

学 位 論 文 題 名

Characterization of chitinases excreted
by *Bacillus cereus* CH and cloning of their genes

(*Bacillus cereus* CH が分泌するキチナーゼとその遺伝子の特定)

学位論文内容の要旨

キチンは N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が β 1,4-結合した天然高分子であり、その年間生産量はセルロースに匹敵する重要なバイオマス資源である。これらのバイオマス資源の活用においては、強い作用性を示す分解酵素の開発が不可欠である。また、キチン由来のオリゴ糖及びその誘導体は抗腫瘍性・抗菌性・エリシター作用などの生理活性を示すことから、高機能性分子開発の素材として注目されている。キチンは、構造多糖として菌界、動物界にわたって広く存在している。キチンを分解する酵素、キチナーゼ、は組織の構成成分としてキチン質を含有する生物のみならず、キチン質を保持しない植物や細菌によっても生産されていることが知られている。植物キチナーゼは、病原菌やウイルスに感染した場合に誘導されることから、植物の自己防御機構と関連していると予測されている。細菌はキチン質を分解し、栄養源として利用するために、キチナーゼを生産していると予測されている。また、一種類の細菌が効率的にキチン分解をするために、複数のキチナーゼを生産していることが報告されている。本論文では、第一に、土壌菌の一種である *Bacillus cereus* CH が分泌する 4 種のキチナーゼを単離し、各酵素分子の反応特異性とアミノ末端配列を解析した。第二に、推定したアミノ末端配列に基づくオリゴヌクレオチドプローブを利用して、対応する遺伝子をクローニングし、その DNA 配列を決定した。第三に、クローニングした遺伝子を大腸菌で発現させた。

コロイダルキチンを含む液体培地で誘導培養した *B. cereus* CH の培養濾液を粗酵素として、各種クロマトグラフ操作により 4 種のキチナーゼを単離した。SDS-PAGE 解析から、それらの分子量は 35 kDa (A), 47 kDa (B1), 58 kDa (B2), 64 kDa (B3) であると推定した。基質特異性及びアミノ末端配列の類似性に基づき、これらの酵素を A 群と B 群に分類した。A 群キチナーゼは水不溶性基質であるコロイダルキチン及び水溶性基質であるグリコールキチンと (GlcNAc)₂-pNP に対して高い活性を示すが、B 群は後者の水溶性基質に対して著しく低い活性を示す。従って、B 群キチナーゼは A 群キチナーゼに比べ、より狭い基質選択性をもつと予測した。各種基質に対する反応生成物は、高アルカリ条件イオン交換クロマトグラフ法 (HPAEC-PAD 法) を利用して同定した。コロイダルキチンを基質とした場合、GlcNAc 及び (GlcNAc)₂ を主反応生成物として与えた。キチンオリゴ糖 (GlcNAc)₃ を基質とした場合、(GlcNAc)₅ の生成が確認され、両酵素は糖転移活性を有することが判明した。加え

て、B 群キチナーゼは(GlcNAc)₂-pNP を基質とした場合、(GlcNAc)₃ を生成するが、A 群キチナーゼはこの糖転移反応を示さない。コロイダルキチン及びオリゴ糖に対する反応パターンの検討から、これらの酵素はエンド型に作用する酵素であると推定した。

アミノ末端配列に基づき調製したオリゴヌクレオチドプローブを利用した、コロニーハイブリダイゼーション法で解析した結果、キチナーゼ活性を発現する 2 種の形質転換体が得られた。それぞれの遺伝子の DNA 配列決定を行い、360 個のアミノ酸(分子量:39,470)をコードする ORF(*chiA*)と 676 個のアミノ酸(分子量:74,463)をコードする ORF(*chiB*)を確定した。登録されているキチナーゼ酵素のデータベースを利用したアミノ酸配列相同性解析から、A 群のキチナーゼは分泌シグナル配列と触媒機能性ドメインから構成されており、その触媒機能性ドメインは *B. circulans* WL-12 由来のキチナーゼ D の触媒部位と高い相同性を示すことが判明した。他方、B 群のキチナーゼは分泌シグナル配列、触媒機能性ドメイン、フィブロネクチン様配列、キチン結合ドメインから構成されており、*B. circulans* WL-12 由来のキチナーゼ A1 と高い相同性を示すことが判明した。クローニングした 2 種のキチナーゼ遺伝子(*chiA* 及び *chiB*)を挿入したベクター pBluescript II SK⁺を *Escherichia coli* XL1-Blue に導入し、組換え型キチナーゼの発現を試行した。*B. cereus* CH では、キチナーゼは培養液に分泌されるが、*E. coli* 発現システムでは、キチナーゼ分子は分泌されず、菌体内に検出された。菌体の超音波破碎液から各組換え型キチナーゼを精製し、それぞれのタンパク質の酵素活性と分子量を決定した。その結果から、*chiA* 及び *chiB* 遺伝子を導入した *E. coli* 細胞は、それぞれ 35 kDa と 64 kDa のキチナーゼタンパク質を発現していると結論した。クローニングした *chiB* 遺伝子から推定される分子量(70 kDa)と実際に分離した組換え型キチナーゼの分子量間の差異については、現在検討中である。*E. coli* システムで発現した組換え型キチナーゼの収率は *B. cereus* CH の収率よりも高いが、より高い発現効率のプロモーターを挿入することで、さらに収率が上昇すると期待できる。

