

学 位 論 文 題 名

Bacillus 属細菌産生セルラーゼの
酵素学的・遺伝子工学的研究

学位論文内容の要旨

Bacillus 属細菌が生産するセルラーゼはいずれも結晶性セルロースに殆ど作用しないエンドグルカナーゼであり、バイオマス資源の有効利用の観点からの利用価値は低い。この為、酵素特性や構造及び遺伝子に関する知見は極めて少ないものであった。一方、近年、エンドグルカナーゼの洗剤用酵素としての利用の可能性が示唆されたが、本研究以前に知られた酵素の多くは、洗剤用としての要件であるアルカリ pH 領域での活性が低く、また、僅かに報告されたアルカリエンドグルカナーゼもその生産性が乏しいものであった。

本研究では、この様な背景の中で、

1. 洗剤用としての特性を満たすエンドグルカナーゼを生産する各種 *Bacillus* 属細菌を自然界から分離した。
2. 突然変異によってエンドグルカナーゼの生産性の向上を図った。
3. 各酵素の精製を行い、物理化学的、酵素学的特性を明らかにして、これらを他酵素と比較した。
4. 各酵素の遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定して、酵素の構造を推定した。
5. 遺伝子構造及び酵素構造を他起源の遺伝子・酵素と比較した。
6. 遺伝子工学による酵素生産性の向上を図った。

本研究によって、新規なエンドグルカナーゼ生産性 *Bacillus* 属細菌を見出し、その酵素特性や遺伝子及び酵素の構造を明らかにすると共に、酵素生産性の向上を果たして、*Bacillus* 属のエンドグルカナーゼの酵素学及び遺伝子工学の発展に寄与した。

本研究の結果を要約すると、

1. エンドグルカナーゼを生産する *Bacillus* 属細菌の検索を行い、*B. circulans* 或いは *B. pumilus* に近縁の好アルカリ性 KSM-635株、*B. subtilis* に近縁の好アルカリ性 KSM-64株、*B. pumilus* に近縁の KSM-522株及び、*B. subtilis* に近縁の KSM-330株を分離した。

2. 各分離菌株の粗酵素特性の検討を行った。KSM-635株及び KSM-64株由来の酵素は、pH 9～10に作用至適を有し、KSM-522株由来の酵素は、pH 6～10の範囲で最高の活性を示した。これらは15℃以下でも作用して、各種洗剤成分による障害が認められず、更に、実際の洗濯試験による洗浄効果が確認された。一方、KSM-330株の酵素は pH 5 付近及び50℃付近が作用の至適条件であった。

3. 各分離菌株の酵素生産に関する検討を行った。KSM-64株による酵素生産は、CMC 或いはセロビオースによる誘導やグルコースによる異化代謝産物抑制を受けたが、KSM-635株、KSM-522株及び KSM-330株は構成的に酵素を生産した。更に、KSM-64株の異化代謝産物抑制の解除や KSM-64株及び KSM-635株の細胞壁合成阻害剤に対する耐性の付与によって、親株の2～40倍高い酵素生産量を示す変異株を取得した。

4. 各酵素の精製を行い、KSM-635株由来のアルカリエンドグルカナーゼ E-H 及び E-L、KSM-522株のエンドグルカナーゼ E-I、E-II 及び E-III、更に、KSM-330株の酸性エンドグルカナーゼ Endo-K 及び Endo-K 2 を取得し、Endo-K 2 を除く各酵素の以下の物理化学的及び酵素学的特性を明らかにした。

5. SDS-PAGE 及びゲル濾過により、E-H は分子量約130Kの四量体であり、E-L 及び Endo-K は、分子量約100K及び42Kの単量体蛋白であると推定した。一方、KSM-522株の各酵素は、SDS-PAGE によって分子量78K、61K及び61Kと算出されたが、ゲル濾過法による推定分子量はこれらの1/2程度のものであった。各酵素の等電点は、E-H 及び E-L が pH 4 以下、E-I は pH4.4、E-II 及び E-III は pH3.5、Endo-K は pH10以上であった。

