

目的別テーマ：天然繊維の高機能化と応用

1 6 年度研究テーマ

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

A gene (*csnC*) coding for chitosanase secreted in medium was isolated from the koji mold *Aspergillus oryzae*. *CsnC* ORF contained serine- and threonine-rich linker and three repeated sequences in its C-terminal, which were not observed in other fungal chitosanases. The cDNA corresponding to mature chitosanase was synthesized by a reverse transcriptase-PCR, and introduced into cells of the yeast *Pichia pastoris* by using an expression vector. The resulting transformant secreted active recombinant chitosanase. A protein lacking the repeated sequence (*CsnCAR3*) was also expressed and used for kinetic analysis. The repeated sequence was found to be involved in binding of the enzyme to insoluble substrate chitosan.

Environmental DNA was prepared from microorganisms in soil amended with chitin. A part of 16S ribosomal DNA was PCR-amplified by using the environmental DNA as a template. The resulting DNA fragments were fractionated by a denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE). The intensities of several DNA bands increased significantly after addition of chitin. Determination of nucleotide sequence of these DNA fragments indicated that most of them showed a similarity to 16S rDNA sequences derived from unculturable bacteria deposited in the database.

研究目的

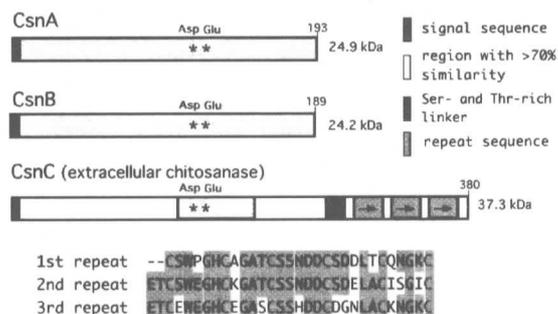
豊富に存在するバイオマスであるキチン・キトサンの有効利用・高機能化を目指し、微生物酵素による変換を試みる。具体的には、カニ・エビ殻に代わる新たなキチン・キトサンの供給源として菌類（カビ・キノコ）のキチン・キトサン合成酵素に着目し、酵素反応を制御することによって分子量やアセチル化度を調整した高機能性キチン・キトサンを素材として供給することを検討する。また、自然界の未利用微生物資源（培養不能微生物）から新規キチン・キトサン変換酵素を探索することを目的として、土壌サンプルから環境DNAを調製し、遺伝子のスクリーニングを行う。

一年間の研究内容と成果

1. 麹菌キトサナーゼの機能解析

麹菌ゲノムより3種類のキトサナーゼ遺伝子 (*csnA*, *csnB*, *csnC*) を単離した。遺伝子配列を解析した結果、*csnA* と *csnB* は互いに高い相同性を示すが、*csnC* は低い相同性しか示さなかった。*csnC* はもっとも大量に発現している分泌型酵素をコードするが、他の菌類キトサナーゼとは異なり、活性ドメインのC末端側にセリン・トレオニン残基に富むリンカー領域を介して、3回の繰り返し配列からなるドメイン構造を有していた。この繰り返し部分の配列はデータベース上に登録されていない新規の配列であった。この繰り返し構造の機能を解析するために、*csnC* mRNA から reverse transcriptase-PCR により成熟酵素タンパクに相当する cDNA を合成した。この cDNA を酵母 *Pichia pastoris* の発現系に

導入した結果、活性ある組換えキトサナーゼの分泌を確認した。同時に、繰り返し構造を欠損させた *Csn ΔR3* と繰り返し構造のみからなる *R3(CsnC)* の両タンパクも発現させ精製した。*CsnC* と *R3(CsnC)* は、還元剤処理を行うと SDS-PAGE における移動度がシフトするため、繰り返し領域でジスルフィド (S-S) 結合が形成されることが推定された。また、*CsnC* はパウダー状キトサンへの吸着を示したが、*Csn ΔR3* では吸着しなかったことより、繰り返し領域は不溶性基質への吸着に関与することがわかった。



