

# *Zymomonas mobilis* 呼吸鎖の細胞内未知機能の解析

林 毅

(別府大学大学院 食物栄養科学研究科)

## 研究の目的

*Zymomonas mobilis* はエタノール発酵を行う細菌で、テキーラの醸造菌としても知られている。また *Z. mobilis* はエタノール発酵経路のみならず、呼吸鎖も有する。これまで、*Z. mobilis* の呼吸の能力が低下した呼吸欠損株 (RDM 株) の単離に初めて成功した (計 11 株)<sup>1)</sup>。これら RDM 株の呼吸鎖欠損部分を酵素および遺伝子レベルで解析したところ、5 株 (RDM-1、RDM-2、RDM-3、RDM-6、RDM-7) がシトクロム *bd* 型ユビキノール酸化酵素 (CydAB) の活性が低下 (欠損) した株、5 株 (RDM-4、RDM-5、RDM-8、RDM-9、RDM-11) が NADH 脱水素酵素 (NDH) の活性が低下した株であることが明らかとなった<sup>2)</sup>。解析の結果、これら RDM 株は特徴的なエタノール生産能を有することが明らかとなった。すなわち RDM 株は好気条件において高い増殖能とエタノール生産性を有していることが明らかとなった<sup>2)</sup>。さらに高温条件下においても野生株 (wt) と比較して高い増殖能とエタノール生産性を示した。以上の結果から、RDM 株は優秀なエタノール生産菌であることが明らかとなった<sup>2,3)</sup>。

一方で視点を変えると、好気条件や高温条件で呼吸欠損株の増殖能が上昇するということは、*Z. mobilis* において呼吸鎖は、自身の増殖の阻害因子として働いているとも考えることができる。この表現型を見る限り *Z. mobilis* にとって呼吸鎖は一見不要なものに思われるが、なぜ進化の過程で淘汰されず呼吸機能が保存されているか謎である。近年になって、この呼吸鎖には呼吸以外の別の生理機能があるのではないかと議論され始めた<sup>3)</sup>。そこで当研究では、*Z. mobilis* 呼吸鎖の新規な生理機能の探索および解析を行った。

## 方法

RDM 株は *Z. mobilis* ZM6 (ATCC 29191) を野生株として派生した株を用いた<sup>1)</sup>。*Z. mobilis* 培地は 0.5% 酵母エキスと 2% D-グルコースを含む液体培地を用いた。増殖試験は試験管 (16.5 φ mm × 165 mm) 中で 30°C、50 rpm で培養しながら、タイテック社の OD-Monitor C&T を用いて 600 nm の吸光度を 1 時間ごとにモニターした。補完実験における NDH (pZA22-ndh) と CydAB (pZA22-cydAB) の発現ベクターの作製に関しては、以前に報告した<sup>2)</sup>。細胞内における塩化ナトリウム濃度は、モール法で定量した。D-ソルビトールは、ロッシュ社の F-キット D-Sorbitol/Xylitol を用いて定量した。

## 結果

初めに *Z. mobilis* の呼吸鎖は何らかのストレス耐性に関与しているのではないかと予想し、浸透圧、高温、冷凍、有機溶媒など、様々なストレス存在下において wt と RDM 株の増殖能の比較を行った。その結果、すべての RDM 株において浸透圧ストレス因子である塩化ナトリウムと塩化カリウムに対する耐性が低下していることが明らかとなった。同じストレス因子として非イオン性のエチレングリコールにおいては、増殖能に変化は見られなかった。

