

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580107

研究課題名(和文)新規キチン分解酵素を用いたキチン質バイオマスからの有用糖質素材の生産

研究課題名(英文)Production of useful saccharides from chitin using novel chitinolytic enzymes

研究代表者

下坂 誠 (SHIMOSAKA, Makoto)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：90187477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：キチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* SAY3株の全ゲノム配列を解読し49個のキチン分解酵素遺伝子を検出した。この中から以下の新規酵素をコードする遺伝子を見出した。ChiGはエンド型の分解酵素であるが、キチンをN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)まで完全に分解した。ChiJ、ChiKは基質の非還元末端側からGlcNAc 2量体を連続的に切り出すprocessive型の反応を示した。ChiLは顕著な糖転移活性を示した。Chi33は加水分解ではなく酸化型分解を触媒した。SAY3株の未知遺伝子の機能を探るため、相同組換えによる目的遺伝子の破壊法を確立した。

研究成果の概要(英文)：The novel chitinolytic bacterium, *Chitiniphilus shinanonensis* strain SAY3 was isolated and identified. Draft sequence of SAY3 genomic DNA revealed a presence of 49 putative genes coding for enzymes related to chitin degradation. Investigation of the recombinant proteins obtained by expression of these genes in *Escherichia coli* clarified novel types of chitinolytic enzymes as follows. The enzyme ChiG catalyzed an endo-type cleavage of chitin, however, it gave N-acetylglucosamine (GlcNAc) alone as a final product. ChiJ and ChiK catalyzed a processive-type reaction releasing GlcNAc dimer from the reducing-end of substrates. ChiL predominantly exhibited a trans-glycosylation activity. Chi33 is a lytic polysaccharide monooxygenase rather than a glycosyl hydrolase. Disruption of objective genes mediated by homologous recombination was achieved, which would be a promising tool to clarify a physiological function of the proteins encoded by unknown genes.

研究分野：応用微生物学

キーワード：キチナーゼ キチン N-アセチルグルコサミン 糖質加水分解酵素 遺伝子破壊 キチン分解細菌

1. 研究開始当初の背景

キチンは N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が β -1,4 結合した直鎖状多糖であり、地球上ではセルロースに次ぐ豊富なバイオマスである。高分子キチンは結晶性が高く水に不溶である。キチンは医用素材、繊維素材、農業用土壌改良剤として広く用いられている。一方、キチンの加水分解によって得られる単糖 GlcNAc は甘味料やサプリメントとして用いられ、GlcNAc オリゴ糖も免疫賦活作用などの生理活性を有することから注目されている。これらの糖質は、キチンの強酸による化学分解法で工業生産されてきた。しかし、アセチル基の脱離が同時に起こること、廃液処理のコストが高い、という難点を有している。微生物由来のキチン分解酵素の利用は、上記の化学分解法に換わるキチン分解法として注目されてきたが、未だ実用に値する効率的な酵素分解系は得られていない。この問題の解決には、自然界においてキチン分解を担っている強力なキチン分解細菌を分離し、当該細菌のキチン分解酵素系をトータルに解明し活用することが必要と考える。

2. 研究の目的

研究代表者は、異なる環境に由来する細菌を混合してキチン分解細菌群を構築する手法で、未知のキチン分解細菌種の分離に成功した(図1)。本株は *Neisseriaceae* 科に属する新属新種の細菌であることが判明し、学名 *Chitiniphilus shinanonensis* を提唱し基準株 SAY3^T 株を登録した(引用文献)。本研究は、SAY3 株が示す強力なキチン分解能に着目し、重要な構成要素(キチン分解酵素と関連タンパク質)を明らかにすることを目的とした。最終的には、これらの要素タンパク質を組み合わせて最適化を図り、キチン質バイオマスの効率的な酵素分解プロセスを組み立て、GlcNAc およびそのオリゴ糖を効率的に生産することをねらいとした。

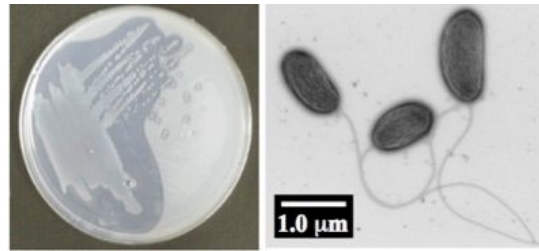


図1. *C. shinanonensis* SAY3 株のキチン培地における増殖と電子顕微鏡写真

3. 研究の方法

(1) キチン分解関連酵素をコードする候補遺伝子の探索

次世代 DNA シークエンサにより SAY3 株ゲノム DNA 塩基配列を解読した。公開のソフトウェアを用いて、オープンリーディングフレーム(ORF)の予測、モチーフ配列およびドメイン構造の推定、既知タンパク質アミノ酸配列との相同性検索を行った。

