

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	土井 宏育
題 目	海産廃棄物減容化に寄与する微生物の応用研究 (An applied study on microorganisms contributing to decomposing marine waste)
<p>近年、大量発生するエチゼンクラゲ (<i>Nemopilema nomurai</i> Kishinouye) は、沿岸漁業に甚大な被害をもたらし、ミズクラゲ (<i>Aurelia aurita</i>) は臨海産業に深刻な被害をもたらしている。陸揚げしたクラゲ類は、体成分の95%以上が海水であるため、肥料としての利用が困難であり、焼却は著しく非効率的な処理方法であることから、迅速な処理方法の確立が望まれている。また、腐敗に伴い強い悪臭とともにCOD(化学的酸素要求量)値が増大する。従って、クラゲ類は陸揚げ後出来るだけ早く処理することによって悪臭抑制とCOD増大の抑制をはかる必要がある。そこで本研究では、放線菌99-GP-2D-5株が産生する異常プリオン蛋白質分解プロテアーゼE77をクラゲ類の分解に適用し、減容化を行なった。さらに生じた廃液について海洋微生物で廃液処理した。</p> <p>まず第2章では、E77産生菌の培養法を検討し、精製したE77の諸性質について検討を行なった。E77の至適温度は70℃だった。40-60℃の加熱が高い酵素活性を安定的に維持できる温度であることが示唆された。至適pHは8だった。酸性側では低活性だったが、8以上のpHではおおむね75%以上の活性があった。</p> <p>次に第3章では、E77産生菌について16S rDNAにもとづく相同性解析および分子系統解析、菌体細胞壁アミノ酸を解析によって、同定を行い分類学的位置について検討を行なった。分析の結果から、E77産生菌を <i>Streptomyces</i> 属の放線菌であると同定した。</p> <p>さらに第4章では、クラゲがE77によって分解されることによる減重量変化を指標として、クラゲ個体の分解速度と酵素濃度、反応温度、塩分濃度の関係、さらに酵素溶液を繰り返してクラゲ個体の分解に供した場合の分解速度について比較検討を行った。E77(0.2%溶液、50℃)により60分以内でミズクラゲおよびエチゼンクラゲは完全に分解された。酵素溶液は50℃の反応条件下で、少なくとも5回以上の再利用(繰り返し利用)が可能であった。</p> <p>第5章ではクラゲを酵素分解した廃液を、酵母および海洋微生物群を担体に包括固定化したバイオリアクターにより、効率的に処理する方法を検討した。本処理により、クラゲ分解廃液中のCOD_mを処理日数4日間で84%除去することができた。さらに凝集沈澱と活性炭処理を併用することによりCOD_mをほぼ100%除去できた。</p> <p>第6章では、第5章で検討したバイオリアクター微生物群集の解析を行った。分離した酵母126-Aege株は <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> であると同定された。細菌群のPCR-DGGE解析により、<i>Sphingobacterium</i> 属、<i>Pseudomonas</i> 属、<i>Flavobacterium</i> 属、および <i>Bacillus</i> 属の細菌から構成される細菌群集を形成することが推定された。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Hiroyasu Doi
題 目	An applied study on microorganisms contributing to decomposing marinerwaste. (海産廃棄物減容化に寄与する微生物の応用研究)

The jellyfish degradative capacity of protease E77, an enzyme produced by microbes isolated from tideland was assessed in this study. E77 was initially discovered as an enzyme degrading abnormal prion proteins such as those involved with bovine spongiform encephalopathy, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie. E77 producing actinomycete strain 99-GP-2D-5 was identified as an actinomycete of the genus *Streptomyces* from the result of molecular phylogenetic analysis based on base sequences of 16S rDNA, and amino acid analysis of the cell wall peptidoglycan. Investigation was carried out into suitable conditions for E77 production, examining factors such as temperature and pH dependence. The optimal temperature of E77 was observed at 70°C. A temperature of 40-60°C provided the best results. Results from pH optimum and stability of pH test, E77 showed highest activity and stability at pH 8. The effect of metal ions, chemical reagents and protease inhibitors on enzyme activity was investigated with E77 solution. The enzyme was not affected by 1mM EDTA. The enzyme activity was decreased 86.9% by 1mM PMSF. The protease activity was strongly inhibited and not affected by EDTA indicating that E77 was validated to serine protease. The decomposition of jellyfish (*Aurelia aurita* and *Nemopilema nomurai* Kishinouye) by E77 was examined. The jellyfish was decomposed completely with 0.2% concentrations of E77 within 30 min for *A. aurita* and 60 min for *N. nomurai* Kishinouye at 50°C. The repetitive use of 0.2% E77 solution without a new addition of E77 was also tested. The test showed that it decomposes newly added jellyfish at least 5 times at 50 °C.

