

β -Mannanase from *Bacillus subtilis*
and cloning of the related genes

(枯草菌の β -マンナーゼ及び関連する遺伝子のクローニング)

学位論文内容の要旨

近年農産廃棄物などの未利用バイオマス資源を有効に利用する方策が考慮されている。特に熱帯に位置する諸国ではその多くが廃棄されているのが現状で、このような一次産品の廃棄物を家畜の飼料などへ転換し、利用するための方法が検討されている。農産廃棄物にはセルロースと共にキシランやマンナンを含むヘミセルロースが多く含有されており、これらをヘミセルラーゼによって酵素的に低分子のオリゴ糖などへ分解することで、飼料の質的向上および付加価値の向上が期待される。

他方、製紙工業において、ヘミセルラーゼは環境問題からパルプの漂白過程に一部利用され始めている。用いられる酵素にはセルラーゼを含まない β -マンナーゼとキシラナーゼなどのヘミセルラーゼのみが利用される。

上記のような観点から本論文では、 β -マンナーゼに注目し、マンナンを分解する微生物を検索し、 β -マンナーゼとキシラナーゼを生産するが、セルラーゼを生産しない細菌を分離した。この細菌から β -マンナーゼを精製し、その性質を決定した。一方、 β -マンナーゼおよびキシラナーゼをコードする遺伝子のクローニングに成功した。また、親株では発現していないセルラーゼ遺伝子も同時にクローニングし、それらの構造を明らかにした。さらに応用的見地から本菌株の酵素を用いてパルプの漂白が可能であることを明らかにした。

本論文はこれらの経緯をまとめたもので、全8章より構成されている。各章の概要は以下の通りである。

第1章は序論であり、 β -マンナーゼ研究の現状と問題点および本研究の目的について述べた。

第2章では、熱安定性の比較的高い β -マンナーゼ高生産菌をタイの土壌より分離し、分類学的検討から *Bacillus subtilis* 5H株と同定した。本菌株は培地中にセルラーゼを生産せず、 β -マンナーゼとキシラナーゼを生産していることを見出した。さらに培養条件を検討し、 β -マンナーゼおよびキシラナーゼ生産のための至適条

件を決定した。

第3章では、本菌株から β -マンナーゼを精製し、その性質を決定したことについて述べた。本菌の培養液から3段階のカラムクロマトグラフィーで効率的に精製できた。 β -マンナーゼの分子量は38,000であり、60℃、pH6.5の条件で最大の活性を示した。またpH6.5、45℃以下で安定であった。本酵素に対する金属イオンの影響を調べたところ、本酵素は Hg^{2+} 、 Ag^+ 、 Fe^{3+} で活性が完全に阻害された。

第4章では、本菌株の β -マンナーゼ遺伝子をクローニングしたことについて述べた。ショットガン法を用いて大腸菌で作製し、遺伝子ライブラリーから得られた陽性クローンは、 β -マンナーゼ活性を示した。塩基配列を決定したところ、 β -マンナーゼ遺伝子は362アミノ酸をコードする、1,086bpのオープンリーディングフレーム(ORF)に存在した。本遺伝子から推定される分子量38,006のアミノ酸配列は、他の*Bacillus*属から得られている β -マンナーゼのアミノ酸配列を高い相同性を示した。

第5章では、前章で作製した遺伝子ライブラリーから親株では発現しないセルラーゼ遺伝子をクローニングし、その構造を明らかにしたことについて述べた。陽性クローンが保持するプラスミドの挿入断片の塩基配列を決定した結果、セルラーゼ遺伝子は分子量55,420の501アミノ酸をコードする1,503bpのORFにコードされていた。大腸菌によって発現させた酵素はガラクトマンナンには作用せず、コンニャクグルコマンナンおよびカルボキシメチルセルロースに対し、活性を示す分子量55,000の酵素蛋白質に翻訳され、ついで分子量35,000の酵素にグルコマンナンに強い活性を示す酵素に修飾されることを明らかにした。

第6章では、*Bacillus subtilis* 5Hが生産するキシラナーゼをコードする遺伝子をPCR法を用いてクローニングした。染色体DNAより増幅したDNA断片を含む形質転換株はキシラナーゼ活性を示した。塩基配列を決定した結果、キシラナーゼ遺伝子は213アミノ酸をコードする639bpのORFにコードされていた。

第7章では、*Bacillus subtilis* 5H株の培養液および精製した β -マンナーゼおよびキシラナーゼを用いたパルプの漂白について検討した。先にキシラナーゼを精製し、その性質を明らかにした。パルプの脱色試験において、 β -マンナーゼおよびキシラナーゼ処理したパルプはそれぞれ白色度が30~38%上昇した。また親株の培養液を用いても漂白活性を示したことから、本菌株の生産する酵素がパルプの漂白に有効であることを示した。

