

酵素法によるキチン・キトサンからの有用オリゴ糖生産 -Burkholderia 属細菌のキチン・キトサン分解酵素の利用-

○下坂 誠, 岡崎光雄, 田口悟朗*, 小平律子
信州大学繊維学部応用生物科学科, *信州大学遺伝子実験施設

1. 緒言

豊富に存在するバイオマスであるキチン・キトサンを分解して得られるオリゴ糖の生理活性を調べ、その有効利用をはかるために、微生物の生産する酵素キチナーゼ・キトサナーゼに注目した。既に、キチン・キトサンの強力な分解細菌である *Burkholderia gladioli* CHB101 株を土壌より分離同定し、本株が生産するキチナーゼ・キトサナーゼを精製し、その性質を調べた。これら酵素のオリゴ糖生産への利用をはかるため、酵素の大量生産およびタンパク工学的的手法による酵素機能の改良を目指して、各酵素遺伝子のクローニングを行った。

2. 実験方法

B. gladioli CHB101 株染色体 DNA を制限酵素 *Sau* 3AI で部分消化した断片をプラスミドベクター pUC119 の *Bam* HI 部位に組み込み大腸菌 JM109 株に形質転換した。キトサンを含有した選択培地上で周辺に溶解斑を生じるコロニーを選抜した。クローニングされた断片は、ダイデオキシ法により、島津 DNA シークエンサ DSQ-2000L を用いて塩基配列を決定した。得られた配列のホモロジー解析は、Genetyx 遺伝子解析システム (ソフトウェア開発) により行った。

3. 結果と考察

CHB101 株が生産する2種類のキチナーゼ、1種のキトサナーゼの性質について、これまで明らかになったものをまとめた (Table 1)。併せて、クローニングされた遺伝子との対応を明らかにするため、精製酵素の N-末端アミノ酸配列を決定した。

これらの酵素の中で、特にキチナーゼ A が、キチン・キトサンからのオリゴ糖生産への利用という面で好ましい性質を有していた。すなわち、1) 高分子キチンはほとんど分解せず、高分子キトサン (低アセチル化度) は良く分解す

	キチナーゼ A	キチナーゼ B	キトサナーゼ A
分子量	30 kDa	26 kDa	28 kDa
基質特異性			
コロイダルキチン	×	○	×
グリコールキチン	×	○	×
キトサン (D.A.30%)	○	○	○
キトサン (D.A.0%)	×	×	○
GlcNAcオリゴマー	○ (3量体以上)	○ (3量体以上)	×
GlcNオリゴマー	×	×	○ (5量体以上)
切断様式	エンド型	エンド型	エンド型
最終反応生成物	(単量体) 2量体	(単量体) 2量体	2量体 3量体 (4量体)
N末端アミノ酸配列	AACNFKVWS	ALPSNIFSA	ALDHDANFS

Table 1. Properties of two chitinases and one chitosanase from *B. gladioli* CHB101

る、2) 高分子キトサン (アセチル化度 0% およびグルコサミン (GlcN) オリゴ糖は分解しない、3) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) オリゴ糖は分解する。これらの性質から、キチナーゼ A は、低アセチル化度キトサン中の GlcNAc-GlcNAc 間、および GlcNAc-GlcN (または GlcN-GlcNAc) 間の結合を切断し、GlcN-GlcN 間結合は切断しないことが明らかとなった。従って、アセチル化度 10% のキトサンを基質に用いることにより、最終反応産物として 9 量体程度の GlcN オリゴ糖を得られることが予想された (Fig. 1)。このオリゴ糖は、従来の化学法・酵素法によって得られるもの (3-6 量体) よりも重合度が高く、その生理活性に興味を持たれる。

