

Title	Studies on chitin degradation and assimilation systems in hyperthermophilic archaea( Abstract_要旨 )
Author(s)	Mehwish, Aslam
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2017-09-25
URL	<a href="https://doi.org/10.14989/doctor.k20712">https://doi.org/10.14989/doctor.k20712</a>
Right	学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2018-09-24に公開; 許諾条件により要旨は2017-12-25に公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

京都大学	博士 (工学)	氏名	Mehwish Aslam
論文題目	Studies on chitin degradation and assimilation systems in hyperthermophilic archaea (超好熱性アーキアにおけるキチン分解・資化系に関する研究)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、キチンを用いた有用物質生産系の構築に向け、超好熱性アーキアにおけるキチン分解・資化系に関する基盤的知見獲得の成果をまとめたものであり、序論、本編4章、結論から構成されている。</p> <p>序論では、超好熱菌の特徴、超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakarensis</i> の特性、超好熱性アーキア <i>Thermococcus chitonophagus</i> の特性、バイオマスとしてのキチンの有用性、微生物におけるキチン代謝系の概要、および本論文の意義等がまとめられている。キチンは地球上でセルロースに次いで多く存在する天然バイオマスであるが、その利用は極めて限定的である。キチンをバイオマス資源として利用する上で高温での反応系を用いることは、高い反応速度やコンタミネーションに強い安定な系の構築が可能であることから、大変有利であると述べられている。このキチンのバイオマス化プロセスにおいて、超好熱菌のキチン分解・資化系の利用が極めて有効な手段であることが述べられている。</p> <p>第1章では、超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakarensis</i> に対し、遺伝子工学的的手法と培養工学的的手法を組み合わせることで作製した、キチン高分解・資化株 <i>T. kodakarensis</i> KC04ΔtM1 の特性解析について述べている。遺伝子組換えが可能な <i>T. kodakarensis</i> KU216 株を宿主株として、キチナーゼ (ChiA) をコードする遺伝子のプロモーター領域を高発現型の <i>csg</i> プロモーターに置換した KC01 株を作製し、本菌株が 0.4%(w/v)キチン(swollen chitin)含有培地において、キチンを良く分解し、培地中に(GlcNAc)<sub>2</sub>を蓄積した。さらに KC01 株を親株として、(GlcNAc)<sub>2</sub>以降の資化に関与する 1) deacetylchitobiose deacetylase (Dac)遺伝子、2) <i>exo-β-D-glucosaminidase</i> (GlmA)遺伝子と <i>glucosamine 6-phosphate deaminase</i> (GlmD)遺伝子を含むオペロン(<i>dppABCDF-glmD-glmA</i>)、の両プロモーター領域を、高発現型プロモーターにそれぞれ置換した株 (KC04) を作製した。また KC04 株を親株として、さらに解糖系代謝 flux の強化のため、解糖系遺伝子群の転写抑制因子である Tgr の遺伝子破壊を行い、KC04Δt 株を取得した。KC04 株と KC04Δt 株は KC01 株よりもキチン分解能が向上したものの、培養液中のキチンは完全には分解されなかったこと、培養液の変色 (褐色) が確認されたこと、さらに培養液中でのグルコサミンや酢酸の蓄積を確認したこと、について述べている。さらなるキチン資化性株の取得に向け、adaptive engineering 手法による育種が進められ、genetic engineering 手法により作製された KC04Δt 株を親株として、キチン含有培地による培養を 13 回繰り返すことで、当該培地での生育速度が向上した KC04ΔtM1 株を取得している。本株は培地中のキチンを完全に分解可能であること、また代謝産物である酢酸やアンモニアを KC04Δt 株よりも多く蓄積すること、さらには気相に水素(H<sub>2</sub>)を蓄積することを述べている。消費されたキチンの定量により、キチンから H<sub>2</sub> への変換効率は <math>18.7 \pm 1.1 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} [\text{swollen chitin, consumed}]</math> となり、理論値の約 85%に相当する高いレベルであった。</p> <p>第2章では、<i>T. kodakarensis</i> のキチン分解・資化代謝系において、唯一同定されていなかった <i>glucosamine kinase</i> の同定について述べている。ADP-dependent glucokinase とアノテーションされている TK1110 遺伝子を大腸菌に導入して調製された TK1110 組換えタンパク質が、酵素学的解析により <i>glucosamine kinase</i> 活性を示した。また速度論的解析により、本酵素が <i>glucose</i> と <i>glucosamine</i> を基質にした際に同程度の触媒作用 (<math>k_{\text{cat}}/K_s</math>) を示した。さらに第1章で作製した KC04ΔtM1 株を親株と</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	Mehwish Aslam