(2) 組換えタンパク質の発現

大腸菌宿主の発現ベクター(pCold, pET シリーズ)を用いて候補遺伝子を発現させ、精製した組換えタンパク質のキチン分解活性を調査した。

(3) キチン分解活性の測定

コロイダルキチンを基質に用いた加水反応で生じる還元糖の増加量で評価した。また、GlcNAc オリゴ糖を基質に用いた際の生成物を HPLC で分析し分解様式を調査した。

(4) 遺伝子破壊株の作成

グラム陰性広宿主域ベクター-pMo130(引用文献)を用いて、大腸菌からの接合伝達と SAY3 株ゲノムとの相同組換えを利用して、目的遺伝子の破壊株を作成した。

4. 研究成果

(1) SAY3 株が保持するキチン分解関連酵素遺伝子の探索

これまでにフォスミドベクターを用いて大腸菌を宿主とするゲノムライブラリーを構築した。キチン分解活性を指標とした発現スクリーニングにより 15 個のキチン分解関

連酵素遺伝子を見出した(引用文献)。しかし、SAY3株ゲノムDNAのGC含量が67.6%と高いため、大腸菌宿主内でのタンパク質発現効率が低く、スクリーニングに漏れた遺伝子の存在が予想された。そこで、全ゲノムのドラフト配列を決定し、網羅的にキチン分解関連酵素遺伝子を探した。

シーケンスの結果、 4.16×10^6 塩基からなる全ゲノムドラフト配列(1 kbp以上のcontig数は86個)が得られた。総計3,278個のORFが予測され、その中から既知の15遺伝子(*chiA-chiO*)に加えて、新たに34個のキチン分解関連候補遺伝子(*chi1-chi34*)が見出された。これら遺伝子から予測されたコードタンパク質のドメイン構造を図2に示した。これまでに報告のあるキチン分解細菌の遺伝子数は多くても十数個であり、SAY3株は49個もの遺伝子を有することからキチン分解に特化した株であることが推定された。

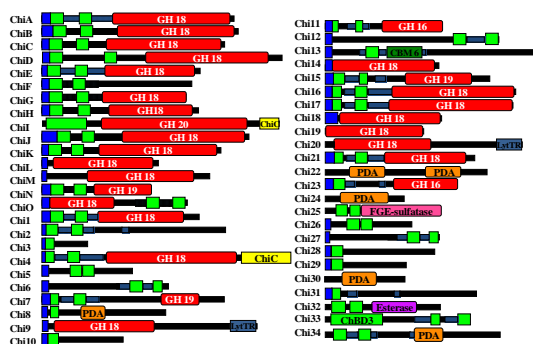


図2 .SAY3株が保持するキチン分解関連候補タンパク質のドメイン構造

(2) 組換えタンパク質のキチン分解活性に関する調査

これまでにSAY3株から見出した49個のキチン分解関連候補遺伝子のうち、約7割の遺伝子について大腸菌で発現させ、得られた組換えタンパク質の性質を調べた。その結果、以下に示すユニークな性質の酵素が見出された。

ChiGはアミノ末端側に2個のキチン結合ドメイン、カルボキシ末端側に糖質加水分解

酵素ファミリー18(GH18)の触媒ドメインとわずかな相同性を示す配列が存在した。組換え ChiG はキチンや GlcNAc の 2~6 量体を GlcNAc 単量体にまで完全分解した。GlcNAc 6 量体に対する分解過程を HPLC で分析したところ、反応初期には単量体と 5 量体を生じており、かつ単量体から 5 量体の反応生成物のいずれも β アノマー型が α アノマー型よりも高い存在比を示した(図3)。この結果より、ChiG は GlcNAc オリゴ糖内部のいずれのグリコシド結合もアノマー配位を保持する retention 型に切断することが明らかとなった。ChiG の示した切断様式は、これまでのキチナーゼに見られないユニークなものである。本酵素を用いれば、単純な一段階反応でキチンから GlcNAc を生産することが期待できる。

