

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	好アルカリ性放線菌および高度好塩性古細菌由来GHファミリー18キチナーゼの解析
Title(English)	
著者(和文)	遠山絹華
Author(English)	Kinuka Toyama
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10818号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:中村 聡,丹治 保典,和地 正明,福居 俊昭,八波 利恵
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10818号, Conferred date:2018/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	遠山 絹華		
論文審査 審査員		氏 名	職 名		氏 名	職 名
	主査	中村 聡	教 授	審査員	八波 利恵	准教授
	審査員	丹治 保典	教 授			
		和地 正明	教 授			
		福居 俊昭	教 授			

論文審査の要旨（2000 字程度）

本論文は「好アルカリ性放線菌および高度好塩性古細菌由来 GH ファミリー 18 キチナーゼの解析」と題し、5 章より構成されている。

第 1 章「序論」では、多糖キチンの加水分解酵素キチナーゼの分類と触媒機構、キチナーゼを構成する各種付加ドメインの役割、さらには極限環境微生物由来キチナーゼについて概説し、本研究の目的と意義について述べている。

第 2 章「F96 株由来キチナーゼ ChiF3 の性質検討」では、好アルカリ性放線菌 *Nocardiosis* sp. F96 株のゲノム上に見出された GH ファミリー 18 マルチドメインキチナーゼ ChiF3 に着目し、酵素学的性質や不溶性キチン結合能・分解能を調べ、同じく F96 株が生産するシングルドメインキチナーゼ ChiF1 のものと比較している。可溶性キチンを基質に用いて反応 pH 依存性を調べた結果、ChiF1 はアルカリ性域でも活性を有するが、酸性での活性が最も高いこと、そして ChiF3 は酸性域での活性は低いが、アルカリ性での活性が高いことを明らかにしている。ChiF3 の反応至適 pH は pH 8.5 であり、ChiF1 を含む放線菌由来キチナーゼの中で最も高い反応至適 pH であることを述べている。また、ChiF1 および ChiF3 の不溶性キチン結合率は、それぞれ 33.8% および 83.7% であり、ChiF3 の方が不溶性キチンによく結合することを示している。さらに、可溶性および不溶性キチン加水分解能を調べた結果、ChiF1 は可溶性キチンを好んで分解する一方、ChiF3 は不溶性キチンを効率的に分解する能力を有していることを明らかにしている。そして、両酵素のこれらの性質の違いは、主としてキチン結合ドメイン ChBD 領域の有無に関係があると推察している。

第 3 章「F96 株由来キチナーゼ ChiF3 の ChBD-FnIIID および CID 領域の機能解明」では、F96 株由来キチナーゼ ChiF3 の ChBD-フィブロネクチンタイプ III 様ドメイン (FnIIID) およびキチナーゼ挿入ドメイン (CID) 領域の機能解明を目的とし、ChiF3 の ChBD-FnIIID 領域を欠失した変異型酵素 ChiF3(CatD)、および ChiF1 に付加した変異型酵素 BFChiF1、さらには ChiF3 の CID 領域を ChiF1 に挿入した変異型酵素 ChiF1CID を調製し、野生型 ChiF1 および ChiF3 との詳細な性質比較を行っている。ChBD-FnIIID 領域をもつ酵素 (BFChiF1 および ChiF3) はもたない酵素 [ChiF3(CatD) および ChiF1] に比して、アルカリ性領域での相対活性が高まる一方、酸性領域での相対活性が低下することを示している。また、ChBD-FnIIID 領域をもつ酵素は不溶性キチン結合能が極めて高いことを明らかにしている。さらに、ChBD-FnIIID 領域をもつ酵素は不溶性キチン基質を好んで分解し、もたない酵素は可溶性キチン基質を好んで分解することを示している。

第 4 章「*Hb. salinarum* 由来キチナーゼ ChiN1 の分子表面にアミノ酸置換を導入した各種変異型 ChiN1 の性質検討」では、高度好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum* NRC-1 株由来 GH ファミリー 18 キチナーゼ ChiN1 の触媒ドメイン領域の立体構造モデルに基づき、分子表面に酸性アミノ酸を導入した各種変異型 ChiN1、ならびに分子表面に存在する Lys を除去した各種変異型 ChiN1 を調製し、耐塩性ならびに有機溶媒耐性との関連を調べている。いずれの変異型 ChiN1 も、野生型 ChiN1 と同程度または 1/2 から 2/3 程度の比活性を有していることを示している。また、各種変異型 ChiN1 の反応 NaCl 濃度依存性および安定性を調べた結果、Asn357 を Asp に置換した変異型酵素 (N357D) のみ野生型と違いがみられ、高塩濃度下での活性が向上したことを明らかにしている。さらに、キチン加水分解における有機溶媒 (ジメチルスルホキシド : DMSO) の添加効果を調べたところ、一部の変異型 ChiN1 において、20% DMSO 添加時に野生型 ChiN1 に比して大幅な活性向上が認められたことを述べている。以上の結果より、本研究において ChiN1 に導入したアミノ酸置換は、反応 NaCl 濃度依存性および NaCl 濃度安定性よりも、DMSO 存在下における活性向上に有効であることが示唆され、耐塩性と有機溶媒 (DMSO) 耐性とは関連しないと結論している。

第 5 章「総括」では、本研究の結果を総括し、今後の展望について述べている。これを要するに、本論文ではキチナーゼを構成する各種付加ドメインの機能を明らかにするとともに、各種付加ドメインの欠失あるいは異なるキチナーゼ分子への各種付加ドメインの付加により、新たな酵素機能を付加することに成功しており、工学上ならびに工業上貢献するところが大きい。よって本論文は、博士(工学)の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

注意：「論文審査の要旨及び審査員」は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。