

下坂 誠、小平律子

目的別テーマ：天然繊維の高機能化と応用

15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 an extracellular chitosanase was isolated from the koji mold, Aspergillus oryzae, and a complete nucleotide sequence was determined. Chitosanase cDNA derived from the fungus Fusarium solani was expressed in Saccharomyces cerevisiae. By using this expression system, two amino acid residues responsible for catalysis were determined, and an inverting-type reaction mechanism was also confirmed.

A group of genes specifically expressed at the stage of fruit body development was isolated from the basidiomycete Flammulina velutipes. One of the genes encoded a polypeptide having a primary sequence similar to those of polysaccharide deacetylases.

A metagenome library was constructed from chromosomal DNAs prepared from whole bacterial cells in soil. From this library, E. coli transformant exhibiting a red fluorescent light was isolated and a gene structure in the cloned DNA fragment was analyzed.

研究目的

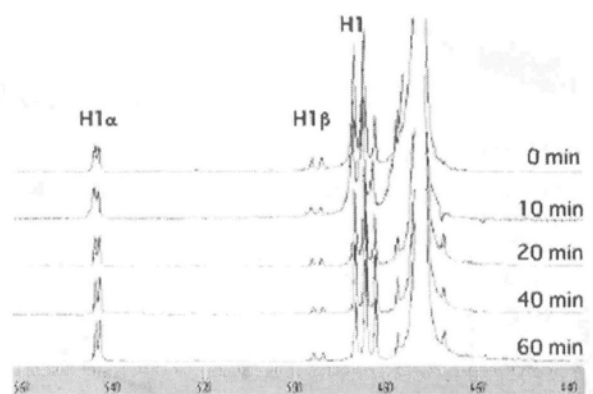
バイオマスであるキチン・キトサンの有効利用・高機能化を目指し、微生物酵素による変換を試みている。具体的には、カニ・エビ殻に代わる新たなキチン・キトサンの供給源として菌類（カビ・キノコ）のキチン・キトサン合成酵素に着目して、分子量やアセチル化度を制御した高機能性キチン・キトサンを調製し、素材として供給することを検討する。また、新たな性質をもつキチン・キトサン変換酵素を得るべく、自然界の未利用微生物資源（培養不能微生物）の遺伝子について探索を行う。

一年間の研究内容と成果

1. 菌類のキチン・キトサン変換酵素

1) カビのキトサン分解酵素

麹菌（コウジカビ）が強力なキトサン分解酵素を分泌することを見だし、エンド型酵素キトサナーゼとエキソ型酵素β-グルコサミニダーゼを精製した。このうち、キトサナーゼをコードする遺伝子（*csnC*）を単離し構造を決定した。また、既に単離したフザリウム菌 *Fusarium solani* のキトサナーゼ cDNA を酵母細胞で発現させることに成功した。これにより、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。



¹H-NMRによる反応機構の解析

2) エノキタケのキチン変換酵素

担子菌キノコの子実体形成機構を遺伝子レベルで解明するために、エノキタケより子実体誘導期に特異的に発現する遺伝子群を多数分離した。この中にキチンをキトサンに脱アセチル化する酵素に類似した遺伝子を見いだした。この遺伝子は、子実体形成期に強く発現することから、子実体の細胞壁や胞子壁に含まれるキチンの脱アセチル化に関与している可能性がある。

2. 未利用微生物資源からのキチン・キトサン変換酵素の探索

自然環境中に存在する微生物のうち、これまでに分離同定されたものはわずか1%にすぎないと言われている。残りの微生物の多くは培養不能なため研究対象となっていない。これらの未同定微生物群より、キチン・キトサン変換酵素をはじめとする有用酵素遺伝子の探索を試みた。種々の土壌より直接微生物細胞を回収し、これより調製したゲノム DNA を用いて大腸菌を宿主とするメタゲノムライブラリーを作成した。このライブラリーより分離された赤色蛍光化合物を作り出す遺伝子について、その構造を決定した。



エノキタケの子実体形成過程

展望

麹菌は、古くより醸造に使われる安全性の高い株である。麹菌キトサナーゼにより、キチン・キトサンを加工して食物繊維などの食品素材を調製することが可能である。菌類キトサナーゼ遺伝子を酵母宿主で大量発現させることが可能になったので、酵素を結晶化させ X 線回析による立体構造決定を行いたい。

エノキタケより単離した脱アセチル化酵素類似遺伝子については、異種宿主で発現させ酵素活性を確認する必要がある。本酵素が、キチンを基質として脱アセチル化反応を行うのであれば、キチンからのキトサン生産への利用を検討したい。また、エノキタケより単離した子実体形成期にはたらく遺伝子群を解析することにより、キノコ人工栽培法の開発と効率化に活かしたい。

自然界の微生物群から直接 DNA を調製しライブラリー化する手法を展開して、新規キチン・キトサン変換酵素の探索のみならず、環境浄化やバイオマス変換に関与する微生物群の解析も行いたい。