次に呼吸鎖とこの塩耐性の関与を詳細に評価するために、補完実験を実施した。すなわち、pZA22-ndh もしくは pZA22-cydAB をそれぞれ該当する RDM 株に導入し、呼吸機能を補完した。その結果、0.25 M 塩化ナトリウムと 0.25 M 塩化カリウムを含むそれぞれの培地中において、野生株と同等の増殖能を示した (図 1)。さらに pZA22-ndh および pZA22-cydAB を wt 株に導入した結果、塩存在下において pZA22 のみを導入した wt と比べて 30 時間後には 2 倍以上の細胞量を示した。またそれらの補完株は細胞形態が改善していた。すなわち RDM 株は塩存在下では細胞分裂が阻害されて細胞が異常に伸び、複数の細胞が絡み合った異常な細胞形態を示すものが多く見られたが (図 2a)、呼吸鎖の活性を補完すると異常形態の細胞は減り、多くの細胞の形態に改善が見られた (図 2b)。以上の結果から、呼吸鎖が塩耐性に関与することが明らかとなった。

図 1

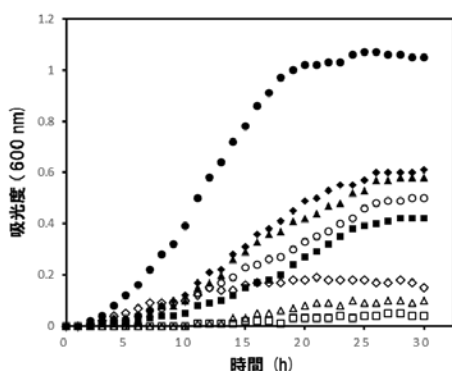


図 1 NDH が補完された RDM 株の塩ストレス条件における細胞増殖能の評価. wt (○)、RDM-4 (△)、RDM-5 (□)、RDM-11 (◇) 株を 0.25 M 塩化ナトリウムを含む液体培地において増殖能を評価した。白および黒のマーカーはそれぞれ pZA22 および pZA22-ndh ベクターを導入した株を示す。

図 2



図 2 NDH が補完された RDM-4 株の塩ストレス条件における細胞の形態 RDM-4 株に pZA22 (a) と pZA22-ndh (b) ベクターを導入した株を 1.8 M 塩化ナトリウムを含む液体培地で培養して、光学顕微鏡にて観察した。

次に呼吸鎖が塩耐性を付与するメカニズムを調べるために、細胞内の塩化ナトリウム濃度を測定した。wt 株にそれぞれ pZA22 と pZA22-ndh を導入した株を 1.8 M 塩化ナトリウム含有培地で培養し細胞内の塩化ナトリウム濃度を比較したところ、ほぼ同程度の細胞内塩化ナトリウム濃度を示した。このことから呼吸鎖が  $\text{Na}^+$  排出ポンプの役割をしている可能性は否定された。次に *Z. mobilis* は浸透圧ストレス下において、適合溶質としてソルビトールを蓄積させるという報告がある。従って wt-pZA22 と wt-pZA22-ndh 株の細胞内ソルビトール量を比較したところ、wt-pZA22-ndh 株において wt-pZA22 株の 1.25 倍のソルビトール量の増加がみられた。

## 結論

*Z. mobilis* の呼吸鎖は塩耐性に関与することが明らかとなった。呼吸鎖が塩耐性を付与するメカニズムとして、呼吸鎖が D-ソルビトールの生産を制御している可能性が示唆された。さらに呼吸鎖構成因子 (NDH と CydAB を含む) を高発現させることによって、*Z. mobilis* の塩耐性を増強できることが明らかとなった。

## 文献

- 1) Takeshi Hayashi, Yoshifumi Furuta, and Kensuke Furukawa. (2011) Respiration-deficient mutants of *Z. mobilis* show improved growth and ethanol fermentation under aerobic and high temperature conditions. *J. Biosci. Bioeng.* 111:414-419
- 2) Takeshi Hayashi, Tsuyoshi Kato, and Kensuke Furukawa. (2012) Respiratory Chain Analysis of *Zymomonas mobilis* Mutants Producing High Levels of Ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5622-5629
- 3) 林 毅、古川謙介 (2012) 呼吸能低下株は高い好気エタノール発酵能と熱耐性を同時に獲得する *化学と生物* 50:780-781