

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	PENTEKHINA Iuliia	
学位	博士 (学術)	
学位記番号	新大院博 (学) 第 222 号	
学位授与の日付	令和 2 年 9 月 23 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	Analysis of the chitin-degrading enzyme system of <i>Aeromonas salmonicida</i> and <i>Serratia plymuthica</i> (<i>Aeromonas salmonicida</i> および <i>Serratia plymuthica</i> のキチン分解酵素系の解析)	
論文審査委員	主査	教授・鈴木 一史
	副査	教授・原田 直樹
	副査	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

不溶性多糖のキチンは、甲殻類の外骨格、昆虫の外皮、真菌の細胞壁など、様々な生物に存在する。キチンを分解する酵素やその生産菌は、植物病原真菌の制御に利用できると考えられる。そこで、新たな微生物農薬の開発を目的として新潟市の淡水湖・佐潟から分離したキチン分解細菌 *Aeromonas salmonicida* SWSY-1.411 と *Serratia plymuthica* SWSY-3.47 のキチン分解酵素系 (キチナーゼ系) の解析を行った。

ゲノム情報が明らかになっている複数の *A. salmonicida* および *S. plymuthica* のゲノムデータを元に PCR を用い、2 菌株のキチン分解酵素遺伝子をクローン化して解析した。*A. salmonicida* のキチン分解酵素系は、GH18 キチナーゼである AsChiA と AsChiB、GH19 キチナーゼである AsChiC と AsChiD、および多糖モノオキシゲナーゼ (LPMO) である AsLPMO10A で構成されていた。これらの酵素遺伝子を大腸菌にクローン化し、精製酵素を得た。*A. salmonicida* キチン分解酵素系の相乗効果において、AsChiA と AsLPMO10A は不可欠な酵素であった。さらに、パウダーキチンに 4 種全てのキチナーゼと AsLPMO10A を作用させた場合、4 種のキチナーゼの組み合わせと比較して、2 倍以上の分解活性の増加が観察された。AsChiB は不溶性キチンに対して、AsChiD は水溶性キチンに対して最も高い分解活性を示した。AsChiA は、還元末端からキチン鎖を連続的に分解する SmChiA および BcChiA1 と相乗効果を示し、一方で、AsChiB は非還元末端からキチン鎖を連続的に分解する SmChiB と相乗効果を示した。これらの結果は、AsChiA と AsChiB がキチン分解において異なる役割を果たし、お互い反対方向からキチン鎖を分解することを示唆していた。GH19 キチナーゼである AsChiC および AsChiD は、*Trichoderma reesei* の菌糸成長を抑制したことから、この菌株が示す抗真菌活性に重要な役割を果たすことが明らかとなった。*A. salmonicida* の GH19 キチナーゼは、触媒ドメインのアミノ酸配列の解析の結果、*Aeromonas*、*Enterobacter*、*Salmonella*、*Vibrio* などの GH19 キチナーゼと共にグループ II、III、IV、および V を持っていることが示唆された。一方、主に *Streptomyces* の細菌 GH19 キチナーゼがグループ III と IV を持つことから、*A. salmonicida* とその近縁の GH19 キチナーゼとは構造的に異なることが示唆された。

S. plymuthica のキチン分解酵素系は、GH18 に属する 5 つのキチナーゼ (SpChiA、SpChiB、SpChiC、SpChiD、および SpChiE) と、AA10 タンパク質である 4 つの LPMO (SpLPMO10A、SpLPMO10B、SpLPMO10C、および SpLPMO10D) で構成されており、*S. marcescens* 2170 には存在しないキチナーゼ (SpChiE) と 3 つの LPMO (SpLPMO10A、SpLPMO10B、SpLPMO10C) が存在することが明らかとなった。その中で SpChiE は水溶性キチンに対して高い活性を示し、不溶性キチンに対しての活性は低かった。また、SpLPMO10C は未解析の新しいタイプの LPMO であることが示唆された。

今回、*A. salmonicida* と *S. plymuthica* の異なるタイプのキチン分解細菌について、そのキチン分解酵素系を解析した。*A. salmonicida* のキチン分解酵素系は、エキソ型に作用して連続的にキチン鎖を分解する GH18 キチナーゼ、エンド型であり真菌の細胞壁中のキチンも分解して抗真菌活性を示すと考えられる GH19 キチナーゼ、および不溶性キチン分解に重要な AA10 タンパク質である LPMO で構成されていた。一方、*S. plymuthica* のキチン分解酵素系には GH19 キチナーゼが含まれておらず、連続的にキチン鎖を分解するエキソ型に加えエンド型の 2 種類の GH18 キチナーゼと、キチンの効率的な分解に重要な AA10 タンパク質である複数の LPMO から構成されていた。

審査結果の要旨

本学位論文では、新たな微生物農薬の開発を目的として新潟市の淡水湖・佐潟から分離したキチン分解細菌 *Aeromonas salmonicida* SWSY-1.411 と *Serratia plymuthica* SWSY-3.47 のキチン分解酵素系について解析した結果がまとめられている。*A. salmonicida* のキチン分解酵素系は、エキソ型に作用して連続的にキチン鎖を分解する GH18 キチナーゼ (AsChiA と AsChiB)、エンド型であり真菌の細胞壁中のキチンも分解して抗真菌活性を示すと考えられる GH19 キチナーゼ (AsChiC と AsChiD)、および不溶性キチン分解に重要な多糖モノオキシゲナーゼ (AsLPMO10A) で構成されていた。*A. salmonicida* のキチン分解酵素による相乗効果において、AsChiA と AsLPMO10A は不可欠な酵素であった。さらに、4 種のキチナーゼと AsLPMO10A を作用させた場合、4 種のキチナーゼのみの組み合わせと比較して、2 倍以上の分解活性の増加が観察された。また、AsChiC と AsChiD はループ II、III、IV、および V から構成され、今まで明らかになっている細菌 GH19 キチナーゼとは構造的に異なることが示唆された。一方、*S. plymuthica* のキチン分解酵素系には GH19 キチナーゼが含まれておらず、連続的にキチン鎖を分解するエキソ型に加えエンド型の 2 種類の GH18 キチナーゼと、キチンの効率的な分解に重要な AA10 タンパク質である複数の LPMO から構成されていた。

以上の結果は、キチン分解細菌による効率的なキチン分解機構の解明に必要な新たなキチン分解酵素系の解析結果を示しており、今後のキチン分解細菌の微生物農薬としての開発や効率的なキチン分解機構の解明やその利用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 Chitinase system of *Aeromonas salmonicida*, and characterization of enzymes involved in chitin degradation 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。