

氏 名 やま の なお み 山 野 尚 子
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学 位 記 番 号 論 農 博 第 2297 号
 学位授与の日付 平 成 12 年 3 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 the enzymes for *N*-acetylglucosamine metabolism in marine bacteria
 (海洋細菌の *N*-アセチルグルコサミン代謝関連酵素に関する研究)

論文調査委員 (主 査)
 教 授 木 村 光 教 授 熊 谷 英 彦 教 授 柴 原 正 章

論 文 内 容 の 要 旨

キチンは *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が β -1, 4 結合により重合した難分解性多糖であり、自然界に最も多く存在するバイオマス資源の一つである。キチンはエビやカニといった甲殻類の外骨格や、プランクトンなどにも含まれているが、低栄養な海洋に棲息する海洋細菌にとってキチンは重要な炭素、かつ窒素源であり、とくに深海のような低温環境では、低温細菌や好冷細菌の酵素によって分解されていると考えられる。本論文では、海洋細菌の生産する GlcNAc 代謝関連酵素、とくに GlcNAc を脱アセチルする酵素に着目し、同酵素を分離精製し、酵素化学的性質を明らかにした。また、マリアナ海溝の深海水から海洋低温細菌を分離し、生息温度域の異なる海洋細菌の酵素化学的性質を比較し、分離した低温細菌の生産する酵素が高温域でも活性を持つことを明らかにした。さらに、海洋細菌の GlcNAc 代謝を遺伝子レベルで解明するために、遺伝子の単離、解析を行い、GlcNAc 代謝関連酵素遺伝子がオペロンを形成していることを明らかにした。本論文の主な内容は以下の通りである。

第 1 章 *Vibrio cholerae* non-O1 1148 A 株による GlcNAc デアセチラーゼの生産

Vibrio 属菌から高いキチン分解能を持つ *Vibrio cholerae* non-O1 1148 A 株を選択した。同菌はキチンを添加して培養すると、菌体外にキチナーゼを、菌体内に β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼと GlcNAc を脱アセチルする酵素を生産することを見いだした。部分精製酵素を用いて基質特異性を検討した結果、同酵素は、GlcNAc に作用するが、二から六量体のオリゴマーには作用しないことを明らかにした。

第 2 章 *Vibrio cholerae* non-O1 1148 A 株の生産する GlcNAc-6-リン酸デアセチラーゼの精製と諸性質

Vibrio cholerae non-O1 1148 A 株から GlcNAc を脱アセチルする酵素を精製した。同酵素は分子サイズ 45 kDa の同一サブユニットからなる四量体(180 kDa)であることが示唆された。本酵素の N 末端アミノ酸配列を 22 残基目まで決定したところ、そのうち 12 残基は *Escherichia coli* 由来の GlcNAc-6-リン酸デアセチラーゼのそれと一致した。本酵素は GlcNAc-6-リン酸の他に、GlcNAc や GlcNAc-6-硫酸には作用したが、*N*-アセチルキトオリゴ糖 [(GlcNAc)₂₋₆] や *N*-アセチルガラクトサミンには作用しなかった。本酵素の GlcNAc-6-リン酸に対する k_{cat}/K_m 値は、GlcNAc に対するそれよりもはるかに高いことから、*in vivo* では GlcNAc-6-リン酸デアセチラーゼとして機能していることが示唆された。

第 3 章 *V. cholerae* non-O1 1148 A 株の GlcNAc 代謝関連遺伝子のクローニング

V. cholerae non-O1 1148 A 株の GlcNAc-6-リン酸デアセチラーゼ (*nag*) の N 末端アミノ酸配列をもとに、本菌の *nagA* 遺伝子を含む 7.2 kb の *EcoRI* 断片を取得した。本断片中には 5 つの open reading frame (ORF) が含まれていた。ORF 1 は *nagA* 遺伝子 (378 アミノ酸) をコードしており、その推定 N 末端アミノ酸配列は精製酵素から決定した配列と一致した。本菌の NagA は、アミノ酸レベルで *E. coli*, *Haemophilus influenzae* (細菌), *Caenorhabditis elegans* (線虫) の NagA とそれぞれ 62%, 56%, 33% の相同性を示した。他の 4 つの ORF のホモロジー検索を行ったところ、ORF 2 は *E. coli* の NagC と 60%, ORF 4 は *E. coli* の NagE と 24%, *Vibrio furnissii* の NagE と 44% の相同性を示した。*V. cholerae*

non-O1 1148 A 株において GlcNAc 代謝に関連する酵素遺伝子が *nagE-nagAC* というオペロンを形成していることを明らかにした。しかしながら *E. coli* の場合とは異なり、*nagA* 遺伝子近傍に、*nagB*, *nagD* 遺伝子は存在しなかった。