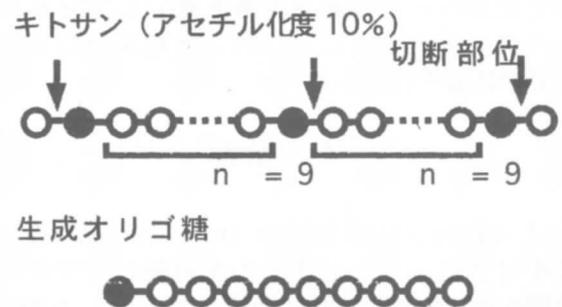


Fig. 1 Enzymatic production of chitosan oligomers using chitinase A

CHB101 株染色体 DNA 断片をベクター pUC119 を用いて、大腸菌 K12 株にショットガンクローニングし、約 20,000 個のコロニーをスクリーニングした結果、20 個のコロニーの周辺に培地中のキトサン分解による溶解斑が確認できた。これらの株からプラスミド DNA を調製し、ベクターに組み込まれた染色体 DNA 断片を解析した結果、3 種類の断片の存在が明らかとなった。このうちの 1 つはキトサナーゼ A をコードしていることは、推定アミノ酸配列が他の細菌のキトサナーゼ配列と高い相同性を示すこととともに既に報告済みである。

今回、他の 2 つのクローンを解析し、それぞれキチナーゼ A と B に相当することを確認した。遺伝子解析の結果、明らかとなった各酵素のドメイン構造をキトサナーゼ A も含めて Fig. 2 にまとめた。

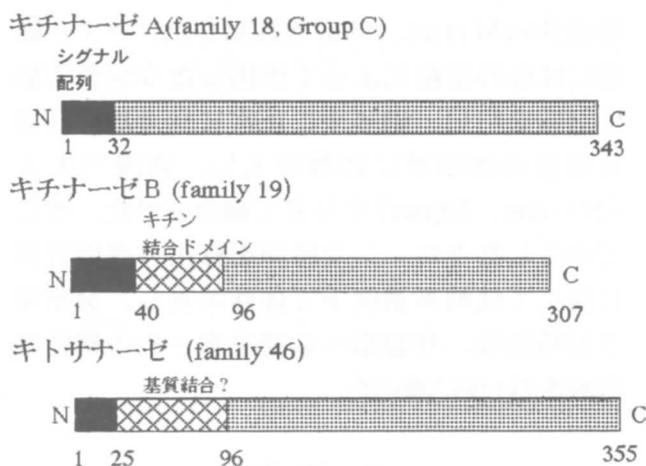


Fig. 2. Domain structure of chitinases and chitosanase from *B. gladioli* CHB101

キチナーゼ A は、344 アミノ酸残基からなり、N 末端に 31 アミノ酸からなるシグナル配列を有していた。成熟酵素のアミノ酸配列には、一般に微生物キチナーゼ(family 19 に分類される)に保存された活性中心を形成する配列が存在した。しかし、全領域についてみると、細菌の中でも酵素学的性質の報告がほとんど無い稀少グループに属するキチナーゼであった。キチナーゼ A は高分子キチンには作用しない特異な酵素であったが、本酵素は、反応特性のうえでも一般の細菌キチナーゼとは異なったものと考えられる。

キチナーゼ B は、307 アミノ酸残基からなり、N 末端に 39 アミノ酸からなるシグナル配列、さらに 54 残基からなるキチン結合ドメインに類似の配列を有していた。成熟酵素の活性ドメインのアミノ酸配列は、微生物キチナーゼ(family 18)とは相同性を示さず、植物キチナーゼ(family 19 に分類される)に高い相同性を示した。キチナー

ゼ B は、本来微生物には見られないタイプのキチナーゼであり、本酵素の分子進化および機能分化を考える上で興味深い。さらに、キチナーゼ B の成熟酵素 N 末端に存在するキチン結合ドメインが、本酵素タンパクの不溶性基質(コロイダルキチン)への結合と、効率よい分解に必須のものであることを証明した。

今後は、キチナーゼ遺伝子を大腸菌で発現させて酵素を大量に得ること、キトサンの酵素分解により得たオリゴ糖の生理活性を調査することが課題である。これにより、キチン・キトサンオリゴ糖の防腐剤、食品添加物としての用途開発を検討する。また、キチナーゼ B については、カビ細胞壁の溶解を通じて抗菌活性を示すことが予想されたので、抗菌剤としての用途についても検討したい。

4. 結論

B. gladioli CHB101 株が生産する 2 種のキチナーゼと 1 種のキトサナーゼを精製し、その性質を明らかにするとともに、各酵素遺伝子をクローニングした。各酵素は、アミノ酸配列の上でも全く相同性を示さない独立に進化した酵素と考えられた。また、キチナーゼ A は、高分子キチンには作用しないという特異な性質を示し、キトサンからのオリゴ糖生産に有望な酵素と考えられた。