

氏 名	たなか たけし 田 中 丈 士
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2172 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 合 成 ・ 生 物 化 学 専 攻
学位論文題目	Studies on Enzymes for Degradation of Chitin and Other β -1,4-Saccharides, from the Hyperthermophilic Archaeon <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 (超好熱始原菌 <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 由来キチン分解酵素及び β -1,4 糖質分解酵素に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 今 中 忠 行 教 授 田 中 渥 夫 教 授 木 村 俊 作

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、超好熱始原菌由来の耐熱性 β -1,4 糖質加水分解酵素の遺伝子クローニングと酵素学的性質の決定に加え、新規キチン代謝経路についてまとめたものであり、序論、本論4章、結論からなっている。

序論では、地球上最大のバイオマスであるセルロースやキチンの特徴や資源としての重要性、これらバイオマス利用の際における耐熱性 β -1,4 糖質分解酵素の重要性、また、超好熱始原菌における β -1,4 糖質分解酵素についての研究の現状等がまとめられている。

第1章は超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 由来 β -glycosidase (*Tk*-Gly) の遺伝子クローニング及び酵素学的性質についてまとめたものである。*Tk*-Gly の推定一次構造は *Pyrococcus furiosus* 由来の β -mannosidase と β -glucosidase の中間的な構造であった。組換え *Tk*-Gly の反応至適温度は 100°C と非常に高く優れた耐熱性を示した。基質特異性を調べた所、本酵素は幅広い基質特異性を有し、特に β -glucoside 結合、 β -mannoside 結合に対しては同等の触媒効率 (k_{cat}/K_m 値) を示すという特異な酵素である事を明らかにした。

第2章は *T. kodakaraensis* KOD1 由来 chitinase (*Tk*-ChiA) の遺伝子解析と酵素学的性質についてまとめたものである。*Tk*-ChiA は推定アミノ酸配列から1分子内に2つのキチナーゼ触媒ドメインと3つの基質結合ドメイン (ChBD) が存在するというこれまでにない独特の構造をしている事が示された。大腸菌の組換え *Tk*-ChiA の反応至適温度は 85°C であり、キチンオリゴ糖やコロイダルキチンを基質とした際の主な最終産物は GlcNAc₂ であった。様々な欠失酵素の性質を解析した結果、2つのキチナーゼ相同領域は各々単独でもキチナーゼとして機能し得る事や、中央2つの ChBD は実際にキチンへの結合に必要でありコロイダルキチン分解活性に大きな影響を与える事を明らかにした。これは始原菌で初めてキチナーゼの遺伝子クローニング及び酵素的性質を決定したものである。

第3章では *Tk*-ChiA の2つのキチナーゼ触媒ドメインに焦点を絞り研究が進められている。触媒ドメインのみからなる欠失変異体 ChiA Δ 5 と ChiA Δ 4 はキチンに同時に作用させると相乗効果が認められた事から、異なる切断様式を有していると推測された。キチンオリゴ糖やコロイダルキチン等の分解物の解析から、ChiA Δ 5 はエキソ型のキチナーゼであり、ChiA Δ 4 はエンド型のキチナーゼである事を明らかにした。ターンオーバー数は ChiA Δ 4 より ChiA Δ 5 の方が高く、エンド型の ChiA Δ 4 がキチン鎖の末端数を増やし、その末端をエキソ型の ChiA Δ 5 が効率よく分解する事により相乗効果が生じると推測された。即ち *Tk*-ChiA は同一分子中に異なる切断様式の触媒ドメインと基質結合ドメインを有する事で局所的に基質濃度を増加させ、キチンの分解を効率よく行っていると考えられた。これらの結果から *Tk*-ChiA が特異なドメイン構造を有する生理的意義が示唆された。

第4章では KOD1 株で新規キチン分解関連酵素を探索し exo- β -D-glucosaminidase (GlcNase) の存在を明らかにしている。*Tk*-ChiA によるキチン分解最終産物である GlcNAc₂ の分解活性を指標に KOD1 細胞から精製を行い、対応する遺

伝子を KOD1 ゲノム中に同定した。しかし、大腸菌の組換え体は予想に反し GlcNAc₂ は分解せず脱アセチル化された GlcN₂ を分解する GlcNase である事を明らかにした (*Tk-Glm*)。これは始原菌だけでなく全ての生物で GlcNase 遺伝子の 1 次構造を明らかにした初めての報告である。*Tk-Glm* の反応至適温度は 80°C であった。以上の結果は、KOD1 株においては *Tk-ChiA* がキチンを GlcNAc₂ にまで分解した後、脱アセチル反応により生じる GlcN₂ を *Tk-Glm* が単糖に分解するというこれまでに報告例のない新規キチン代謝経路と考えられた。

結論では本論文で得られた成果について要約している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、地球上最大のバイオマスであるセルロースとキチンを利用する上で有用である超好熱始原菌由来耐熱性 β -1,4 糖質分解酵素の遺伝子クローニングと酵素学的性質の検討に加え、新規キチン代謝経路について報告したものであり、得られた主な成果は次の通りである。

1. 超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 由来の β -glycosidase は幅広い基質特異性を有し、特に β -glucoside, β -mannoside 結合に対し同等の k_{cat}/K_m 値を示す特異な酵素である事を明らかにした。

2. KOD1 株由来 chitinase (*Tk-ChiA*) は 1 分子内に 2 つのキチナーゼ触媒ドメインと 3 つの基質結合ドメイン (ChBD) を有するという独特の構造を見いだした。2 つの触媒ドメインは異なる切断様式を有し、これらがキチンを相乗的に分解する事や、ChBD がキチン分解に正的作用を及ぼす事などを明らかにし、*Tk-ChiA* の特異なドメイン構造の生理的意義を示した。これは始原菌の chitinase で初めてクローニング及び酵素学的性質の解析が行われたものである。

3. KOD1 株で *Tk-ChiA* 以降のキチン分解関連酵素を探索し、exo- β -D-glucosaminidase (*Tk-Glm*) を同定した。これは始原菌のみならず全ての生物で exo- β -D-glucosaminidase 遺伝子の構造を明らかにした最初の報告である。これらの結果は、KOD1 株では *Tk-ChiA* がキチンを二糖にまで分解した後、脱アセチル反応により生じるキトサンの二糖を *Tk-Glm* が単糖に分解するという新規代謝経路を示唆している。

4. 本論文で扱われた KOD1 株由来の酵素は全て高い熱安定性を有し産業上も有用である事を示した。

以上、本論文は、バイオマスであるセルロースやキチンを利用する上で重要である超好熱始原菌由来の耐熱性 β -1,4 糖質分解酵素の遺伝子クローニング及び酵素学的性質の検討を行い、特に始原菌のキチン分解関連酵素とキチン代謝経路を初めて明らかにしたものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 14 年 2 月 20 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。