第4章 海洋低温細菌 *Alteromonas* sp. Mct-9 株の生産する GlcNAc-6-リン酸デアセチラーゼの精製と性質

マリアナ海溝から採取した海水試料から、キチン分解能を持つ海洋低温細菌 Mct-9 株を分離し、諸性質から本菌株を *Alteromonas* 属の一菌株と同定した。同菌株から GlcNAc を脱アセチルする酵素を精製した。本酵素は分子サイズ 41 kDa のサブユニットからなる四量体であり、*E. coli* の GlcNAc-6-リン酸デアセチラーゼの分子サイズ、ならびにサブユニット構造とほぼ同じであった。本酵素は、GlcNAc-6-リン酸の他に GlcNAc, GlcNAc-6-硫酸にも作用したが、 k_{cat} や k_{cat}/K_m 値などの比較から、*in vivo* では GlcNAc-6-リン酸デアセチラーゼとして機能していると考えられた。本酵素は低温細菌由来酵素であるが、低温から高温までの広い温度範囲で作用した。低温細菌や好冷細菌の多くの酵素が熱に対して不安定である中で、同酵素の示す至適温度の結果は、同菌が工業的利用において有用な酵素を生産する可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

キチンは *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が β -1, 4 結合により重合した難分解性多糖であり、自然界に多く存在するバイオマス資源の一つである。海洋においては、カニ、エビ等甲殻類の外骨格、プランクトンなどに含まれており、それを分解する海洋細菌は物質循環に大きく寄与している。しかし、その機能の重要性に比べて、海洋細菌のキチン分解関連酵素や GlcNAc 代謝関連酵素に関する知見は少ない。本論文では、海洋細菌の生産する GlcNAc 代謝関連酵素、とくに GlcNAc を脱アセチルする酵素に着目し、同酵素を分離精製し、酵素化学的性質を明らかにした。また、海洋細菌の GlcNAc 代謝を遺伝子レベルで解明するために、遺伝子の単離、解析を行った。評価すべき点は以下の通りである。

1. 海洋細菌 *Vibrio cholerae* non-O1 から高いキチン分解能を持つ株、1148 A 株を選択し、同菌株が GlcNAc を脱アセチルする活性を有することを示した。

2. *V. cholerae* non-O1 148 A 株から同酵素を分離精製し、同酵素が GlcNAc, GlcNAc-6-リン酸, GlcNAc-6-硫酸に作用する GlcNAc-6-リン酸デアセチラーゼであることを示した。

3. *V. cholerae* non-O1 1148 A 株の GlcNAc-6-リン酸デアセチラーゼ遺伝子を含む遺伝子断片を取得、解析し、*V. cholerae* non-O1 1148 A 株において GlcNAc 代謝に関与する遺伝子が *nagE-nagAC* というオペロンを形成していることを示した。

4. マリアナ海溝深海の海水試料からキチン分解能を持つ海洋低温細菌 Mct-9 株を分離し、同菌が *Alteromonas* 属に属することを示した。

5. 海洋低温細菌 *Alteromonas* sp. Mct-9 株から GlcNAc-6-リン酸デアセチラーゼを分離精製し、同酵素が GlcNAc, GlcNAc-6-リン酸, GlcNAc-6-硫酸に作用することを示した。

6. 海洋低温細菌 *Alteromonas* sp. Mct-9 株と中温細菌である *V. cholerae* non-O1 1148 A 株の GlcNAc-6-リン酸デアセチラーゼの酵素化学的性質を比較し、低温細菌が高い至適温度、安定性を有することを示したもので、酵素化学、応用微生物学の発展に寄与するところが大きい。

以上のように、本論文は海洋細菌の GlcNAc 代謝関連酵素について、酵素化学的および遺伝子レベルで解析を行うとともに、生息温度域の異なる細菌の酵素の性質を解析し、低温細菌が工業的利用において有用な酵素を生産する可能性を示した。

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12年1月13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充分あるものと認めた。