

学位論文審査の結果の要旨

氏名	YUN Choong Soo
審査委員	<p>主査 松田 英幸 ㊞</p> <p>副査 川向 誠 ㊞</p> <p>副査 古賀 大三 ㊞</p> <p>副査 森嶋伊佐夫 ㊞</p> <p>副査 田中 克典 ㊞</p>
題目	Distribution of family 80 type chitosanases in nature and directed evolution of ChoA from Mitsuarina chitosanitabida [自然界における Family 80 キトサナーゼの分布と Mitsuarina chitosanitabida 由来キトサナーゼ(ChoA)の人工進化]
<p>審査結果の要旨 (2,000字以内)</p> <p>キチンはN-アセチル-D-グルコサミンがβ-1,4結合した直鎖多糖であり、節足動物の外骨格、糸状菌の細胞壁等の主な構成成分である。一方、キトサンはキチンの脱アセチル化物であり、一部の菌類の細胞壁に存在している程度である。現在、キチン、キトサンは新素材として多くの医療、産業に幅広く用いられており、その用途は様々である。また、化学的、酵素学的に分解することにより低分子化されたキチン、キトサンオリゴ糖は抗菌性、コレステロール低下作用、植物成長促進などの生理活性の高い天然高分子として注目を浴びている。キチンを分解する酵素としてキチナーゼ (EC 3.2.1.14) が、キトサンを分解する酵素としてキトサナーゼ (EC 3.2.1.132) が細菌、昆虫、カビ、放線菌など自然界に広く分布している。これまでにキチナーゼは多くの研究者がその構造、機能、特性を研究発表してきたが、キトサナーゼに関して解明されているものは比較的少ない。今まで多くのキトサナーゼが細菌、カビ、植物、ウイルス等から発見され、DNA 配列が明らかになっているものは glycosyl hydrolase の分類で Family 8, 46, 75, 80 四つの Family に分類されている。キトサナーゼの分類はそれらのアミノ酸配列の類似性を基にしている。Family 8 には五つの細菌由来キトサナーゼが cellulase, licheninase, endo-1,4-β-xylanase と共に分類されている。Family 46 には 18 のキトサナーゼが分類され、その中の 16 が細菌、二つがクロレラウイルス由来である。Streptomyces sp. N174 と Bacillus circulans MH-K1 由来の Family 46 キトサナーゼと Bacillus sp. K17 由来の Family 8 キトサナーゼは既に立体構造が決定され、その活性アミノ酸残基も報告されている。Family 75 にはカビ由来の 14、細菌由来の 3 つのキトサナーゼが分類されている。本研究以前では二つの細菌由来キトサナーゼが Family 80 に分類され、この二つは他の Family のキトサナーゼと比べアミノ酸や DNA 配列の相同性が低いことが判っていた。Mitsuarina chitosanitabida (旧名 Matsuebacter chitosanotabidus) 3001 由来のキトサナーゼ(ChoA)は最初に Family 80 に分類され、最近では Glu-121, Glu-141 が活性に重要なアミノ酸残基であることも報告されている。そこで著者はこの Family 80 キトサナーゼに分類できる新たなキトサナーゼを同定しその系統学的位置づけを行い自然界にどれだけ分布しているかを調べることを第一の目的とし、第 2 番目に改良キトサナーゼを作製するためのランダム変異方法を用いた ChoA の人工進化を目的とした。</p> <p>まず、Family 80 に分類できるキトサナーゼの同定及び分布を調べる為に自然界から 67 株の新たなキトサン分解菌を単離しその生理試験、キトサナーゼ抗体によるウエスタンブロット、choA を用いた</p>	

サザンブロット解析の結果から M. C. 3001 由来のキトサナーゼと類似した酵素を分泌する可能性がある 11 株を選択し、各々のキトサナーゼ遺伝子をクローニングした。その結果、解析したすべての遺伝子が choA とアミノ酸レベルで高い相同性(77~99%)を示した。更にこれらの 16S rRNA を解析し系統的解析を行った結果、ChoA と類似しているキトサナーゼは Proteobacterium β , γ subclass 及び Flavobacterium 属に属する多種の細菌に保持され自然界に幅広く分布していることが示唆されこれを記述した。

次に、不活性型キトサナーゼ ChoA 変異体(G151D)を鋳型とした error-prone PCR によるランダム変異導入後、活性復活変異体を選択する方法を用いて二つの活性復活変異体(M5S, M7T)を選択し解析した結果、M7T 変異体には G151D 変異に加えて ChoA のシグナルペプチド領域の中の二つのアミノ酸の変異が確認でき(T74Q/V75I)、T74Q/V75I ダブル変異体は野生型に比べ 1.5 倍の比活性の増加が見られ分泌量が増加していた。M5S 変異体には G151D 変異に加えて一つのアミノ酸変異が確認でき(N222S)、N222S 単独変異体は野生型に対し比活性で 1.2 倍、50℃での熱安定性は 17%増加していた。結果、Mitsuaria chitosanitabida 3001 由来のキトサナーゼ (ChoA)の酵素分泌量及び熱安定性を改良する事に成功したことを報告した。

以上、これらの事から著者は新たに次のことを解明した。(1)Family 80 キトサナーゼは多種の細菌に保持され自然界に幅広く分布していることを示唆した。(2) Mitsuaria chitosanitabida 3001 由来のキトサナーゼ (ChoA)の酵素分泌量及び熱安定性を改良する事に成功した。

本論文のこれらの成果は、glycosyl hydrolase family 80 に属するキトサナーゼの研究に重要な足がかりなると考えられるオリジナリティーのある優れた研究成果であり、本領域の研究の一層の発展に寄与すると期待される。

学位論文として独創性と優れた研究成果があるものと判定する。