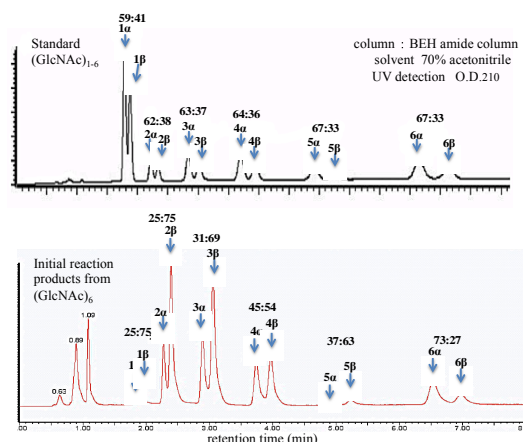


図3 . ChiGによるGlcNAc6量体分解初期反応の生成物分析結果

ChiJ, ChiKはGH18と相同な触媒ドメインを有していたが、エンド型の加水分解よりも非還元末端側からGlcNAc2量体を連続的に切り出す processive 型の反応特性を示した。

ChiLはGH18触媒ドメインのみから構成され、高分子キチンに対する分解活性は弱かった。興味深いことにGlcNAc3量体を全て2量体のみに変換する顕著な糖転移活性を有していた。組換え ChiL の結晶を得ることに成功しており、今後酵素の立体構造と本酵素の糖転移反応機構を明らかにする予定である。

Chi33 は不溶性の基質キチンに強く結合し、還元糖生成を伴わずに基質の低分子化が起こったことから、加水分解ではなく酸化型の分解を触媒することがわかった。本酵素は結晶性キチン基質の分解初期反応において重要な役割を果たしていることが予想された。

(3) SAY3 株における遺伝子破壊法の構築

グラム陰性広宿主域ベクター pMo130 を用いて、挿入遺伝子断片と SAY3 株ゲノム DNA との間で相同組換えを起こさせることにより、目的遺伝子を完全に破壊できることを確認した(図4)。本技術は、SAY3 株が保持する未知遺伝子の機能を探る上で有効なツールとなる。実際にエキソ型酵素 N-アセチルグルコサミニダーゼ (GlcNAcase) をコードする唯一の GH20 遺伝子である *chil* の破壊株を作成したところ、2%程度の残存活性を示したことから第二の GlcNAcase の存在が明らかとなった。

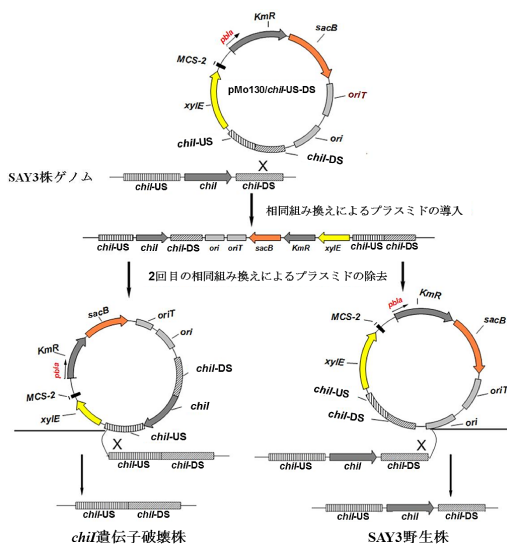


図4 . 相同組換えを利用した *chil* 遺伝子破壊株の作成過程

(4) 今後の展望

本研究により、*C. shinanonensis* SAY3 株は多種多様なキチン分解関連酵素を生産することにより強力なキチン分解能を有することが明らかとなってきた。今後は、トランス

クリプトーム解析によって、実際にキチン分解に関与している遺伝子を明確にすることが課題である。このうち、機能未知の遺伝子について、キチン分解における該当遺伝子産物の役割を調べることが必要である。自然環境中で細菌がキチン質を効率よく分解利用している戦略に学ぶことによって、天然キチン質の効率的酵素分解を通じた有用糖質の生産への途が拓けるものと考えられる。

<引用文献>

Kazuaki Sato, Yuichi Kato, Goro Taguchi, Masahiro Nogawa, Akira Yokota, and Makoto Shimosaka: *Chitiniphilus shinanonensis* gen. nov., sp. nov., a novel chitin-degrading bacterium belonging to Betaproteobacteria; J. Gen. Appl. Microbiol. 55, 147-153, (2009).

Hamad M. A., Zajdowicz S. L., Holmes R. K., and Voskuil M. I.: An allelic exchange system for compliant genetic manipulation of the select agents *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*; Gene, 430 (1), 123-131 (2009).