6. 各酵素の基質特異性と反応様式を明らかにした。いずれの酵素も CMC に作用し、還元糖の生成と CMC の粘度低下をもたらす典型的な β -1,4-エンドグルカナーゼ(EC 3.2.1.4)であった。E-H 及び E-L はセロトリオース以上、E-I と Endo-K はセロテトラオース以上、E-II と E-III はセロペンタオース以上のセロオリゴ糖を分解して、主生成物はセロビオース、セロトリオースとグルコースであった。

7. 各酵素の金属イオン及び各種化合物による影響を明らかにした。各酵素はいずれも 1 mM の Hg^{2+} によって失活した。E-H 及び E-L は 1 mM の *p*-クロル安息香酸第二水銀によって部分的に阻害されたが、他の SH 酵素阻害剤には影響されなかった。また、他の酵素には SH 酵素阻害剤による影響が認められなかった。一方、E-H、E-L 及び Endo-K は、10 μ M 以下の *N*-ブromoコハク酸イミド (NBS) によって阻害され、活性発現に対する Trp の関与を示唆した。更に、Endo-K について詳細な解析を行い、Trp 1 分子以上が活性発現に関与するこ

とを明らかにした。

8. KSM-635株及びKSM-64株由来のアルカリエンドグルカナーゼ遺伝子、及びKSM-330株由来の酸性エンドグルカナーゼ遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。各遺伝子にSD配列、 σ^{43} 型プロモーター様配列、及び転写ターミネーター様の配列を見出し、これらがモノシストロンであることを推定した。また、KSM-635株及びKSM-64株由来の遺伝子のプロモーター領域に、異化代謝産物抑制に関与なると思われる配列を見出した。

9. 各遺伝子構造から各酵素の構造を推定した。KSM-635株の酵素はアミノ酸941残基中、N末側29残基がシグナルペプチドと推定され、成熟酵素の分子量101412は、精製酵素E-Lの分子量100Kに近い値であった。KSM-64株の酵素は、アミノ酸822残基中、N末側30残基がシグナルペプチドであり、分子量は87802の蛋白であると推定された。一方、KSM-330株では、463アミノ酸残基中、56～75番目までの配列が、Endo-KのN末と完全に一致し、成熟酵素の分子量は46090と算出された。

10. 各酵素のアミノ酸配列の相同性検索を行った。KSM-635株及びKSM-64株由来の両酵素は、他の*Bacillus*属細菌由来のアルカリ及び中性エンドグルカナーゼと高い相同性を示したが、KSM-330株の酵素は異なった構造であり、*Clostridium*属や*Cellulomonas*属由来の酵素との相同性を見出した。

11. 各遺伝子を*B. subtilis*中で発現させた。特に、KSM-64株の遺伝子を有する組換え*B. subtilis*は、他のエンドグルカナーゼ遺伝子の場合よりも極めて高い酵素生産量を示し、遺伝子組換えによるエンドグルカナーゼの増産を果たした。

以上、自然界より各種のエンドグルカナーゼを生産する*Bacillus*属細菌を分離し、突然変異法による酵素生産量の増大を図った。また、各エンドグルカナーゼの精製及び遺伝子のクローニングを行って、酵素特性、遺伝子及び酵素構造を明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男

副 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 教 授 大 野 哮 司

本論文は、和文183頁、図61、表34、引用文献106、4章および総括からなり、ほかに参考論文11編が付されている。

Bacillus 属細菌が生産するセルラーゼはいずれも結晶性セルロースに殆ど作用しないエンドグルカナーゼであり、バイオマス資源の有効利用の観点からの利用価値は低いものであったが、近年、洗剤用酵素としての利用の可能性が示唆され、pHが高く、また、各種の界面活性剤やキレート剤などを含む洗濯液中で作用する酵素を大量に生産する微生物が望まれていた。

本研究では、洗剤用酵素としての特性を有する各種のエンドグルカナーゼを生産する *Bacillus* 属細菌を分離し、突然変異法による酵素生産量の増大を図ると共に、各エンドグルカナーゼの精製及び遺伝子のクローニングを行って、酵素及び遺伝子の構造、特性を明らかにしたものである。

