

Abstract of Doctoral Dissertation

Title : Studies on enzymes involved in glyoxylate metabolism in an acetic acid bacterium

Doctoral Program in Advanced Life Sciences
Graduate School of Life Sciences
Ritsumeikan University

クンサブ ジャッカファン
KUMSAB Jakkaphan

Glyoxylate is an important intermediate in the microbial glyoxylate bypass pathway. However, little is known about enzymes involved in glyoxylate metabolism other than the glyoxylate pathway in acetic acid bacteria. In this study, first, glyoxylate dehydrogenase was solubilized and partially purified from the membrane fraction of *Acetobacter aceti* JCM20276. The enzyme exhibited high substrate specificity towards glyoxylate. The optimal pH for the enzyme reaction was observed at pH 7 and it showed relatively high activity at 35-45°C. A combination of 2,6-dichlorophenolindophenol and phenazine methosulfate served as the most efficient electron acceptor for the enzyme, and its activity was independent of cytochrome *c*, NAD, NADP, and ferricyanide. The addition of Fe³⁺ significantly inhibited the enzyme activity. The results suggest that the glyoxylate dehydrogenase from *A. aceti* JCM20276 is distinct from the glyoxylate dehydrogenases reported from fungi. Next, an uncharacterized protein with moderate sequence similarities to *Gluconobacter oxydans* succinic semialdehyde reductase and plant glyoxylate reductases/succinic semialdehyde reductases was found in the genome of *A. aceti* JCM20276. The corresponding gene was cloned and expressed in *Escherichia coli*. The gene product was purified and identified as a glyoxylate reductase that exclusively catalyzed the NAD(P)H-dependent reduction of glyoxylate to glycolate. The strict substrate specificity of this enzyme to glyoxylate, the diverged sequence motifs for its binding sites with cofactors and substrates, and its phylogenetic relationship to homologous enzymes suggested that this enzyme represents a novel class of enzymes in the β-hydroxyacid dehydrogenase family. These studies may provide an important clue to clarify the metabolism of glyoxylate in acetic acid bacteria.

博士論文要旨

論文題名：酢酸菌におけるグリオキシル酸代謝に関する
酵素の研究立命館大学大学院生命科学研究科
生命科学専攻博士課程後期課程クンサブ ジャッカファン
KUMSAB Jakkaphan

グリオキシル酸は、微生物のグリオキシル酸バイパス経路における重要な代謝中間体である。しかし、酢酸菌において、グリオキシル酸経路以外のグリオキシル酸代謝に関する酵素についてはほとんど知られていない。本研究では、まず、*Acetobacter aceti* JCM20276 の膜面分からグリオキシル酸デヒドロゲナーゼを可溶化し、本酵素の部分精製を行った。本酵素はグリオキシル酸に対して高い基質特異性を示した。本酵素は、pH 7で最も高い活性を示し、35~45°Cにおいて比較的高い活性を示した。本酵素の電子受容体について検討したところ、2,6-ジクロロフェノールインドフェノールとフェナジンメトサルフェートの組み合わせが最も効率的な電子受容体として機能し、シトクロム c、NAD、NADP、およびフェリシアニドは電子受容体とはならなかった。Fe³⁺の添加は本酵素活性を著しく阻害した。これらの結果より、*A. aceti* JCM20276 のグリオキシル酸デヒドロゲナーゼは、過去に報告されている真菌類由来のグリオキシル酸デヒドロゲナーゼとは異なる特徴を有していることが示された。次に、*Gluconobacter oxydans* 由来コハク酸セミアルデヒドレダクターゼおよび植物由来グリオキシル酸レダクターゼ/コハク酸セミアルデヒドレダクターゼと中程度のアミノ酸配列相同性を示す機能未知タンパク質の遺伝子を、*A. aceti* JCM20276 のゲノム配列中に見出した。本遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させた。本遺伝子産物を精製してその酵素活性を調べたところ、本タンパク質は、NAD(P)H 依存的にグリオキシル酸のグリコール酸への還元を触媒するグリオキシル酸レダクターゼであることが示された。本酵素が示すグリオキシル酸に対する厳密な基質特異性、補因子および基質結合モチーフの配列の特徴、および相同酵素との系統学的関係から、本酵素はβ-ヒドロキシ酸デヒドロゲナーゼファミリーにおける新たなクラスに属する酵素の代表例であることを明らかとした。したがって、本論文は、酢酸菌におけるグリオキシル酸代謝を深く理解するための重要な手がかりを与えるものである。