

論文審査結果の要旨

平成 27年 2月 12日

氏名	上田 純子
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	甲第 125 号
学位記の授与日	平成 27年 3月 18日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 創価大学大学院学則第 31 条第 2 項該当 創価大学学位規則第 3 条の 3 第 1 項該当
論文題目	新規の好熱性キチン分解細菌 <i>Paenibacillus thermoaerophilus</i> TC22-2b 株由来キチナーゼの性質と構造に関する研究
論文審査機関	工学研究科委員会
論文審査委員	主査委員 博士 (学術) 黒沢 則夫 委員 理学博士 山本 修一 委員 水産学博士 田口 哲

<論文の内容の要旨>

キチンは、真菌や昆虫、甲殻類など多様な生物の構成多糖として環境中に広く分布し大量に生産されている多糖類である。一方キチン分解微生物はキチン分解酵素 (キチナーゼ) を分泌し、環境中におけるキチンの分解を通して炭素循環に寄与している。また、好熱菌が産生するキチナーゼは、その高い熱安定性から、カニ殻などの水産加工廃棄物からオリゴ糖や単糖を得るための酵素として産業上の応用も試みられている。本論文は、自然界におけるキチン分解微生物やキチナーゼの多様性に関する知見の蓄積と、産業用キチナーゼの新たな供給源となるような微生物資源の取得を目的として、新規な好熱性キチン分解微生物を分離し記載するとともに、分離株が分泌するキチナーゼについて解析した研究成果をまとめたものである。

本論文は 5 章から構成されている。

第 1 章では、キチンやキチナーゼの一般的な解説、微生物由来キチナーゼに関するこれまでの研究、新種細菌を記載することの意義、本研究の目的が述べられている。

第 2 章では、本研究で用いられた材料と方法が記載されており、具体的には、新規な好熱性キチン分解細菌の分離と同定、分離株のキチナーゼの精製と解析、精製キチナーゼの遺伝子の取得と分子構造の推定方法について述べられている。

第 3 章では、実験結果が述べられており、以下のように要約される。

3-1. 多相分類学的解析による TC22-2b 株の同定と記載 剪定枝を堆積発酵させた堆肥から分離された TC22-2b 株は、キチン分解活性を有する好熱性微生物であることを確認した。TC22-2b 株について、進化系統学的解析、形態学的解析、生理・生化学的解析、化学分類学的解析が行われた結果、本菌株は新種の *Paenibacillus* 属細菌であると同定され、*Paenibacillus thermoaerophilus* と命名・記載された。

3-2. TC22-2b 株が分泌するキチナーゼ (*PthChiA*) の精製および性質 硫安沈殿、コロイダルキチンへの吸着、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製された *PthChiA* の分子量は、SDS-PAGE の結果から約 48 kDa と推定され、N 末端アミノ酸配列は AVSTGKK であった。*PthChiA* は 60°C、pH 4 で最大活性を示し、 K_m 、 k_{cat} 、 k_{cat}/K_m は各々 1.4 mM、9.6 s⁻¹、6.8 mM⁻¹ s⁻¹ であった。また、50°C で 2 時間インキュベート後も 68% 以上の活性を維持し、pH 4-10 で 2 時間インキュベート後では 80% 以上の活性が維持されたことから、熱安定性、pH 安定性ともに優れた酵素である事がわかった。さらに、*PthChiA* の加水分解

産物の解析の結果、*PthChiA* はエンド型キチナーゼであると推定された。

3-3. *PthChiA* の推定分子構造 *PthChiA* の N 末端アミノ酸配列ならびに GH18 ファミリーに属するキチナーゼに保存されているアミノ酸配列の情報に基づいて縮重プライマーを設計し、これを用いた PCR により *PthChiA* の部分遺伝子を取得した。続いてインバース PCR により遺伝子全長 1548 bp を得た。*PthChiA* は 515 アミノ酸配列から成り、最も高い相同性を示したのは *Paenibacillus* sp. J14 株由来キチナーゼであったが、その値は 68%にとどまった。*PthChiA* は N 末端側からシグナルペプチド、GH18 ドメイン、フィブロネクチンタイプ III 様ドメイン (Fn III)、糖質結合モジュール (CBM) からなるマルチドメイン構造を持つと推定された。

第 4 章では、第 3 章で得られた実験結果について、これまでに報告されているキチン分解微生物やキチナーゼに関する知見も加えながら考察が行われている。*Paenibacillus thermoaerophilus* TC22-2b 株が分離・記載されたことにより、高温環境におけるキチン分解とそれに対する *Paenibacillus* 属細菌の寄与について新たな知見が得られたこと、*PthChiA* は耐熱性キチナーゼの中では比較的高い触媒効率を示したことなどが強調されている。

第 5 章は、本論文全体の総括として、本研究の学術的意義と今後の展望について記されている。

なお、本論文の内容の一部は、下記の査読制度を有する権威ある学術雑誌に掲載されている。

Junko Ueda, Shuichi Yamamoto, and Norio Kurosawa. *Paenibacillus thermoaerophilus* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2013) Vol. 63: pp.3330-3335.

Junko Ueda and Norio Kurosawa. Characterization of an extracellular thermophilic chitinase from *Paenibacillus thermoaerophilus* strain TC22-2b isolated from compost. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (2015) Vol. 31: pp.135-143.

<論文審査結果の要旨>

本論文は、キチナーゼを分泌する微生物の分離からその同定と記載、分泌されたキチナーゼの精製と性質解析、さらにその遺伝子のクローニングとアミノ酸配列の解析に至る一連の研究結果がまとめられたものである。

本研究により、約 60°C まで生育する好熱性の *Paenibacillus* 属細菌が分離され、同温度でキチン分解活性を示すことが確認された。その結果、これまで常温環境において有機物分解を担っていると考えられていた *Paenibacillus* 属細菌が、堆肥のような中程度の高温環境においてもその役割を果たしていることが明らかにされた。これは微生物分類学および微生物生態学における新たな知見である。

一方、応用を目的としたバイオマスの微生物分解を、単独の微生物（またはそれに由来する酵素）で行うことには効率面で限界があり、現在では複数の微生物の共存系を用いた検討が主流となっている。キチン分解においても、共培養系を構成するキチン分解菌の選択肢を広げることが必要である。本研究により、新規なキチン分解細菌が正式に記載されたことで公知の生物資源となり、またそのキチナーゼの詳細な性質が明らかにされた事は、今後のキチン分解研究に対する大きな貢献である。さらに遺伝子の取得も行われた事により、産業利用と基礎研究両面にとって有用な組換え酵素の発現も可能となった。以上の事から本論文は、博士（工学）の学位論文として十分な価値を有するものと認める。