

目的別テーマ：天然繊維の高機能化と応用

研究テーマ

15-2-8：キチン・キトサンの酵素変換による高機能化に関する研究

ABSTRACT

Chitin- and chitosan-related enzymes were examined to utilize an abundant biomass, chitin.

1. *Gene structure and function of fungal chitosanases were clarified. The novel C-terminal domain (R3) of Aspergillus oryzae chitosanase increased a solubility of recombinant proteins when the fusion protein was expressed in E. coli.*

2. *A gene coding for chitin deacetylase was isolated from the basidiomycetes, Flammulina velutipes, which was specifically expressed during fruiting body development.*

3. *Analysis of environmental DNA revealed that an addition of flake chitin into soil increased a population of various kinds of bacteria, most of which were uncultured and unidentified ones. Partial fragments of genes coding for chitinases were PCR-amplified from environmental DNA.*

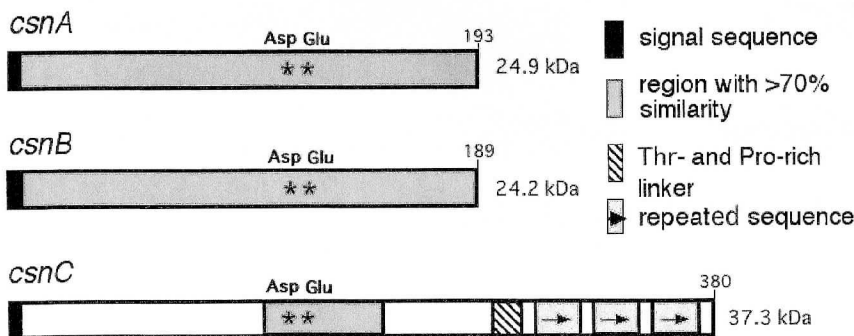
研究目的

地球上でセルロースに次いで豊富に存在するバイオマスであるキチン・キトサンの有効利用・高機能化を目的とした酵素変換を試みる。第一に、菌類（カビ、キノコ）細胞壁におけるキチン合成、キトサンへの変換、およびそれら多糖の分解という一連の代謝に関連する酵素に注目し、その利用を検討する。第二に、環境 DNA を用いた解析手法により、自然界に分布する難培養性微生物を含むキチン分解細菌の動態を明らかにする。この未利用微生物資源から、新規なキチン・キトサン変換酵素を探索する。

5年間の研究内容と成果

1. 麹菌キトサナーゼの機能解析

菌類キトサナーゼの構造と機能、生理的役割を解明するため、麹菌 *Aspergillus oryzae* とフザリウム菌 *Fusarium solani* について、酵素精製と性質調査、遺伝子の単離と塩基配列決定を行った。その結果、菌類キトサナーゼ一次配列は細菌キトサナーゼと相同性を示さず、進化的起源が異なることを明らかにした。この成果により、菌類キトサナーゼに対して、糖質加水分解酵素の新たな分類 (Family 75) が提唱されるに至った。また、インビトロ点突然変異導入法により、活性中心としてはたらく2つの酸性アミノ酸残基を決定し、菌類キトサナーゼが inverting 型の反応機構をもつことを明らかにした。麹菌の主要なキトサナーゼ (CsnC) は、活性ドメインのC末端側にリンカー領域を介して、3回の繰り返し配列からなる新規なドメイン構造 (R3) を有していた。この R3 ドメインは粉末状キトサンなどの不溶性基質に対する結合能を示し、またその結合力は繰り返し構造の数に応じて増大することがわかった。さらに、大腸菌を宿主に、この R3 領域を融合させた組換えタンパク質を発現させた場合、発現タンパクの可溶性を増大させる効果を認めた。大腸菌発現系で封入体を形成する有用タンパク質に対して、R3 配列を融合させることにより可溶化促進因子として利用できる可能性が示された。