<p>して作製された TK1110 破壊株は、キチン分解活性が著しく低下し、また水素発生能を欠くことが述べられている。以上の酵素学的解析と遺伝学的解析の結果により、TK1110 が本菌のキチン代謝に必須な glucosamine kinase をコードすると結論づけている。本酵素の同定により <i>T. kodakarensis</i> のキチン分解・資化代謝系の全容が解明された。</p> <p>第 3 章では、キチンを唯一の有機物源とする培地により単離された超好熱性アーキア <i>Thermococcus chitonophagus</i> のドラフトゲノム解析と新規な構造をもつキチナーゼ ChiD の特性解析について述べられている。次世代シーケンサーを用いた本菌のドラフトゲノム解析により得られたゲノムデータ (総コンディグ数 20、総コンディグ塩基数 1,964,779 bp、予想 ORF 数 2,168) 内には、GH18 型キチナーゼをコードすると予想される遺伝子が 2 つ (<i>chiA</i>, <i>chiC</i>) と、N 末端の分泌シグナルに続き 2 つの chitin-binding domain (ChBD) と機能未知ドメインを含む遺伝子 (<i>chiD</i>) が存在した。ChiD の機能未知ドメインは、これまでにキチナーゼ活性が確認されているいずれの糖質加水分解酵素ファミリー (GH18/GH19/GH23/GH48) とも一次配列上の相同性を示さず、他方で中温偏性嫌気性細菌 <i>Clostridium botulinum</i> (ボツヌリス菌) に広く分布する機能未知タンパク質との相同性を示すことが述べられている。大腸菌を用いて調製した ChiD 組換えタンパク質を用いた酵素学的解析により、ChiD が (GlcNAc)<sub>4</sub> 以上の鎖長のキチンオリゴ糖や swollen chitin に対して加水分解活性を示し、(GlcNAc)<sub>2</sub> と (GlcNAc)<sub>3</sub> を生成するキチナーゼ活性を示すことがわかった。また還元末端側が <i>p</i>-ニトロフェニル基で修飾された修飾キチンオリゴ糖を用いた活性測定により、ChiD がキチン鎖の還元末端側より 2 つめ、もしくは 3 つめのグリコシド結合を切断する <i>exo</i> 型キチナーゼであることが示されている。超好熱菌ではキチン鎖の非還元末端側を切断するキチナーゼはこれまでも知られていたが、ChiD のようにキチン鎖の還元末端側から切断する酵素は初めての発見である。さらに ChiD の立体構造データを用いて、その反応残基を予想し、部位特異的変異体を用いた解析により、その酵素活性に深く関与するアミノ酸残基を特定したことについても述べている。</p> <p>第 4 章では、<i>T. chitonophagus</i> のキチナーゼ ChiC の <i>T. kodakarensis</i> 内で発現について述べている。ChiC をコードする遺伝子を <i>T. kodakarensis</i> 内に導入したところ、ChiC が実際に発現し、膜画分に主に局在することを述べている。また ChiC 発現株では、宿主と比較してキチン依存的な水素生産速度が向上することについても述べている。</p> <p>結論では、本論文で得られた成果について要約している。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* および *Thermococcus chitonophagus* を用い、超好熱菌におけるキチン分解機構の解明とキチン分解資化能が向上した菌株の育種を目標として研究した成果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. Genetic engineering と adaptive engineering 手法を用いて、キチン分解・資化が可能な *T. kodakarensis* KC04  $\Delta$  tM1 株を取得し、本菌が効率的にキチンを分解して水素などの代謝産物を生成することを明らかにした。
2. 酵素学的解析と遺伝学的解析により、TK1110 が *T. kodakarensis* のキチン代謝に必須な glucosamine kinase をコードすることを明らかにした。
3. *T. chitonophagus* のゲノム解析により、新規キチナーゼ ChiD をコードする遺伝子を発見し、組換え型 ChiD の酵素学的解析により、本酵素がキチン鎖の還元末端側を認識して切断する exo 型キチナーゼであることを明らかにした。また ChiD の部位特異的変異導入により、その酵素活性に関与するアミノ酸残基を特定した。
4. *T. chitonophagus* の ChiC 遺伝子を *T. kodakarensis* 内に導入した株において、ChiC が主に膜画分に局在すること、また ChiC 導入株が元株よりも高いキチン依存的水素生産能を示すことを明らかにした。

以上のように本論文は、微生物を用いたキチンの有効利用における基盤的知見を与えるものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成29年8月25日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、無期限に当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日：平成29年12月25日以降