第一章は、*Bacillus* 属細菌のエンドグルカナーゼの生産と酵素及び遺伝子の解析に関する研究史について述べられている。

第二章は、エンドグルカナーゼを生産する *Bacillus* 属細菌の検索と育種について述べられ、下記の内容が含まれている。

1. 自然界から、*B. circulans* 或いは *B. pumilus* に近縁の好アルカリ性 KSM-635株、*B. subtilis* に近縁の好アルカリ性 KSM-64株、*B. pumilus* に近縁の KSM-522株及び、*B. subtilis* に近縁の KSM-330株を分離した。
2. KSM-635株及び KSM-64株由来の酵素が、アルカリ性で作用し、各種洗剤成分によって阻害されないことを明らかにし、更に、実際の洗濯試験による洗浄効果が確認した。一方、KSM-330株の酵素は pH 5 付近に至適を有する酸性エンドグルカナーゼであった。
3. KSM-64株の酵素生産は誘導や異化代謝産物抑制を受けたが、他の菌株は構成的に酵素を生産した。また、異化代謝産物抑制の解除や細胞壁合成阻害剤に対する耐性の付与によって、高い酵素生産量を示す変異株を取得した。

第三章では、*Bacillus* 属細菌由来のエンドグルカナーゼの精製とその特性について述べられ

ており、下記の内容である。

1. KSM-635株由来のアルカリエンドグルカナーゼE-H及びE-L, KSM-522株のエンドグルカナーゼE-I, E-II及びE-III, KSM-330株の酸性エンドグルカナーゼEndo-K及びEndo-K2を取得した。
2. 各酵素の分子量に関する解析を行い, E-Hは分子量約130Kの四量体, E-L及びEndo-Kは, 分子量約100K及び42Kの単量体蛋白であると推定したが, KSM-522株の各酵素の分子量は測定方法によって異なる値が得られた。
3. 各酵素がCMCに作用して還元糖の生成とCMCの粘度低下をもたらす典型的な β -1, 4-エンドグルカナーゼ(EC 3. 2. 1. 4)であることを明らかにし, 一方, 各酵素のセロオリゴ糖に対する作用様式の差異を明らかにした。
4. 各酵素の金属イオン及び酵素阻害剤による影響を明らかにし, E-H, E-L及びEndo-KのN-ブromoコハク酸イミドによる阻害を見出した。更に, Endo-Kに関する詳細な解析から, 活性発現にTrp1分子以上が関与することを明らかにした。

第四章は, 各 *Bacillus* 属細菌のエンドグルカナーゼ遺伝子のクローニングとその解析について下記の内容が述べられている。

1. KSM-635株, KSM-64株由来のアルカリエンドグルカナーゼ遺伝子, 及びKSM-330株由来の酸性エンドグルカナーゼ遺伝子をクローニングし, 各遺伝子の構造を明らかにした。
2. 遺伝子構造から各成熟酵素は, KSM-635株由来がアミノ酸912残基, KSM-64株由来が792残基及びKSM-330株由来が408残基であると推定した。
3. KSM-635株及びKSM-64株由来の両酵素と他の *Bacillus* 属細菌由来のアルカリ及び中性エンドグルカナーゼとの高い相同性とKSM-330株の酵素の異なった構造を明らかにした。
4. 各遺伝子を *B. subtilis* 中で発現させ, KSM-64株の遺伝子を有する *B. subtilis* による酵素生産量の増大を果たした。

以上の様に, 洗剤用エンドグルカナーゼを生産する *Bacillus* 属細菌の分離と育種, 各酵素の精製と遺伝子のクローニング及びこれらの解析を行い, *Bacillus* 属由来のエンドグルカナーゼとその生産に関して, 基礎的及び産業的な貢献を果たした。

よって, 審査員一同は別に行った学力確認試験の結果と併せて, 本論文の提出者 尾崎克也は博士(農学)の学位を得るに十分な資格あるものと判定した。