麹菌キトサナーゼの構造

2. エノキタケ由来のキチンデアセチラーゼ

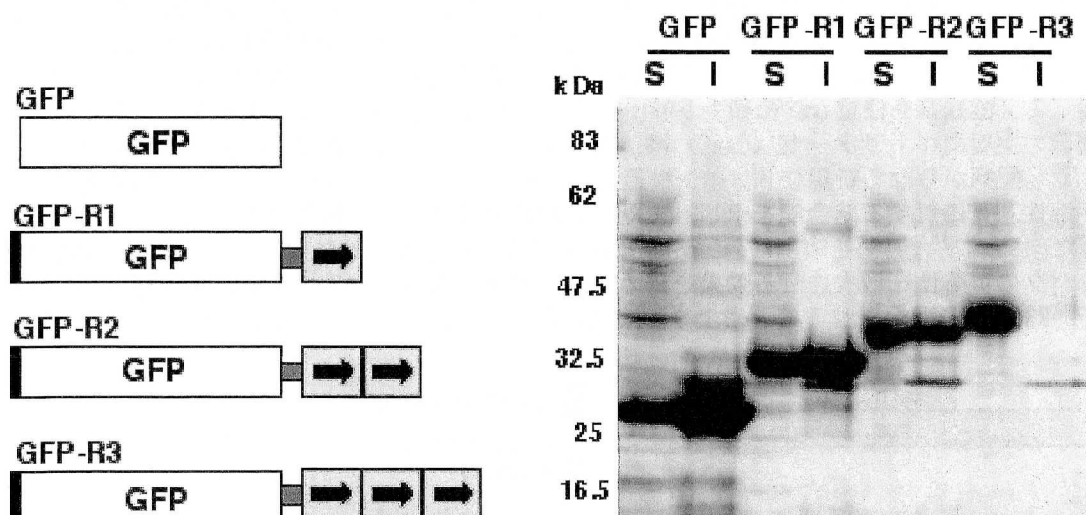
担子菌キノコの子実体形成機構を分子レベルで解明することを目的として、エノキタケ *Flammulina velutipes* を実験材料に子実体形成の初期に特異的に発現する遺伝子群を調査した。その結果、菌類の polysaccharide deacetylase (PDA) と相同性を示す遺伝子 (*Fv-pda*) が得られた。*Fv-pda* 遺伝子は栄養菌糸体では全く発現せず、子実体誘導後 6 日目に発現が確認され、子実体原基以降に強く発現したことから、遺伝子産物が子実体形成過程に密接に関与することが示唆された。*Fv-pda* 遺伝子産物の機能を調べるため、酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いて組換え FV-PDA (分子量 31 kDa) を調製した。組換え FV-PDA は、N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) の 2 量体以上のオリゴ糖を脱アセチル化した。また、グリコールキチンやキトサンなどの多糖に対しても活性を示し chitin deacetylase 活性をもつことがわかった。本酵素は、キチンの脱アセチル化反応を介したキトサン生産へ応用することが可能である。今後、異種宿主発現系を用いた組換え酵素の大量生産を検討する必要がある。

3. 環境DNAを用いたキチン分解細菌群の調査と新規キチナーゼ遺伝子の探索

自然環境中に存在する微生物のほとんどは難培養性の未同定種と言われている。これら難培養性微生物を調査するためには、環境に存在する全微生物細胞から培養を経ずに直接調製したDNA (環境DNA) を解析する手法が有効である。また、環境DNAは、応用面で好ましい新たな性質をもつ有用酵素遺伝子の探索源としても有望と考えられる。本研究では、土壌にキチンを投与した試験区を設定し、経時的にサンプリングした土壌から調製した環境DNAの解析により細菌群の変動過程を調査した。環境DNAを鋳型にして16S ribosomal DNAの一部をPCR増幅し、変性剤濃度勾配電気泳動 (DGGE) 法によってDNA断片を分離することにより、試験区土壌中の細菌種の変動パターンを視覚化した。その結果、無投与区と比較して明白な蛍光強度の増大を示したバンドが多数出現した。これらのバンドは、試験土壌で優勢となったキチン分解細菌由来の16S rDNA由来と考えられた。23断片の塩基配列を決定したところ、17配列が γ -プロテオバクテリア門に属する細菌種由来と推定された。また、半数以上の配列は既知細菌種の配列と一致せず、未同定の難培養性細菌種由来と考えられた。

糖質加水分解酵素ファミリー18キチナーゼの保存アミノ酸配列をターゲットとするプライマーを設計し環境DNAをテンプレートにPCRを行い、増幅断片をクローニングした。そのうち1クローンは、*Janthinobacterium lividum*由来キチナーゼと74%の相同性を示し、この手法で環境DNAからキチナーゼ遺伝子断片を獲得できることが示された。

フレック状キチンを詰めたナイロンバッグを土壌、河川、温泉、堀水に設置した。それぞれキチン表面にキチン分解細菌群から構成されると予想されるバイオフィルムの形成が認められた。このバイオフィルムから調製したDNAについても上記のDGGE分析を行ったところ、特有の16S rDNAバンドパターンを示した。今後、バイオフィルム形成に関与する細菌種を調べることで、自然環境中における細菌のキチン吸着と分解の過程を明らかにしていきたい。



R3 ドメインを融合した大腸菌発現組換えタンパク質の可溶化効果