



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

海洋細菌の生産するキチン分解関連酵素に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大石, 一男 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2566

氏名(国籍)	大石一男(静岡県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第225号
学位授与年月日	平成13年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学位論文題目	海洋細菌の生産するキチン分解関連酵素に関する研究
審査委員	主査 静岡大学教授 衛藤英男 副査 静岡大学教授 渡邊修治 副査 岐阜大学教授 木曾眞 副査 信州大学教授 只左弘治

論文の内容の要旨

浜名湖より分離した海洋細菌、*Vibrio alginolyticus* H-8 株はキチナーゼ活性が強く、その培養液中にデアセチラーゼ活性が認められた。これらのことから、本菌は他のキチナーゼ生産菌とは異なるキチン分解系を有することが予想された。そこで、*V. alginolyticus* H-8 株の生産するキチン分解に関連する酵素系とその役割を解明する目的で、この株の生産するキチナーゼおよびデアセチラーゼ等の酵素の精製および遺伝子のクローニングと遺伝子配列の解析を行った。

H-8 株の培養液より、81 kDa の C1 および 68 kDa のキチナーゼ C3 を単離してその性質を明らかにした。さらに、クローニングしたキチナーゼ B の推定分子量は 90 kDa で、キチナーゼ B 遺伝子は触媒ドメインであるキチナーゼの共通保存領域とキチン吸着ドメインを有していた。キチンアフィニティクロマトグラフィーによりキチナーゼ A (110 kDa)、キチナーゼ B (90 kDa)、キチナーゼ D (65 kDa) およびキチナーゼ E (45 kDa) の 4 種のキチナーゼを検出した。キチナーゼ E はキチン吸着能を有する菌体内キチナーゼであった。キチナーゼ C1 の N 末端配列はキチナーゼ B 遺伝子とは相同性がないことから B 以外のキチナーゼから派生したか、あるいは、キチン吸着部位のない遺伝子からの産物ではないかと考えられた。以上のことから、H-8 株は 6 種類のキチナーゼによりキチンを分解すると推定した。

また、H-8 株の培養液より、 $(\text{GlcNAc})_2$ を特異的にデアセチル化する DA1, DA2 の 2 種のデアセチラーゼを単離した。DA1 の分子量は 48 kDa、等電点は 3.3、至適 pH は 8.5-9.0、至適温度は 45 °C であった。DA2 の分子量は 46 kDa、等電点は 3.5、至適 pH は 8.0-8.5、至適温度は 40 °C であった。DA1 は $(\text{GlcNAc})_2$ の還元末端側の 2-アセトアミド

基を加水分解する新規な酵素であることを明らかにした。次に、TLC法でスクリーニングを行い、デアセチラーゼをコードする遺伝子を取得した。塩基配列から推定分子量は44.7 kDaであった。N末端側は他のデアセチラーゼと相同性が有り、重要な働きをするドメインと考えられた。C末端側は *Bacillus circulans* WL-12 のキチン吸着ドメインであるC末端側と相同性があったがキチン吸着能はなかったのでその働きは不明である。デアセチラーゼ活性は *V. alginolyticus* IFO 15630 と *V. alginolyticus* の類縁菌である *V. parahaemolyticus* IFO 12711 のみに認められた。

さらに、N-アセチルグルコサミニダーゼの分子量は75 kDaで (GlcNAc)₂ の脱アセチル化によって生成するN-モノアセチルキトピオースを GlcNAc と GlcN に分解した。

本研究により、*V. alginolyticus* H-8 株は菌体外に A, B, C1, C3, D と菌体内に E の6種類のキチナーゼを生産することによりキチンを (GlcNAc)₂ に分解し、菌体外デアセチラーゼによりN-モノアセチルキトピオースに変換してから菌体内に取り込む新規なキチン資化経路を有する海洋細菌であることが推定された。

審 査 結 果 の 要 旨

平成13年1月30日(火)に、静岡大学農学部において審査員を含む関連教官、学生の出席のもと、大石一男氏の博士論文の公開発表会が行われ、引き続き質議応答が行われた。

大石一男氏の博士論文は、浜名湖より分離した海洋細菌、*Vibrio alginolyticus* H-8 株がキチナーゼ活性が強く、他のキチナーゼ生産菌とは異なるキチン分解系を有することが予想されたため、その菌の生産するキチン分解に関連する酵素系とその役割を解明する目的で、この株の生産するキチナーゼおよびデアセチラーゼ等の酵素の精製および遺伝子のクローニングと遺伝子配列の解析を行ったものである。

H-8 株の培養液より、キチナーゼ C1 および C3 を単離しその性質を明らかにした。さらに、クローニングしたキチナーゼ B 遺伝子は触媒ドメインであるキチナーゼの共通保存領域とキチン吸着ドメインを有していることと、キチナーゼ A (110 kDa)、キチナーゼ B (90 kDa)、キチナーゼ D (65 kDa) およびキチナーゼ E (45 kDa) の4種のキチナーゼを検出した。キチナーゼ E はキチン吸着能を有する菌体内キチナーゼであった。キチナーゼ C1 のN末端配列はキチナーゼ B 遺伝子とは相同性がないことから B 以外のキチナーゼから派生したか、あるいは、キチン吸着部位のない遺伝子からの産物ではないかと考えられた。以上のことから、H-8 株は6種類のキチナーゼによりキチンを分解すると推定した。また、(GlcNAc)₂ を特異的にデアセチル化する DA1, DA2 の2種のデアセチラーゼを単離した。DA1 は (GlcNAc)₂ の還元末端側の2-アセトアミド基を加水分解する新規な酵素であることを明らかにした。次に、デアセチラーゼをコードする遺伝子を取得した。N末端側は他のデアセチラーゼと相同性が有り、重要な働きをするドメインと考えられた。C末端側は *Bacillus circulans* WL-12 のキチン吸着ドメインで

あるC末端側と相同性があったがキチン吸着能はなかったなのでその働きは不明である。デアセチラーゼ活性は *V. alginolyticus* IFO 15630 と *V. alginolyticus* の類縁菌である *V. parahaemolyticus* IFO 12711 のみに認められた。さらに、*N*-アセチルグルコサミニダーゼの分子量は 75 kDa で (GlcNAc)₂ の脱アセチル化によって生成する *N*-モノアセチルキトビオースを GlcNAc と GlcN に分解することを明らかにした。

本研究により、*V. alginolyticus* H-8 株は菌体外に A, B, C1, C3, D と菌体内に E の6種類のキチナーゼを生産することによりキチンを (GlcNAc)₂ に分解し、菌体外デアセチラーゼにより *N*-モノアセチルキトビオースに変換してから菌体内に取り込む新規なキチン資化経路を有する海洋細菌であることを推定した。

以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

「基礎となる学術論文」

1. Purification and properties of β -*N*-acetylglucosaminidase from *Vibrio alginolyticus* H-8.
Ohishi, K., Murase, K. and Etoh, H., *J. Biosci. Bioeng.*, **88** (1), 98-99 (1999).
2. Cloning and sequencing of a chitinase gene from *Vibrio alginolyticus* H-8..
Ohishi, K., Murase, K., Ohta, T. and Etoh, H., *J. Biosci. Bioeng.*, **89** (5), 501-505 (2000).
3. Cloning and sequencing of the deacetylase gene from *Vibrio alginolyticus* H-8.
Ohishi, K., Murase, K., Ohta, T. and Etoh, H., *J. Biosci. Bioeng.*, **90** (5), 561-563 (2000).