Lanxiang Huang, Ewelina Garbulewska, Kazuaki Sato, Yuichi Kato, Masahiro Nogawa, Goro Taguchi, and Makoto Shimosaka: Isolation of genes coding for chitin-degrading enzymes in the novel chitinolytic bacterium, *Chitiniphilus shinanonensis*, and characterization of a gene coding for a family 19 chitinase; J. Biosci. Bioeng. 113(3), 293-299, (2012).

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

下坂 誠 : キチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* 由来の新規キチン分解酵素を用いた N-アセチルグルコサミンの生産 : バイオインダストリー、査読無、30(4), 52-59, (2013).

Lanxiang Huang, Arisa Shizume, Masahiro Nogawa, Goro Taguchi, and Makoto Shimosaka: Heterologous expression and functional characterization of a novel chitinase from the chitinolytic bacterium, *Chitiniphilus shinanonensis*; Biosci. Biotechnol. Biochem. 査読有、76(3), 517-522, (2012). DOI:10.1271/bbb.110822

〔学会発表〕(計8件)

(中野 萌) 兪 佳怡、野川優洋、田口悟朗、下坂 誠: キチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* が保有するキチン分解酵素 ChiJ, ChiK の解析; 日本農芸化学会2014年度大会、2014年3月28日、明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)

(園田紀恵) 兪 佳怡、野川優洋、田口悟朗、下坂 誠: キチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* における遺伝子操作系の開発; 日本農芸化学会2014年度大会、2014年3月28日、明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)

(Moe Nakano), Jiayi Yu, Lanxiang Huang, Masahiro Nogawa, Goro Taguchi, Makoto Shimosaka: Analysis of genes coding for chitinolytic enzymes in the bacterium, *Chitiniphilus shinanonensis* – *chiG*, *chiJ*, and *chiK* coding for unique chitin-degrading enzymes –; the 10th International Conference of the Asian Pacific Chitin Chitosan Symposium, 2013年10月5日、米子コンベンションセンター(鳥取県米子市)

(Norie Sonoda), Jiayi Yu, Arisa Shizume, Masahiro Nogawa, Goro Taguchi, Makoto Shimosaka: Analysis of genes coding for chitinolytic enzymes in the bacterium, *Chitiniphilus shinanonensis* – Development of gene disruption by an allelic exchange system –; the 10th International Conference of the Asian Pacific Chitin Chitosan Symposium, 2013年10

月5日、米子コンベンションセンター(鳥取県米子市)

(Makoto Shimosaka), Lanxiang Huang, Norie Sonoda, Moe Nakano, Masahiro Nogawa, Goro Taguchi: Isolation and characterization of genes encoding chitin-degrading enzymes in the novel chitinolytic bacterium, *Chitiniphilus shinanonensis*; the 10th International Conference of the Asian Pacific Chitin Chitosan Symposium, 2013年10月6日、米子コンベンションセンター(鳥取県米子市)

(中野 萌)、園田紀恵、鎮目有玲紗、黄 蘭香、野川優洋、田口悟朗、下坂 誠: キチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* に由来する新規キチナーゼ ChiG の解析、第64回日本生物工学会、2012年10月25日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

(園田紀恵) 中野 萌、鎮目有玲紗、野川優洋、田口悟朗、下坂 誠: キチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* に由来するキチナーゼ ChiL が示す糖転移活性の解析、第64回日本生物工学会、2012年10月25日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

黄 蘭香、鎮目有玲紗、野川優洋、田口悟朗、(下坂 誠): キチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* に由来する新規キチナーゼについて、第26回キチン・キトサンシンポジウム、2012年7月12日、北海道大学(北海道札幌市)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: キチン分解酵素遺伝子および該遺伝子によりコードされるキチン分解酵素

発明者: 下坂 誠、田口悟朗、野川優洋

権利者: 信州大学

種類: 特許

番号: 再表 2012-111810

出願年月日: 2012年2月17日

国内外の別: 国内

〔その他〕

「甲殻類の成分を分解、強力酵素を持つ細菌発見」、日刊工業新聞 2012 年 8 月 15 日、「信州産学官連携機構 新技術説明会（2012 年 8 月 7 日）の発表内容が紹介された。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

下坂 誠 (SHIMOSAKA, Makoto)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：9 0 1 8 7 4 7 7

(2)研究分担者

田口 悟朗 (TAGUCHI, Goro)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：7 0 2 5 2 0 7 0