

氏 名 田 原 直 樹
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学 位 記 番 号 論 農 博 第 2201 号
 学位授与の日付 平成 10 年 7 月 23 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 STUDIES ON CELLULASES IN A CELLULOSE-PRODUCING
 BACTERIUM, *ACETOBACTER XYLINUM*
 (セルロース生産菌 *Acetobacter xylinum* のセルラーゼに関する研究)
 (主査)
 論文調査委員 教授 栗原正章 教授 酒井富久美 教授 熊谷英彦

論 文 内 容 の 要 旨

酢酸菌の一種である *Acetobacter xylinum* は細胞外に著量のセルロースを生成する。このセルロース (バクテリアセルロース, 以下 BC) は, その特異的な構造, 物性を持つことから, 新しい素材としてさまざまな工業分野への応用が期待されている。この BC の発酵生産におけるセルラーゼの応用や, 得られる BC の重合度とセルラーゼとの関係については, 過去にいくつかの研究がなされている。前者については, BC の生産に外来のセルラーゼ標品を少量添加することで, 生産速度の向上が認められるという報告がなされているが, セルラーゼ標品に含まれるどのコンポーネントがその生産速度向上の因子になっているのかについては不明であり, いくつかの混乱した推測がなされていた。また, 後者については, *A. xylinum* 自身がセルラーゼを分泌し, BC の重合度が経時的に低下するという報告がなされているが, 別のグループの報告ではこの結果を否定している。さらに, BC の重合度とその物性との関係については報告がない。このように, 外来セルラーゼと BC の生産性との関係および生産菌自身が分泌するセルラーゼと得られる BC の品質との関係について, まとまった研究がなされおらず, 統一された見解がなかった。本研究において著者は, 工業生産に適した *A. xylinum* subsp. *sacrofermentans* BPR2001 株の通気攪拌培養による BC の生産において, 外来セルラーゼの添加による生産速度向上因子の解明, および *A. xylinum* 自身が分泌するセルラーゼ活性の BC の重合度・機械的物性への影響を解明した。さらにその自己分泌セルラーゼ, *exo*-1,4- β -glucosidase と *endo*-1,4- β -glucanase の精製を行い, それらの反応機構を解析した。その主な内容は以下に示す通りである。

(1) *A. xylinum* BPR2001 株の通気攪拌培養における BC 生産において, *Bacillus subtilis* IFO3034 株由来の *endo*-1,4- β -glucanase の培養液への少量添加によりその生産性が増強された。この native enzyme と mutant enzyme (セルロース結合活性はあるが触媒活性はないもの) をそれぞれ用いて比較したところ前者に生産速度の向上が認められた。すなわち *endo*-1,4- β -glucanase のセルロース結合活性ではなく触媒活性がその因子であった。

(2) *A. xylinum* BPR2001 株の培養液中に, すでに報告されているカルボキシメチルセルロース (CMC) 分解活性 (CMCase) のみならず, セロトリオース (G3) 分解活性 (G3ase) も検出された。両セルラーゼ活性による BC の分解は検出できなかったが, その重合度を酵素反応的に低下させた。

(3) 通気攪拌培養におけるセルロース分解酵素活性と生産される BC の重合度との関係を解明を試みた。CMCase と G3ase の活性を抑制する培養条件 (pH 4) では BC の平均重量重合度は安定であったのに対し, 最大活性を示す培養条件 (pH 5) でのそれは低下した。前者の培養条件で得られた BC のシートの機械的強度は後者のそれより高かった。したがって, この 2 つのセルラーゼ活性が, 培養における BC の重合度ならびに機械的強度の劣化の原因であることが示された。

(4) この 2 つのセルラーゼ活性を精製し性質を調べた。G3ase は *A. xylinum* において新規の *exo*-1,4- β -glucosidase (EC. 3.2.1.74) であった。また, 本酵素のアミノ酸配列分析から, 本酵素の遺伝子は *A. xylinum* BPR2001 株のセルロース合成酵素オペロンの直下流に存在することが明らかとなった。さらに, 本酵素のサブサイト構造を反応速度論的に解析したと