本研究から、*B. cereus* CH は複数のキチナーゼを分泌していること、両群キチナーゼは糖転移活性を有していること、また、それぞれの遺伝子配列は *B. circulans* WL-12 由来のキチナーゼ D と A1 に高い相同性を示すことなどが判明した。キチン分解作用に対する両群キチナーゼの相互関係、及び高い効率で進行するキチン分解条件を明らかにすることによって、有用なキチン分解産物の調製に本キチナーゼを利用可能であると予測している。

今後、キチナーゼ発現制御に関与している調節遺伝子の解析及びその発現を誘導するシグナル物質の同定を行うことで、細菌におけるキチン分解機構がより明らかになると期待している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 荒 木 義 雄
副 査 教 授 高 木 信 夫
副 査 教 授 坂 入 信 夫
副 査 助 教 授 奥 山 英 登 志

学 位 論 文 題 名

Characterization of chitinases excreted by *Bacillus cereus* CH and cloning of their genes

(*Bacillus cereus* CH が分泌するキチナーゼとその遺伝子の特定)

キチンは N-アセチルグルコサミンが β -1,4-結合した天然に存在する多糖で、その年間生産量はセルロースに次いで多く、重要なバイオマス資源の一つである。これらのバイオマス資源の活用には、強い作用性を有する分解酵素の開発が不可欠である。実際に、各種の起源由来のキチナーゼが多数報告されている。しかし、いずれの場合においても水不溶性キチンに対する資化性は不十分で、粗キチン質への利用には至っていない。本研究はキチン質の高効率的な資化を最終目標としているが、申請者の研究は、キチンから有用なオリゴ糖を調製するために適したキチン分解酵素の開発を目指し、土壌から分離した *B. cereus* CH が分泌する 4 種のキチナーゼの精製とこれらの酵素をコードする遺伝子のクローニングを検討した。

まず、*B. cereus* CH が分泌する 4 種のキチナーゼを各種のクロマトグラフ操作により、単一までに精製し、それらのアミノ末端配列を決定し、その配列に基づいてオリゴヌクレオチドプローブを作成し、それらの酵素タンパク質をコードする遺伝子をクローニングすることに成功した。これら 4 種の酵素は基質特異性及びアミノ末端配列の類似性から A 群と B 群に大別され、後者の酵素は前者の酵素よりも強い糖転移活性を示すことが判明した。この特性は、より長い糖鎖のオリゴ糖を調製するために好都合な性質である。また、これらの酵素による各種の基質分解反応における生成物を詳細に検討している。

さらに、クローニングした遺伝子の DNA 配列を決定し、360 残基のアミノ酸をコードする ORF(*chiA*)と 676 残基のアミノ酸をコードする ORF(*chiB*)を特定した。データベースの検索から、前者は分泌シグナル配列と触媒機能性ドメイ

ンのみから構成されており、後者はさらにタイプⅢ型フィブロネクチン様ドメイン及びセルロース結合性ドメインと相同性を示す領域の存在を推定した。このようなドメイン構成の違いは両酵素群の機能性の差に反映され、B群キチナーゼは不溶性基質に対して、また、A群キチナーゼは水溶性基質に対して作用すると推定している。

加えて、両遺伝子が大腸菌で発現させ、生産された組換え型酵素分子を分離・精製し、これらの組換え型酵素が対応する *B. cereus* CH の酵素と分子サイズや酵素反応特性などの点で完全に一致することを確認している。また、これらの組換え型酵素を利用して、キチン・セルロースなどの水不溶性基質との結合能を検討し、セルロース結合ドメインを有するB群キチナーゼの高い結合能を確認している。従って、生態環境下においては、特性の異なる複数のキチナーゼが協同的に機能して、自然界に存在するキチン質を効率的に分解し、これらの酵素を生産している細菌の細胞増殖のために必要な炭素源・窒素源・エネルギー源を供給していると予測される。さらに、キチナーゼ活性を保有していない周辺に存在する微生物に資化可能な糖質を提供し、自然界で大量に生産されているキチン質に含まれる炭素・窒素のリサイクル経路を形成しているものと予測される。

これらの研究成果を踏まえて、今後、両酵素群の相互関連性及びそれらの遺伝子の転写発現制御機構の解析を行うことで、より有用なキチン分解酵素の開発につながるものと期待できる。このような分解酵素の開発は未利用資源の有効利用に寄与するものと思われる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。