

学 位 論 文 要 旨

(Summary of the Doctoral Dissertation)

| | |
|--------------------------------|---|
| 学位論文題目 (Dissertation Title) | The Diversity and Physiological Roles of NADH Dehydrogenase in Acetic Acid Bacteria (酢酸菌における NADH デヒドロゲナーゼの多様性と生理学的役割) |
| 氏 名 (Name) | Feronika Heppy Sriherfyna |

NADH dehydrogenase, an enzyme catalyzing electron transfer from NAD(P)H to ubiquinone subsequently oxygen as a terminal electron acceptor, is one of pivotal enzymes undertaking respiration process in the central metabolism system and supporting the growth of microorganism, including acetic acid bacteria (AAB). NADH dehydrogenase is divided into four types, including Type-I NADH dehydrogenase (Complex I or NDH-1), Type-II or alternative NADH dehydrogenase (NDH-2), sodium pumping NADH dehydrogenase (Nqr), and Type-IV NADH dehydrogenase involving in nitrate respiration in the *Thermus thermophiles*, an extreme thermophilic bacterium. The type-I and type-II NADH dehydrogenases are encoded in the *nuo* and *ndh* genes, respectively. The type-I and type-II NADH dehydrogenases possessed by AAB were studied and this study revealed that these gene distributions were in accordance with the phylogenetic relationships. This study revealed that the type I comprised complex I_A and complex I_E, where *nuoC* and *nuoD* are fused as *nuoC/D* in the complex I_E gene cluster. The additional type of Type-I NADH dehydrogenase belonging to genera *Acetobacter*, *Gluconobacter*, and *Komagataeibacter* is complex I_A' which lacks the *nuoM* gene from the complex I_A gene cluster. In case of Type-II NADH dehydrogenase, NDH, nearly all AAB rule out of early-diverged species bearing *ndh* gene, whereas the amino acid residue replacement in *ndh* gene directing the capability in oxidizing NADPH is owned by some species.

Gluconobacter oxydans NBRC3293, a gram negative and obligate aerobe bacterium belong to *Acetobacteraceae* family, possesses two NDHs, primary NDH (p-NDH) and auxiliary NDH (a-NDH) oxidizing NAD(P)H generated from pentose phosphate pathway and Entner-Doudoroff pathway due to lack of phosphofructokinase and succinate dehydrogenase in Embden-Myerehof-Parnas pathway and TCA cycle. These bacteria utilize sugar or sugar alcohol as a carbon source and have two metabolic systems consist of nicotinamide independent-periplasmic and nicotinamide cofactor dependent-cytoplasmic oxidation systems. Several enzymes

(和文 2,000 字程度 / 英文 800 語程度)
(about 800 words)

perform in the central metabolism system comprising membrane-bound glucose dehydrogenase (GdhM) and glycerol dehydrogenase (GLDH) oxidizing glucose into gluconic acid and 5-ketogluconic acid in the periplasm, respectively. GdhM deficiency leads to uptake most of glucose into cytoplasm and assumed to affect the intracellular redox balance. To characterize biochemical properties of the two NDHs, heterologous expression in *E. coli* DKO strain devoid of Type-I and Type-II NADH dehydrogenase was conducted. It is revealed that p-NDH has a specificity to NADH, whilst a-NDH oxidizes both NADH and NADPH. Therefore, this study suggests that a-NDH play a role in NADPH oxidation of *G. oxydans*. To elucidate the physiological role of a-NDH, *G. oxydans* NBRC3293 derivatives defective of a-NDH were constructed. Elimination of *ndhA* gene showed similar growth rate to wild-type strain in glucose medium, whereas under the Δ *gdhM* background, the mutant showed less growth compare to its parental strain. The intracellular redox investigation performed elevated NADPH level in the double mutant strain that becomes a plausible reason of its limiting cell growth. Due to periplasmic oxidation system blocked, the cell utilized cytoplasmic oxidation system that relies on the presence of a-NDH to release a "metabolic jam". A similar phenomenon also took place when *G. oxydans* NBRC3293 cultivated in mannitol medium.

学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

| | |
|--|---|
| 氏 名 | FERONIKA HEPPY SRIHERFYNA |
| 審査委員 | 主 査： 薬 師 寿 治 |
| | 副 査： 松 井 健 二 |
| | 副 査： 星 田 尚 司 |
| | 副 査： 高 坂 智 之 |
| | 副 査： 片 岡 尚 也 |
| 論文題目 | The Diversity and Physiological Roles of NADH Dehydrogenase in Acetic Acid Bacteria (酢酸菌における NADH デヒドロゲナーゼの多様性と生理学的役割) |
| 【論文審査の結果及び最終試験の結果】 | |
| <p>FERONIKA HEPPY SRIHERFYNA 君による学位論文「The Diversity and Physiological Roles of NADH Dehydrogenase in Acetic Acid Bacteria (酢酸菌における NADH デヒドロゲナーゼの多様性と生理学的役割)」について、その論文審査と口頭発表による最終試験を行った。本学位論文は、グルコノバクター属酢酸菌の糖代謝におけるニコチンアミド補因子の酸化還元調節について遺伝子マイニング、系統解析、遺伝子工学、分子生物学なアプローチで解析したものである。特にグルコノバクター属酢酸菌は糖類を細胞表面で不完全に酸化する特徴的な代謝を行う。このユニークな代謝系を理解する上で、関連する細胞質での糖代謝の理解が不可欠となる。本論文は背景説明の1章を含めた3章構成となっており、第2章ではニコチンアミド補因子を酸化する酵素の、広く酢酸菌における多様性と分布をそれぞれの系統解析に関連させて論じ、その分子構造や機能の成り立ちを考察している。第3章は、第2章でも言及している2つの相同なニコチンアミド補因子酸化酵素の生理学的役割について糖代謝と関連付けながら解析をしている。予備的な方の酸化酵素の機能と生理学的な役割を明らかにした。</p> <p>学位論文について審査委員による審査が行われ、研究内容の説明が口頭により行われた。その後、審査委員ならびに出席者からの質問を受け、それらに対する的確に回答した。これらの結果から、本論文が高度な内容を有していること、また本人が十分に本研究内容を理解して主体的に本研究を推進したことが明らかになった。また、本研究にはいくつかの独創的な内容が含まれており、しかも、それらの多くは、本人の主体的な発想と研究によって産みだされたものと判断された。</p> <p>以上のことより、FERONIKA HEPPY SRIHERFYNA 君による本研究は十分に博士号を与えるにふさわしい内容を有するものと判定された。</p> | |