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・キトサン分解系について-

下坂　誠，岡崎光雄，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，土壌よりキチン・キトサンの強力な分解能力をもつ細菌を分離し，同定試験の結果，本株を *Burkholderia gladioli* CHB101 株と名付けた． CHB101 株が生産するキチナーゼ・キトサナーゼを精製し，その性質を調べることにより，本株によるキチン・キトサン分解機構を解明し，オリゴ糖生産への利用の可能性について検討することとした．また，酵素の大量生産およびタンパク工学的手法による酵素機能の改良を目指して，遺伝子のクローニングを行った．

2．実験方法

CHB101 株をグルコースを炭素源とした合成培地を用いて培養し，培養上清中のキチン・キトサン分解酵素を各種クロマトグラフィーにより精製した．活性測定は，基質にグリコールキチンあるいはキトサン（アセチル化度 30％）を用い，基質分解によって増加する還元糖量を Schales 法により測定した．キチン・キトサン分解酵素遺伝子の単離は，CHB101 株染色体 DNA を大腸菌を宿主にショットガンクローニングし，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することにより行った．

3．結果と考察

CHB101 株は培地の炭素源によらず，キチン・キトサン分解酵素を構成的に生産し，培地中に分泌した．これまでに報告のある細菌のキチナーゼ・キトサナーゼのほとんどが誘導型の酵素であり，培地への基質添加が必要であるのに比べて，CHB101 株の酵素は安価な培地でも生産できるため酵素の利用を考えるうえでは好都合である．

培養上清には，少なくとも 3 種類のキチン・キトサン分解酵素の存在が確認できた (Fig. 1)．これら 3 種の酵素を精製し，その性質よりキチナーゼ A，キチナーゼB，キトサナーゼ A と命名した（Table）．キチナーゼ A は，オリゴマーを基質に用いた分析から，グルコサミン間（GlcN-GlcN）の結合は切断せず， N-アセチルグルコサミン間（GlcNAc-GlcNAc）の結合を切断することを確認した．しかし，一般的にキチナーゼが基質とする高分子のキチンをほとんど分解しないという特徴を示した．キチナーゼ B は，コロイダルキチンを分解し，最終生成物として GlcNAc2 量体と若干の GlcNAc が検出できた．キトサナーゼ A は，GlcN-GlcN 結合を切断するが，GlcNAc-GlcNAc は切断しなかった．また，アセチル化度 0％のキトサンをエンド型様式で分解し，最終生成物として GlcN の 2 量体から 4 量体の混合物を与えた．

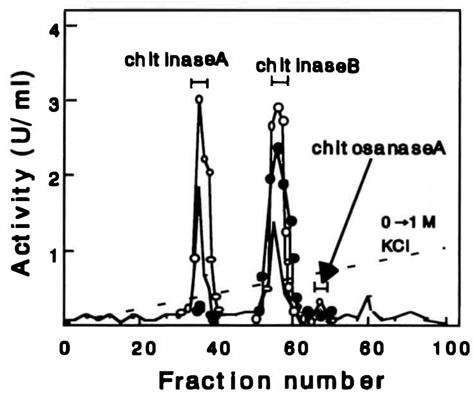

Fig. 1　Elution profile of chitin- and chitosan-degrading enzymes from CM-Sepharose CL-6B column chromatography. —: Absorbancy at 280 nm, ―○―: activity against chitosan (degree of acetylation 30%), ―●―: activity against glycol chitin.

CHB101 株は，これら基質特異性の異なる３種の酵素の共同作用により幅広いキチン・キトサン基質を分解利用できることが明らかとなった．今後，これら酵素の性質の違いを利用することにより，キチン・キトサンからのオリゴ糖生産反応系の構築を検討していきたい．

Table. Properties of chitin-and chitosan-degrading enzymes produced by *B. gladioli* CHB101

	chitinase A	chitinase B	chitosanase A
Molecular weight	30 kDa	26 kDa	28 kDa
Substrate specificity	chitosan (D.A.20-30%) (GlcNAc)n≧3	glycol chitin chitosan (D.A.20-30%) (GlcNAc)n≧3	chitosan (D.A.0-30%) (GlcN)n≧5
Cleavage pattern	endo	endo	endo
Final product	(monomer) dimer	(monomer) dimer	dimer trimer (tetramer)