The degraded jellyfish effluent was treated using microbes isolated from marine and estuarine regions. A bioreactor packed with halo-tolerant microorganisms was investigated for the treatment of the degraded jellyfish in a laboratory scale. The jellyfish effluent was treated with a combination of isolated yeast and several bacterial groups. A COD_m was removed by 84% from the original value after the bioreactor packed was circulated during 4 days. The microflora which could decompose jellyfish dissolved wastewater as source of substrates was analyzed. The yeast was identified as *Rhodotorula mucilaginosa* by 28S rDNA-D1/D2 analysis. By denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) analysis on the basis of 16S rDNA, it was revealed that 6 kinds of bacteria were composed of microflora; genus *Sphingobacterium* (2 species), *Pseudomonas*, *Flavobacterium* (2 species) and *Bacillus*. Furthermore, in addition to the bioreactor treatment, coagulation-sedimentation treatments and activated carbon treatments were used in conjunction to test jellyfish effluent purification capacity.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	土井 宏育
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 杉 元 康 志
	副査 琉球 大学 教授 安 田 正 昭
	副査 鹿児島 大学 教授 小 山 次 朗
	副査 鹿児島 大学 教授 越 塩 俊 介
	副査 鹿児島 大学 教授 岡 達 三
審査協力者	
題 目	海産廃棄物減容化に寄与する微生物の応用研究 (An Applied study on Microorganisms Contributing to Decomposing Marinewaste)
<p>近年、食品製造過程で生じる大量の副産物や漁業で有用な生物以外に漁獲される未利用海産物の処理が社会的な問題となっている。最近では大量に異常発生したクラゲが大きな話題となり、漁業に深刻な影響を与えた。特に、エチゼンクラゲは沿岸漁業に甚大な被害をもたらし、また、ミズクラゲは臨海産業にとって深刻なものとなっている。本研究は、異常発生したクラゲの処理として、放線菌 99-GP-2D-5 株が産生する異常プリオン分解酵素 E77 (プリオナーゼ) を用いた蛋白質の効率的分解法の確立と、その分解物処理に微生物群集を包括的に固定化したバイオリアクターを用いた方法の開発を目的に海産廃棄物の減容化の可能性を追究した。</p> <p>第一に、千葉県干潟から採取したプリオナーゼ産生菌・放線菌 99-GP-2D-5 株の最適な培養法を検討した。さらに精製したプリオナーゼの酵素化学的性質を明らかにした。培養はグルコース、酵母エキス、魚肉エキスを主成分とした培地で十分可能あり、プロテアーゼ活性は培養 3 日目から顕著になり、5 日目に最大となった。プリオナーゼの最適温度は 70° C、最適 pH は 8 であったが、安定性の面から 40-50° C が適用にはふさわしいと結論した。本酵素はセリンプロテアーゼであり、分子内のジスルフィド結合による構造が重要であった。</p>	

第二に、放線菌 99-GP-2D-5 株の分類学的解析を行った。走査型電子顕微鏡による形態的観察、16S rRNA に基づく相同性解析および分子系統解析、菌体細胞壁アミノ酸組成解析を行った結果、形状と孢子形態、16S rRNA の配列、アミノ酸分析から、本株は *Streptomyces* 属に帰する放線菌と結論した。

第三に、プリオナーゼによるミズクラゲおよびエチゼンクラゲの分解（液化）について検討を行った。酵素濃度、酵素反応温度、塩分濃度などを検討し、ミズクラゲ（クラゲ：酵素=500：1）の場合は 50°C、30 分で完全に液化され、酵素は反復利用が可能であった。エチゼンクラゲも同様の条件で、60 分で液化することが出来、酵素は反復利用が可能であった。

また、クラゲ分解物の毒性については認められなかった。

第四に、クラゲ分解物（廃液）の処理について検討を行った。分離した酵母および海洋微生物群を担体とした固定化したバイオリアクターを構築し、これによりクラゲ分解物を処理した。その結果、処理 4 日間で廃液中の COD（化学的酸素要求量）を 84% 除去することに成功した。また、凝集沈殿処理や活性炭処理で 100% 除去することが出来た。

第五に、クラゲ廃液処理に用いたバイオリアクター微生物群集の菌叢について調べた。分離した酵母は *Rhodotorula mucilaginosa* であることを同定した。細菌群は PCR-DGGE 解析から、*Sphingobacterium* 属、*Pseudomonas* 属、*Flavobacterium* 属および *Bacillus* 属に属するものであることが構成されていた。

以上のように、本論文でまとめた海産廃棄物減容化に寄与する有用微生物の研究は、漁業環境を悪化させる異常発生クラゲ類の処理法として大きな可能性を提供するものであり、応用微生物学に寄与するだけでなく社会的貢献性が高い研究である。したがって、審査委員一同は、本論文について博士（農学）の学位論文として十分な価値を持つと判定した

問題となっている。クラゲは体成分の95%以上が海水で、陸揚げ後時間の経過に伴い、激的な腐敗臭がする。また法規制により埋め立てや海洋投棄ができない。クラゲの処分に現在有効な方法がないため、酵素を用いてクラゲを液体化し、液体化した廃液を海洋微生物で浄化した。この最終処分までを通した一連の技術が必要とされ、微生物を用いた技術がベースになっている。本研究のタイトルは微生物の応用研究なので、微生物の新たな利用方法が本研究の焦点である。

[質問6] バイオリアクターで酵母と細菌叢の割合は検討したか

[回答6] 詳しい検討は行っていない。酵母および微生物単独よりも両者の共存した場合が最も効率がよかった。

[質問7] 今回同定した酵母・ロードトルラと細菌叢とは共生関係があるのか?