Domain structure of extracellular chitosanase from *A. oryzae*

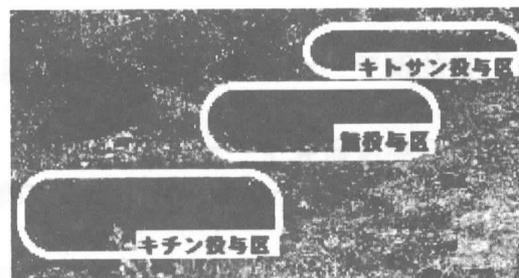
## 2. 土壌へのキチン投与がもたらす微生物群変動過程の DNA を指標とする解析

新規なキチン変換酵素を得るために、土壌へのキチン質投与が微生物相に与える影響を調査した。2004年5月に試験区土壌にフレーク状キチンを1%混和し、10月まで定期的に土壌サンプルを採取した。試験期間中に添加キチンの約60%が微生物のはたらきにより分解消失した。土壌サンプルより直接抽出した環境DNA（培養不能菌を含むすべての微生物に由来する）を用いて、真性細菌の16S ribosomal DNAを標的としたプライマーでPCRを行い、470 bp DNA断片の増幅を確認した。このPCR増幅断片を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)により分離した結果、キチン投与後に経時的に増大するバンドを複数確認した。これらのバンドをゲルから切り出し、DNAを抽出した後に再度PCRを行い増幅断片の塩基配列を決定した。データベース検索にかけた結果、多くの配列が未同定の培養不能細菌由来の配列に高い相同性を示した。一方、同じ試験区土壌より、コロイダルキチンを単一炭素源とする合成培地を用いてスクリーニングを行ったところ、分離菌はいずれも *Streptomyces* 属、*Amycolatopsis* 属の放線菌であった。したがって、キチン投与土壌において優勢に出現するキチン分解菌の中には、未同定の難培養細菌が多種類含まれることがわかった。

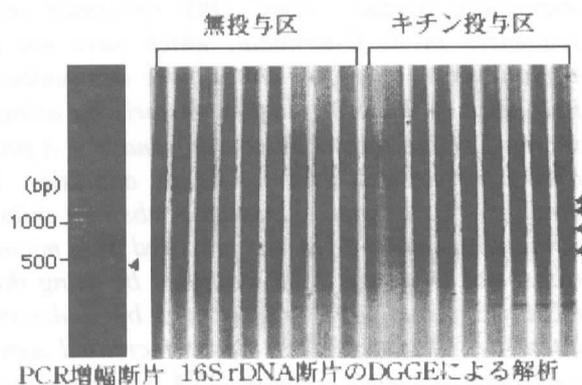
### 展望

麹菌キトサナーゼのドメイン構造と基質結合性に関する情報を基にして、キトサンからのオリゴ糖調製の条件検討を進めていきたい。また、既に報告済みのエキソ型酵素 N-アセチルグルコサミニダーゼを組み合わせることによって、キトサンを構成糖であるグルコサミンにまで分解することも可能である。麹菌は古くより醸造に使われる安全性の高い株であり、これらの生成物を食品素材として利用することを検討したい。

土壌へのキチン投与は多種類の細菌の増殖を活性化するが、そのほとんどは未同定の培養不能細菌であることがわかった。これらの未同定細菌は新規なキチン分解酵素を生産することが予想される。今後、キチン投与土壌から調製した環境 DNA を用いて大腸菌を宿主としたライブラリーを作成し、キチン分解酵素遺伝子の単離を行う。基質特異性や耐熱性などの面で、既存酵素を越える好ましい性質をもつ酵素を大腸菌で大量発現させ、バイオマスであるキチンの変換・有効利用への展開をはかりたい。



キチン・キトサン投与試験区



PCR増幅断片 16S rDNA断片のDGGEによる解析

環境DNAによる土壌微生物群変動過程の解析