

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 TRAN Dinh Minh
 学位 博士 (学術)
 学位記番号 新大院博 (学) 第 216 号
 学位授与の日付 平成 30 年 9 月 20 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 博士論文名 Screening of chitinolytic bacteria from freshwater lake and analysis of chitinase system of the isolated bacteria
 (淡水湖からのキチン分解細菌のスクリーニングおよび分離された細菌のキチナーゼ・システムの解析)

論文審査委員 主査 教授・鈴木 一史
 副査 教授・原田 直樹
 副査 准教授・佐藤 努
 副査 准教授・杉本 華幸
 副査 教授・渡邊 剛志

博士論文の要旨

新規の生物農薬を開発するため、本研究では高いキチナーゼ活性とバイオフィーム形成能を有する細菌に着目して研究を行った。このような特徴を有する細菌は、病原真菌に付着してバイオフィームを形成し、真菌細胞壁を構成するキチンを分解する酵素であるキチナーゼを生産すると考えられる。その結果、キチナーゼはバイオフィーム中に留まり、高濃度のキチナーゼがキチンを分解すると考えられることから、このような細菌は生物農薬として高い効果を示す可能性がある。一般的に細菌の分離源として土壌が用いられるが、今回は砂丘湖である佐潟（新潟市）の堆積物と湖水に浸したキチンフレークからのキチン分解細菌のスクリーニングを行った。淡水中に浮遊しているキチン分解能とバイオフィーム系性能をもつ細菌は、キチンフレークに付着してバイオフィームを形成してキチン分解と資化を行うと考えられ、このような特徴をもった細菌のスクリーニングに有用であると考へた。キチン分解菌は堆積物とキチンフレークからコロイダルキチンを含む寒天培地を用いて分離した。湖水に浸したキチンフレークからは直接分離と継代培養を行ってから分離する 2 種類の方法で細菌を分離した。その結果、5,100 株以上のキチン分解能を示す細菌が分離され、その中から高いキチン分解能を示した 31 株を選択し、さらにキチナーゼ活性とバイオフィーム形成能を調べた。16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいて系統発生解析を行った結果、31 株のほとんどが *Aeromonadaceae* 科に属し、続いて *Paenibacillaceae* 科、*Enterobacteriaceae* 科、*Neisseriaceae* 科であった。キチナーゼ活性、バイオフィーム形成能およびに系統発生解析の結果を基に、4 菌株 (*Serratia* と *Andreprevotia* 各 1 株、*Aeromonas* 2 株) についてさらに詳細な解析を行った。キチンパウダー含有培地で培養した時の培養上清のキチナーゼ活性は、4 菌株とも対照とした *Serratia marcescens* 2170 よりも低い値を示した。しかし、キチナーゼの比活性は対照よりも高い値を示した。*Andreprevotia* が生産したキチナーゼの 1 つは、典型的な細菌キチナーゼの分子サイズよりも大きく 121 kDa であり、新しいタイプの細菌キチナーゼであることが示唆された。さらに、透析後の培養上清は 4 菌株とも *Trichoderma reesei* の菌糸の成長を抑制した。これらの結果は、4 菌株が生物農薬の候補となる可能性を示した。

分離された *A. salmonicida* SWSY 1.411 の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は CAZy データベースに登録されている *A. salmonicida* A449 (CP000644) と 100%一致した。*A. salmonicida* A449 (CP000644)は、1つの GH18 キチナーゼ、2つの GH19 キチナーゼと1つの AA10 タンパク質の遺伝子をもっていることがゲノム情報からわかった。そこで、この情報に基づき、*A. salmonicida* SWSY 1.411 のキチナーゼ遺伝子をクローン化するためのプライマーを設計した。*A. salmonicida* SWSY 1.411 の染色体 DNA を鋳型とした PCR と増幅した DNA 断片のクローン化及び塩基配列決定により、キチン分解に関与する3つの遺伝子、すなわち、GH18 キチナーゼ、GH19 キチナーゼ、AA10 タンパク質の遺伝子が同定された。塩基配列から推定されたそれら3つの酵素の一次構造は、多くの機能的なドメインを含むことが分かった。そして、キチン結合ドメインの1つは近年新しく分類された糖質結合モジュールである CBM73 であった。ChiA は細菌由来 GH18 キチナーゼのサブファミリーA に属し、CBM5 と CBM73 をもっていた。ChiB は GH19 キチナーゼに分類され、その触媒ドメインは植物由来クラスIVキチナーゼと似ており、さらに、CBM5、CBM73、PKD ドメインをもっていた。AA10 タンパク質は CBM73 ドメインをもっていた。

細菌由来 GH18 キチナーゼは一般的に不溶性キチンに対する高いキチナーゼ活性を持つこと、細菌由来 GH19 キチナーゼは抗真菌活性に関与する主要な酵素であること、キチナーゼとの共存下で細菌由来 AA10 タンパク質はキチン加水分解において重要な役割を果たすことが先行研究で報告されている。これらのことから、*A. salmonicida* SWSY 1.411 は効率的なキチン分解及び真菌の菌糸生育阻害に有効なキチナーゼシステムを有すると考えられた。

審査結果の要旨

本学位論文では、新規の生物農薬開発を目指して行ったバイオフィーム形成能と真菌細胞壁を構成するキチンを分解するキチナーゼ生産能をもつ細菌のスクリーニングと、分離された細菌について解析した結果がまとめられている。一般的な細菌の分離源とは異なる砂丘湖である佐潟（新潟市）の堆積物と湖水に浸したキチンフレイクからのキチン分解細菌のスクリーニングを行い、特に湖水に浸したキチンフレイクからのキチン分解細菌によって、キチナーゼ活性だけでなく高いバイオフィーム形成能を示す細菌が分離されたこと、さらには近年報告された新属の細菌である *Andreprevotia* が分離されたことなど、スクリーニング方法の有効性が示された。最終的に選択された4菌株は、高いキチナーゼの比活性とともに、抗真菌活性も有し、生物農薬として有望な性質を示した。さらに、4菌株の中から *A. salmonicida* に着目してキチン分解酵素のクローン化と塩基配列の解析を行ったところ、この菌株は異なる性質をもつキチン分解酵素を少なくとも3種類もち、これらが高いキチン分解活性と抗真菌活性の要因であることが示唆された。

以上の結果は、生物農薬開発における新たな視点でのスクリーニングの有効性と、分離された細菌の優れた特徴の解析結果の一部を示しており、今後の分離細菌の生物農薬としての開発と、抗真菌活性やキチン分解のメカニズム解明に貢献できると評価される。

本論文の主な内容は、申請者を筆頭著者として Identification and characterization of chitinolytic bacteria isolated from a freshwater lake のタイトルで Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry に掲載された。

よって、本論文は博士（学術）の博士論文として十分であると認定した。