[回答7] 共生関係はないと思われる。酵母→細菌叢を繰り返すことでより効率的にCODの低下させることが出来たと思う。

[質問8] 他の放線菌のアルカリプロテアーゼとの違いは? 何故、プリオナーゼは特別なのか?

[回答8] アルカリに至適pHがあることからその性質は変わらない。活性の強さはタンパクの構造と関係があるのかも知れない。タンパク構造は解析していないので、構造が分かれば他のアルカリプロテアーゼとの違いが明らかになると思う。

[質問9] 高いNaCl濃度で活性が高いが、1mMで活性が110%程度しかない。もっと高い濃度のNaClで酵素的性質を調べるべきだが。

[回答9] NaCl濃度が高くても使用できるのが本酵素の特徴で、ご指摘のようにNaClの最適濃度も検討したい。本研究の目的であったクラゲの分解、つまり海水でのクラゲの酵素分解にはまったく影響がなかった。人工海水でも天然の海水でもなんら問題はなかった。

[質問10] この方法は実際、使われているのか?

[回答10] 発電所で実用に向けて進められている。

学力確認結果の要旨	
学位申請者 氏 名	土井 宏育
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 杉 元 康 志
	副査 琉球 大学 教授 安 田 正 昭
	副査 鹿児島 大学 教授 小 山 次 朗
	副査 鹿児島 大学 教授 越 塩 俊 介
	副査 鹿児島 大学 教授 岡 達 三
審査協力者	
実施年月日	平成 2 1 年 1 月 1 5 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input type="radio"/> 口答・<input checked="" type="radio"/> 筆答	
<p>主査および副査は、平成 2 1 年 1 月 1 5 日の公開審査会において学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について諮問を行った。具体的には別紙のような質疑がなされ、いずれも満足できる回答を得ることが出来た。</p> <p>また、筆記により、外国語 (英語) の学力を確認した。</p> <p>その結果、審査委員会は、申請者が大学院連合農学研究科博士課程修了者と同等以上の学力および識見を有するものと認め、農学の分野および水産学に貢献する研究成果を提供したことにより、博士 (農学) の学位を与えるに十分な資格を持つものと認めた。</p>	

学位申請者
氏 名

土井 宏育

〔質問1〕クラゲの廃液は海に捨てるのか？また、ヒメダカを使って毒性がないことだが海の生物を使って安全性を確かめるべきだが。

〔回答1〕発電所におけるCOD基準値が15mg/L以下であることから、処理したクラゲ分解液処理水はその基準を下回っている。そのために放流は可能である。淡水性のヒメダカでは毒性が見られなかったが、海の生物では確かめていない。今後検討したい。

〔質問2〕放線菌99-GP-2D-5株の培養では特別の培地は必要ないのか？

〔回答2〕基本的にはグルコース、イーストエキスラクトがあればよい。グルコースが必須で他のカーボンソースではうまく行かなかった。また、他の窒素源もイーストエキスラクトに勝るものはなかった。この条件であれば比較的安価に培養が出来、工業的にも成り立つと思われる。

〔質問3〕PSPを用いた理由は？

〔回答2〕異常プリオンを分解できる酵素つまり分解力が高いプロテアーゼの探索としてこの研究は始まった。異常プリオンは入手や取り扱いの難しさなどから、構造が類似しており、かつ、無毒でプロテアーゼ抵抗性があるPSPを基質として菌のスクリーニングを行った。その結果、異常プリオンを分解できる分解酵素E77（プリオナーゼ）が発見された。

〔質問4〕プリオナーゼはアルカリプロテアーゼということであるが、サチライシンと一次構造が似ているのか？また、そのファミリーに属するか？

〔回答4〕サチライシンはバチルス属の細菌由来であるので、放線菌ストレプトミセス属由来のプリオナーゼとは異なる。プリオナーゼは、ファミリーとしてはサチライシンファミリーよりキモトリプシンファミリーに近い。

〔質問5〕本研究はプリオナーゼの発見とその性質解明→クラゲの処理にそれを利用し、プリオナーゼ処理クラゲ廃液→廃液の微生物を使ったバイオリクターによる浄化→環境改善となっているが、その焦点は何処にあるのか？

〔回答5〕発電所などの臨海産業では、冷却水の取水時にプラントに被害が及ぶのを防ぐため、クラゲを陸揚げしている。また漁業分野ではとくに巻き網漁で混獲したクラゲの処分が