

学位論文題名

A study on the chitinase production of *Bacillus cereus* CH  
for efficient degradation of decapod shells

(エビ・カニ類殻の効率的な分解に向けた

*Bacillus cereus* CH 由来キチナーゼ生産に関する研究)

学位論文内容の要旨

資源循環型社会を実現するためにさまざまな産業において地球環境への配慮が強く望まれている。水産統計などによると、我が国は世界有数のエビ・カニ類の多量消費国であり、必然的にそれらの殻を多量に排出している。しかし、エビ・カニ類殻の再利用率は 1.3-1.9%と極めて低く、生物由来の資源（バイオマス）を有効に利用しているとは言い難い。海洋性細菌などが分泌生産するキチナーゼはエビ・カニ類殻の主骨格であるキチンを常温・常圧で分解し、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) オリゴマーを生成する活性を有する。それゆえに、キチナーゼを用いた地球環境低負荷型のエビ・カニ殻再利用技術の開発は重要である。土壌から単離した *B. cereus* CH は 2 種類のキチナーゼ (ChiA, ChiB) を細胞外に分泌する。既にキチナーゼをコードする 2 つの遺伝子 (*chiA*, *chiB*) がクローニングされその塩基配列も決定されている。本研究では、構造の異なる誘導物質が *B. cereus* CH キチナーゼの生産および遺伝子発現へ及ぼす影響を比較することによって、*B. cereus* CH キチナーゼ遺伝子発現調節機構について解析することを主な目的とした。

第一章では本研究の意義について述べた。まずエビ・カニ類殻再利用の視点からキチナーゼについて概論した。また予備的に *B. cereus* CH 培養液を用いてエビ・カニ類殻の直接分解実験を行い、実際に殻の骨格が分解されオリゴ糖が生成することを確認した。

第二章では、各種誘導物質存在下における本菌の定常期以降のキチナーゼ活性量、キチナーゼ遺伝子 (*chiA*, *chiB*) の相対的な転写量、および特異的な抗血清を用いた ChiA, ChiB タンパク質量の測定を行った。GlcNAc オリゴマーを誘導物質として用いた場合 8 時間後に最大の活性値を示した。また GlcNAc 二量体から四量体まで鎖長が長くなるに従って誘導活性は順に上昇したが四量体と六量体では同等であった。これは細胞膜あるいは細胞質に局在することが予想されるセンサータンパク質の誘導物質結合部位の大きさを反映していると考えられる。一方、コロイダルキチンを誘導物質として用いた場合には 48 時間にわたり緩慢かつ持続的なキチナーゼ活性の上昇が観察された。これは誘導生産された酵素がコロイダルキチンを分解し、その分解産物である GlcNAc オリゴマー

が再び誘導物質として機能しているためであると説明できる。いずれの誘導物質においても12時間後には *chiA* および *chiB* mRNAs の発現は一定量に達していた。続いて、大腸菌で発現および精製した ChiA および ChiB 組換えタンパク質に対する特異的な抗体（ウサギ抗血清）を作製し、ELISA 法によって ChiA および ChiB タンパク質量を測定した。その結果、細胞内および細胞外の画分において ChiB が主要成分であることが明らかとなり、本菌の高いキチナーゼ活性は細胞内外共に ChiB の生産量に強く依存していることが示された。また ChiB は N 末端部分に典型的な分泌シグナル配列を有していたので Sec-ATPase の阻害剤として知られるアジ化ナトリウムを培地に添加した。その結果、ChiB の分泌量が極端に低下したことから、キチナーゼの分泌に Sec system が寄与している可能性が示唆された。

第三章では ChiB の誘導生産機構をさらに詳しく理解するために、鎖長の異なる GlcNAc を誘導物質として用いた際の 12 時間後までの ChiB の分泌生産レベルおよび *chiB* mRNA の発現レベルを調べた。その結果、GlcNAc の長さが四量体から六量体へと増加するに従って ChiB の分泌生産が促進された。また二量体では ChiB の生産はほとんど誘導されなかった。一方、GlcN を用いた実験では長さの効果の違いは認められたものの誘導物質としての作用は GlcNAc に比べて極めて低かった。さらにキチンを脱アセチル化したキトサン 7B と 9B を比較したところアセチル化度の高い 7B の方が高い ChiB 生産性が認められた。以上の結果から酵素と同様にレセプタータンパク質も基質である誘導物質の構造を厳密に認識していることが示された。グラム陰性細菌 *Vibrio* において既にキチナーゼ遺伝子の発現誘導にセンサーキチナーゼおよびレスポンスレギュレータータンパク質から構成される二分子制御系の関与が示されている。そこでその阻害剤であるサリチルアニリドを用いて *chiB* の転写量 (mRNA) および ChiB の生産量を調べた。その結果、*chiB* mRNA の発現および細胞内外の ChiB の生産は、クロサンテールやテトラクロロサリチルアニリドによって顕著に抑制された。すなわちグラム陽性細菌 *B. cereus* においてもキチナーゼ遺伝子の発現を制御する二分子制御系が存在することが強く示唆された。実際、既にゲノム解読が終了している *B. cereus* には GlcNAc を認識すると推定されるセンサータンパク質が 6 個見出された。