ころ、Subsite 1 と 3 の親和力が高いのに対し、subsite 2 の親和力は負の値を示した。これは他のエキソ型グルコシダーゼにおいて報告のないサブサイト構造であった。一方、CMCase活性はendo-1,4- β -glucanase (EC 3.2.1.4) であり、過去に報告されている*A.xylinum* KU-1 株由来のendo-1,4- β -glucanaseと酵素学的に類似していた。N末端のアミノ酸配列分析から、本酵素の遺伝子は*A.xylinum* BPR2001株のセルロース合成酵素オペロンの上流に存在しており、これも過去の報告と一致していた。本酵素は、水溶性もしくは非晶セルロース基質に対するexo-1,4- β -glucosidaseの反応性を増強したことから、両酵素の相乗作用の存在が示唆された。

論文審査の結果の要旨

Acetobacter xylinum が生成するバクテリアセルロース (BC) は、その特異的な構造、物性を持つことから、新しい素材としてさまざまな工業分野への応用が期待されている。そのBCの工業的生産を考える上で、その生産性の向上や、品質の安定化は重要な課題である。本論文において著者は、BCの発酵生産とセルロース分解酵素であるセルラーゼとの関係に注目し、工業生産に適した*A.xylinum* subsp. *sacrofermentans* BPR2001株の通気攪拌培養によるBCの生産において、まず外因性セルラーゼの少量添加による生産性向上にかかわる因子を解明し、次に*A.xylinum* 自身が分泌するセルラーゼであるexo-1,4- β -glucosidaseとendo-1,4- β -glucanaseの精製ならびにそれらの反応機構の解析を行うとともに、これらセルラーゼのBCの重合度や機械的物性への影響について解析した。評価すべき点は以下のとおりである。

- (1) 外来セルラーゼの少量添加によるBCの生産速度向上はendo-1,4- β -glucanaseの触媒活性が担っていることを示した。
- (2) *A.xylinum* subsp. *sacrofermentans* BPR2001株が2種類のセルラーゼ活性をその培養液中に分泌しており、1つは既知のendo-1,4- β -glucanase (CMCase) であったが、もう一方は今まで*A.xylinum* において報告のないセロトリオース (G 3) 分解活性であることを示した。
- (3) CMCaseとG 3 aseはBCを分解することはできないが、その重合度を酵素反応的に低下させ、通気攪拌培養においても生産されるBCの重合度低下の原因であることを示した。さらに、BCの重合度低下はその機械的強度の劣化の原因であることも合わせて示した。
- (4) *A.xylinum* BPR2001株からG 3 aseとCMCaseをそれぞれ精製した。G 3 aseは*A.xylinum* で新規のexo-1,4- β -glucosidase (EC.3.2.1.74) であり、そのサブサイト構造は他のエキソ型グルコシダーゼにおいて報告のない構造であることを示した。一方、CMCaseはendo-1,4- β -glucanase (EC 3.2.1.4) であり、過去に報告されている*A.xylinum* KU-1 株由来のendo-1,4- β -glucanaseと酵素学的に類似していたが、本酵素は水溶性もしくは非晶セルロース基質に対するexo-1,4- β -glucosidaseの反応性を増強したことから、両酵素の相乗作用の存在を示唆した。

- (5) 精製されたexo-1,4- β -glucosidaseとendo-1,4- β -glucanaseのN末端アミノ酸配列分析から、前者の遺伝子がセルロース合成酵素オペロンの直下流に、後者のそれはセルロース合成酵素オペロンの上流にそれぞれ存在していることを示した。

以上のように、本論文は、*A.xylinum* によるBCの生産において、外因性endo-1,4- β -glucanaseの少量添加がその生産性の増強すること、ならびに二種類の内因性セルラーゼが生産されるBCが品質に影響を与えることを明確にすることで、BCの工業的生産における生産向上および品質の安定化に寄与する知見を示すと同時に、*A.xylinum* の内因性セルラーゼの1つであるexo-1,4- β -glucosidaseの発見とその新しい反応機構を解明した。さらにその2つの内因性セルラーゼとBCの生合成機構との関係に重要な手掛かりをあたえる知見も示した。したがって、本論文の応用微生物学、微生物生理学並びに微生物遺伝学の進展に貢献するところが大きい。

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10年6月11日、論文なら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。