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班が確認できた．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．CHB101 株より精製した３種類のキチン・キトサン分解酵素に対応した遺伝子がクローニングできたものと考えられた．

このうち，１つのプラスミドの挿入断片について，キトサナーゼ活性発現に必要な領域を探り，塩基配列を決定した．その結果，355 アミノ酸よりなるオープンリーディングフレームが見つかり，内部には精製キトサナーゼ A を用いて決定した N 末端アミノ酸配列に一致する配列が見いだされたことから，この DNA 断片にキトサナーゼ A 遺伝子が存在することが確認できた．推定されたアミノ酸配列をホモロジー検索にかけたところ，細菌由来のキトサナーゼ配列と相同性を示し，特に，*Bacillus circulans* MH-K1 株のキトサナーゼとは 80%の高い相同性を示した．また，活性中心として同定されているグルタミン酸とアスパラギン酸残基も保存されていた．

今後は，他の２つのクローンに含まれると考えられるキチナーゼ遺伝子の構造を明らかにし，２種のキチナーゼの役割分担について調査を行いたい．さらに，各遺伝子をそのまま或いは修飾した形で大腸菌で発現させ，酵素タンパク質のドメイン構造と活性の関係を明らかにしたい．

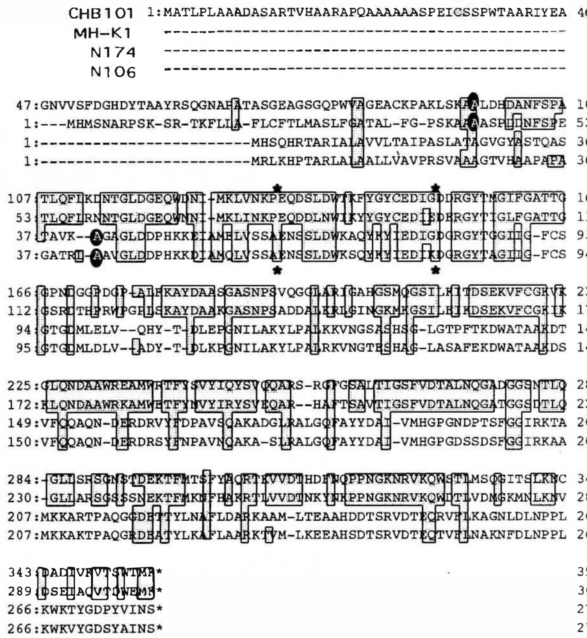

Fig.2 Alignment of amino acid sequences of bacterial chitosanases.
Numbers at both ends of sequences indicate amino acids residue number from N-terminus. Amino acid residues identical to CHB 101 chtosanase A are shadowed. The closed circles indicate the N-terminal amino acid residue of the mature chitosanase. Asp and Glu residues involved in the catalytic site are indicated by' *'. The sequence segments aligned here are from *Burkholideria gladioli* CHB 101 chitosanase A, *Bacillus circulans* MH-K1 chitosanase, *Streptomyces sp.* N174 chitosanase, *Nocaradioides sp.* N106 chitosanase.

４．結論

Burkholderia gladioli CHB101 株が培地中に分泌する３種類のキチン・キトサン分解酵素，キチナーゼ A，キチナーゼ B，キトサナーゼ A を精製し，その性質を明らかにした．キチナーゼ A は，GlcNAc オリゴマーを分解したが，高分子のコロイダルキチンはほとんど分解しないという，他のキチナーゼには見られない特徴を示した．CHB101 株の染色体 DNA より，大腸菌宿主内でキトサン分解活性を発現する DNA 断片を３種類単離した．そのうちの一つを解析した結果，キトサナーゼ A 遺伝子を含み，推定されたアミノ酸配列は，既に報告のある細菌由来のキトサナーゼのアミノ酸配列と高い相同性を示した．