

# 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

17 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

Using fluorescence differential display, cDNAs specifically expressed at the primordial stage of fruiting body development were isolated from the basidiomycete, *Flammulina velutipes*. Out of 75 cDNAs that were sequenced, one cDNA showed a significant similarity to microbial genes coding for polysaccharide deacetylase. A full-length cDNA (*Fv-pda*) was isolated and expressed in the yeast *Pichia pastoris*. The resulting recombinant protein catalyzed a deacetylation of chitin-related compounds, such as  $\beta$ -1, 4-linked oligosaccharides of *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), colloidal chitin, and partially acetylated chitosan.

Environmental DNA was prepared from soil amended with chitin or chitosan. During test period (from May to November), more than half of chitin or chitosan initially added were degraded by the action of soil microorganisms. Genes coding for 16S ribosomal DNA was amplified by PCR, and fractionated by a denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE). Nucleotide sequences were determined for the 16S rDNA bands that appeared during the test period and compared to the sequences deposited in the database. As a result, more than 50% of the sequences were originated from unidentified bacteria belonging to the phyla of  $\gamma$ -proteobacteria.

## 研究目的

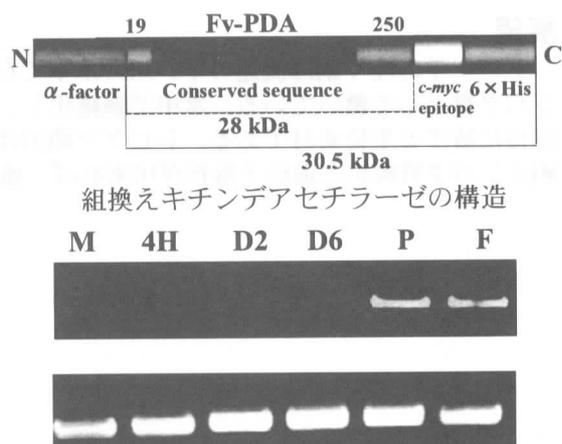
地球上でセルロースに次いで豊富に存在するバイオマスであるキチン・キトサンの有効利用・高機能化を目的とした酵素変換を試みる。第一に、菌類（カビ、キノコ）のキチン・キトサン合成酵素に着目し、酵素反応を制御することによって均一の分子量およびアセチル化度を有するキチン・キトサンの生産を検討する。第二に、自然界の未利用微生物資源（難培養性微生物）から新規なキチン・キトサン変換酵素の探索を行う。特に、耐熱性や耐酸性に優れた分解酵素、一定の範囲の重合度のオリゴ糖を生産する分解酵素を対象とする。

## 一年間の研究内容と成果

### 1. 担子菌エノキタケのキチンデアセチラーゼについて

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* を実験材料に用いて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。子実体誘導処理前の栄養菌糸体と誘導処理後 10 日目の子実体原基の双方から mRNA を調製し、differential display 法により後者でのみ特異的に発現する cDNA を多数単離した。75 個の cDNA について塩基配列を解読した結果、そのうちの 1 個がコードすると推定されたポリペプチドが菌類の polysaccharide deacetylase (PDA) と相同性を示した。菌類 PDA の多くは自己細胞壁キチンを基質として認識し、脱アセチル化反応によりキトサンを作り出すことに注目し、本遺伝子 (*Fv-pda*) について解析した。

エノキタケのゲノム DNA より全長の *Fv-pda* 遺伝子を単離し、その塩基配列を決定した。*Fv-pda* ORF は 250 アミノ酸残基からなるポリペプ



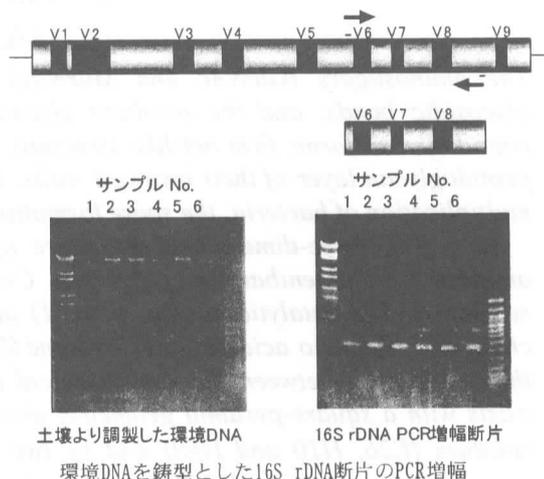
キチンデアセチラーゼ遺伝子の発現パターン (A) chitin deacetylase, (B) glycerol-3P dehyd-drogenase; M: 栄養菌糸体, P: 子実体原基, F: 成熟子実体

チドをコードし、10ヶ所のイントロンにより分断されていた。*Fv-pda*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、子実体原基以降で強く発現した。また、成熟子実体の傘、柄、石突き全ての部位で発現が確認され、特に柄において強く発現することから、*Fv-pda*の遺伝子産物が子実体形成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たが、ペプチドグリカンに対しては活性を示さなかった。以上の結果より、FV-PDA は chitin deacetylase (CDA) であることがわかった。

## 2. 土壌へのキチン・キトサン投与がもたらす微生物群変動過程の解析

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、環境中から直接調製した DNA (環境 DNA) を解析する手法が有効である。そこで、キチンおよびキトサンを実際に土壌に投与し、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、DGGE 法によって DNA 断片を分離することにより、各試験区土壌中の細菌種の変動パターンを視覚化した。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について塩基配列を解読した。



解読を終えた 23 配列のうち、17 配列が  $\gamma$ -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。特に試験期間の初期に *Cellvibrio* 属細菌由来バンドが増大したことから、これらの細菌がキチン・キトサンの分解において重要な役割を担っていると思われる。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 を行った結果、*Janthinobacterium lividum* 由来キチナーゼと 74% の相同性を示す増幅断片が得られた。

## 展望

エノキタケのキチンデアセチラーゼは、キチンオリゴ糖やその修飾誘導体の脱アセチル化反応へ利用することにより、種々の機能性を有する糖質の調製が期待できる。この点を検証するためには、組換え酵素の安定な高生産系が必要であり、*P. pastoris* に代わる宿主発現系も検討課題である。

土壌中でキチン・キトサンの分解にはたらく細菌種の多くが難培養性の未知種であることがわかった。培養条件の工夫により、これらの細菌を培養することができれば、新規なキチナーゼを得ることも可能である。併せて、環境 DNA を大腸菌などの宿主にクローニングし、活性発現を指標としたキチナーゼ遺伝子のスクリーニングを検討したい。

麴菌キトサナーゼの C 末端に存在する 3 回繰り返し配列からなるドメインはキチン結合能をもつことを昨年度報告した。今年度の研究により、大腸菌を宿主とする異種遺伝子発現において、この繰り返し配列ドメインが組換えタンパク質の可溶性・安定化にはたらく可能性が示された。この効果を種々のタンパク質について調査し、汎用性があれば有用な発現ベクターの構築に結びつけたい。