

|           |                                  |
|-----------|----------------------------------|
| 氏 名       | 吉 田 清 司                          |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (農 学)                        |
| 学 位 記 番 号 | 論 農 博 第 2245 号                   |
| 学位授与の日付   | 平 成 11 年 5 月 24 日                |
| 学位授与の要件   | 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当          |
| 学位論文題目    | グアガム分解酵素遺伝子のクローニングと大腸菌での発現に関する研究 |

論文調査委員 (主 査) 教 授 木 村 光 教 授 内 田 有 恆 教 授 江 崎 信 芳

## 論 文 内 容 の 要 旨

グアガムはインドやパキスタンなどの南アジアで主に栽培される豆科植物の実の胚乳部から得られる多糖である。グアガム分解菌から得られるグアガム分解酵素はマンナナーゼ類に属するが、その使用量、利用分野ともに決して多いとは言えない。グアガム分解酵素を含むマンナナーゼが工業的に多用されるためには、各種マンナン類の用途開拓とともに、各種マンナナーゼの発見とその諸性質の解明、酵素の大量生産技術の確立などが必要とされる。筆者はグアガム分解菌を自然界よりスクリーニングし、*Bacillus circulans* と同定される 1 菌株を取得して、その酵素生産、酵素の諸性質、遺伝子のクローニングを行い、この遺伝子を大腸菌に導入することによって、グアガム分解酵素を野生株に比べて大幅に増産することに成功した。本論文の主な内容は以下の通りである。

### 第一章 序論

### 第二章 グアガム分解菌の分離同定および諸性質

グアガム分解菌を土壌から単離し、同定の結果、*B. circulans* であることを明らかにした。*B. circulans* の標準株を用いてグアガム分解の比較検討を行った結果、今回単離した菌株による分解活性は標準株より 21.5 倍以上大きいことを示した。

### 第三章 *B. circulans* K-1 株による酵素生産条件

本菌がグアガムを基質とする培養液中にグアガム分解酵素を分泌することを明らかにした。本酵素の産生条件を検討した結果、生育の至適条件と同様に、30℃、中性付近が最も良好であることを示した。しかしながら、グアガムを添加しても、D-フルクトースや D-グルコースなどの単糖、D-セロビオース、ラクトース、マルトース、D-トレハロースなどの 2 糖が存在すると、酵素の生産が抑制されることを明らかにした。一方、グアガム含有培地にカザミノ酸、ペプトン、酵母エキスなどの窒素源を添加すると、酵素の生産量は 1.3 ～ 2.3 倍に増加することを示した。

### 第四章 グアガム分解酵素の精製と性質

精製酵素の分子量は SDS・PAGE によって約 62,000 であること、酵素活性は pH 6.8、温度 59 ～ 64℃ の条件で最も高くなることを示した。本酵素はグアガムに対するよりも、コンニャクマンナンやローカストビーンガムに対して、より高い活性を示し、化学構造的に分岐の少ない直鎖型マンナンに強く作用することを明らかにした。精製酵素を PAS 染色すると陽性となり、また、炭水化物を分析すると N-アセチルダルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、キシロース、マンノース、フコース、ガラクトースなどの糖が検出されることを示した。

### 第五章 グアガム分解酵素遺伝子のクローニングと発現

ゲノムウォーキング法によりグアガム分解酵素遺伝子のクローニングを行い、得られた遺伝子を解析した結果、1,551 塩基からなる ORF が存在し、アミノ酸配列から推定される遺伝子産物の分子量は 55,000 であることを示した。この分子量は精製酵素の分子量 (62,000) と約 11% の違いを示す結果となったが、これは精製酵素が糖による修飾を受けていることに起因するものと推定した。これらの結果より、本遺伝子が *B. circulans* K-1 株のグアガム分解酵素遺伝子であることを明らかにした。本酵素遺伝子のホモロジー検索を行った結果、*Caldocellum saccharolyticum* のマンナナーゼ、*Streptomyces lividans* のマンナナーゼ、および *Bacillus* sp. のマンナナーゼと部分的に相同性を示すことを明らかにした。本遺伝子のシグナルペプ

チドを除いた部分を pUC 19 の lac プロモーター下流に連結し、大腸菌 JM 109 株中で発現させた。その結果、大腸菌の菌体内にグアガム分解酵素活性を認めた。組み換え大腸菌を培養して得られる菌体からの総活性は *B. circulans* K-1 株を培養して得られる活性 (600 U) の 9 倍 (5,400 U) に達することを明らかにした。

### 論文審査の結果の要旨

微生物から得られる酵素が触媒として科学の進歩や産業利用に貢献している。本論文では天然の水溶性多糖グアガムの用途開発に関連して、グアガムを分解する微生物 *Bacillus circlans* を土壌から単離し、本菌および本菌が生産するグアガム分解酵素の諸性質を解析した。また、本菌のグアガム分解酵素遺伝子を同定し、これを大腸菌に形質転換することによって同酵素の大量生産を可能にした。評価すべき点は以下の通りである。

1. グアガムを強力に分解する細菌 *B. circulans* K-1 株を土壌から探索、単離した。
2. 本菌のグアガム分解酵素活性は標準株に比べ、21.5 倍以上大きいことを明らかにした。
3. 酵素によるグアガムの分解は endo 型であることを明らかにした。
4. 本菌はグアガムを基質とする培養液中にグアガム分解酵素を分泌するが、D-フルクトースや D-グルコースなどの単糖、D-セロビオース、ラクトース、マルトース、D-トレハロースなどの 2 糖が存在すると、酵素の生産が抑制されることを明らかにした。
5. グアガム含有培地にカザミノ酸、ペプトン、酵母エキスなどの窒素源を添加すると、酵素の生産は 1.3 ~ 2.3 倍に増加すること、また、添加したグアガム量と酵素生産量が比例することを示した。
6. 精製酵素の分子量は約 62,000 であること、酵素の PAS 染色は陽性を示し、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、キシロース、マンノース、フコース、ガラクトースなどの糖が検出されることを示した。
7. グアガム分解酵素遺伝子は 1,551 塩基からなり、分子量は 55,000 であることを明らかにした。また、この遺伝子で形質転換した大腸菌から得たグアガム分解酵素の PAS 染色は *B. circulans* K-1 のそれと同様、陽性を示し、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、キシロース、マンノース、ガラクトース、グルコースなどの糖が検出されることを明らかにした。
8. 本酵素遺伝子のホモロジー検索を行った結果、*Caldocellum scaccharolyticum* のマンナナーゼ、*Streptomyces lividans* のマンナナーゼ、および *Bacillus* sp. のマンナナーゼと部分的に相同性を示すことを明らかにした。
9. 組み換え大腸菌の培養菌体から得られるグアガム分解酵素の総活性は *B. circulans* K-1 菌体からの活性 (600 U) の 9 倍 (5,400 U) に達することを明らかにした。
10. 単離した微生物および酵素は土木分野および化粧品分野に実用できることを示した。

以上のように、本論文は微生物酵素遺伝子資源を発掘すると共にこの遺伝子を分子生物学レベルで解析することにより、酵素生産を高め、酵素生産のための基礎研究と工業への応用研究を纏めたものであり、応用微生物学、分子生物学などの発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、平成 11 年 2 月 25 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。