第四章では本研究で得られた知見について総括すると共に今後の展望について述べた。キチナーゼ高生産株である *B. cereus* CH の遺伝子発現調節機構について詳細な検討を加えた本研究はエビ・カニ殻の再利用技術を開発するうえにおいて重要な知見を与えるものである。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 森川正章  
副査 教授 坂入信夫  
副査 助教授 奥山英登志  
副査 名誉教授 荒木義雄

学位論文題名

## A study on the chitinase production of *Bacillus cereus* CH for efficient degradation of decapod shells

(エビ・カニ類殻の効率的な分解に向けた

*Bacillus cereus* CH 由来キチナーゼ生産に関する研究)

資源循環型社会を実現するために、さまざまな産業において地球環境への配慮が強く望まれている。水産統計などによると、我が国は世界有数のエビ・カニ類の多量消費国であり、必然的にそれらの殻を多量に排出している。しかし、エビ・カニ類殻の再利用率は1.3-1.9%と極めて低く、生物由来の資源（バイオマス）を有効に利用しているとは言い難い。海洋性細菌などが分泌生産するキチナーゼは、エビ・カニ類殻の主骨格であるキチンを常温・常圧で分解し、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を生成する活性を有する。それゆえに、キチナーゼを用いた地球環境低負荷型のエビ・カニ殻再利用技術の開発は重要である。土壌から単離した *B. cereus* CH は2種類のキチナーゼ (ChiA, ChiB) を細胞外に分泌する。既にキチナーゼをコードする2つの遺伝子 (*chiA*, *chiB*) がクローニングされその塩基配列も決定されている。本研究では、構造の異なる誘導物質が *B. cereus* CH キチナーゼの生産および遺伝子発現へ及ぼす影響を比較することによって、*B. cereus* CH キチナーゼ遺伝子発現調節機構について解析することを主な目的としている。

初めに、各種誘導物質存在下における本菌の定常期以降のキチナーゼ活性量、キチナーゼ遺伝子 (*chiA*, *chiB*) の相対的な転写量、および特異的な抗血清を用いた ChiA, ChiB タンパク質量の測定を行っている。その結果 GlcNAc オリゴマーを誘導物質として用いた場合8時間後に最大の活性値を示すことが示された。また GlcNAc 二量体から四量体まで鎖長が長くなるに従って誘導活性は順に上昇したが四量体と六量体では大差がないことを明らかにした。これは細胞膜あるいは細胞質に局在することが予想される、センサータンパク質の誘導物質結合部位の大きさを反映していると考えられる。一方、コロイダルキチンを誘導物質として用いた場合には、48時間にわたり緩慢かつ持続的なキチナー

ゼ活性の上昇が観察された。これは、誘導生産された酵素がコロイダルキチンを分解し、その分解産物が再び誘導物質として機能しているためと推定できる。またいずれの誘導物質においても 12 時間後には *chiA* および *chiB* mRNAs の発現は一定量に達していることを示している。続いて、大腸菌で発現および精製した ChiA および ChiB 組換えタンパク質に対する特異的な抗体(ウサギ抗血清)を作製し、ELISA 法によって ChiA および ChiB タンパク質量を測定している。その結果に基づき、細胞内および細胞外の画分において ChiB が主要成分であることすなわち、本菌の高いキチナーゼ活性が細胞内外共に ChiB の生産量に強く依存していることを示している。また ChiB は、N 末端部分に典型的な分泌シグナル配列を有していたので、Sec-ATPase の阻害剤として知られるアジ化ナトリウムによる効果を調べている。その結果は ChiB の分泌に Sec system が寄与している可能性を強く示唆するものであった。

さらに ChiB の誘導生産機構をさらに詳しく理解するために、鎖長の異なる GlcNAc を誘導物質として用いた際の 12 時間後までの ChiB の分泌生産レベル、および *chiB* mRNA の発現レベルを調べている。その結果、GlcNAc の長さが四量体から六量体へと増加するに従って、ChiB の分泌生産が促進された。また、二量体では ChiB の生産はほとんど誘導されなかった。一方、GlcN を用いた研究では長さの効果の違いは認められたものの、誘導物質としての作用は GlcNAc に比べて極めて低かった。以上の結果を踏まえて酵素と同様に、レセプタータンパク質も基質である誘導物質の構造を厳密に認識していることを提案している。グラム陰性細菌 *Vibrio* において既にキチナーゼ遺伝子の発現誘導にセンサーおよびレスポンスレギュレータータンパク質から構成される二成分制御系の関与が報告されている。そこでその阻害剤であるサリチルアニリドを用いて、*chiB* の転写量(mRNA)および ChiB の生産量を調べている。その結果、*chiB* mRNA の発現および細胞内外の ChiB の生産は、クロサンテールやテトラクロロサリチルアニリドによって顕著に抑制された。すなわち、グラム陽性細菌 *B. cereus* CH においてもキチナーゼ遺伝子の発現を制御する二成分制御系が存在することを強く示唆した。実際、既にゲノム解読が終了している *B. cereus* から、(GlcNA)<sub>n</sub> を認識すると推定されるセンサータンパク質を 6 個見出しこの仮説の裏付けを行っている。

これらの成果から本研究は *B. cereus* CH のキチナーゼ生産機構に関する新たな知見を与え、エビ・カニ類殻の効率的な分解に向けた基礎的に重要な知見を与えたと判断できる。審査員一同は、これらの成果を評価するとともに、申請者の研究者としての誠実かつ熱心な研究態度および大学院博士課程における研鑽や単位の修得状況なども合わせて考慮し、申請者が博士(地球環境科学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。