第8章では、総括では、以上の研究結果を要約するとともに、*Bacillus subtilis* 5H株の生産する酵素の将来の利用の可能性について論述した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 下 晋 一
副 査 教 授 高 井 光 男
副 査 教 授 棟 方 正 信
副 査 助 教 授 大 井 俊 彦

学 位 論 文 題 名

β -Mannanase from *Bacillus subtilis* and cloning of the related genes

(枯草菌の β -マンナーゼ及び関連する遺伝子のクローニング)

近年農産廃棄物などの未利用バイオマス資源を有効に利用する方策が考慮されている。このような一次産品の廃棄物を家畜の飼料などへ転換し、利用するための方法が検討されている。農産廃棄物にはセルロースと共にキシランやマンナンを含むヘミセルロースが多く含有されており、これらを酵素的に低分子のオリゴ糖などへ分解することで、飼料の質的向上および得られるオリゴ糖の生理作用などが期待されている。

他方、製紙工業において、ヘミセルラーゼは環境問題からパルプの漂白過程に一部利用され始めている。用いられる酵素にはセルラーゼを含まない β -マンナーゼとキシラナーゼなどのヘミセルラーゼのみが利用されている。

上記のような観点から本論文は、 β -マンナーゼに注目し、マンナンを分解する微生物を検索し、 β -マンナーゼとキシラナーゼを生産するが、セルラーゼを生産しない新たな性質を持った細菌を分離することに成功した。この細菌から β -マンナーゼを精製しその性質を決定した。一方、 β -マンナーゼおよびキシラナーゼをコードする遺伝子のクローニングに成功した。また、親株では発現していないセルラーゼ遺伝子も同時にクローニングし、それらの構造を明らかにした。さらに実用的見地から本菌株の酵素を用いてパルプの漂白が可能であることを明らかにした。

本論分は以下の8章から構成されている。

第1章は序論であり、 β -マンナーゼ研究の現状と問題点および本研究の目的を述べた。

第2章では、熱安定性の比較的高い β -マンナーゼ高生産菌を分離し、分類学的検討から *Bacillus subtilis* 5H株と同定した。本菌株は培地中にセルラーゼを生産せ

ず、 β -マンナーゼとキシラーゼを生産していることを見出した。さらに β -マンナーゼおよびキシラーゼ生産のための至適条件を決定した。

第3章では、本菌株から β -マンナーゼを精製し、その酵素学的な性質を決定したことについて述べた。

第4章では、本菌株の β -マンナーゼ遺伝子をクローニングし、その構造を決定したことについて述べた。塩基配列から、 β -マンナーゼ遺伝子は362アミノ酸をコードする、1,086bpのオープンリーディングフレーム上に存在していることを明らかにした。

第5章では、前章で作製した遺伝子ライブラリーから親株では発現していないセルラーゼ遺伝子をクローニングし、その構造を明らかにした。セルラーゼ遺伝子は分子量55,420の501アミノ酸をコードする1,503bpのORFにコードされていた。大腸菌によって発現させた酵素はガラクトマンナンには作用せず、コンニャクグルコマンナンおよびカルボキシメチルセルロースに対し、強い活性を示す分子量55,000の酵素蛋白質に翻訳され、ついで分子量35,000の酵素にグルコマンナンに強い活性を示す酵素に修飾されることを明らかにした。

第6章では、*B. subtilis* 5Hが生産するキシラーゼをコードする遺伝子をPCR法を用いてクローニングしたことについて述べた。塩基配列を決定した結果、キシラーゼ遺伝子は213アミノ酸をコードする639bpのORF上にコードされていることを明らかにした。

第7章では、*B. subtilis* 5H株の培養液、および精製した β -マンナーゼおよびキシラーゼを用いたパルプの漂白について検討した結果について述べた。先に親株からキシラーゼを精製しその性質を明らかにした。パルプの脱色試験の結果から、本菌株の生産する β -マンナーゼおよびキシラーゼはパルプの漂白に有効であることを示した。

第8章は総括であり、本研究結果を要約するとともに、*B. subtilis* 5H株の生産する酵素の将来の利用の可能性について論述した。

これを要するに、著者は分離同定した*B. subtilis*の生産する β -マンナーゼおよびキシラーゼの性質とそれらの遺伝子構造を明らかにし、これら酵素の応用的な見地からパルプの漂白に非常に有効であることを見出したものであり、酵素化学および生物工学の分野の研究の進展に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。