH を確保する。

以上のように、本研究は、耐熱性酵母 *K. marxianus* の Adh を詳細に解析し、それぞれの生理的役割を明らかにすると同時に、新たなエタノール-アセトアルデヒドシャトルを提唱し、ミトコンドリア内および細胞質の NADH/NAD<sup>+</sup> のバランス調節機構を示唆している。本研究は、単に *K. marxianus* にとどまらず、他のエタノール生産性微生物の代謝を考える上で重要な知見を提供すると考えられる。よって学位論文として十分に相応しいと評価した。