

微生物由来の酵素の構造解明と微生物の有効活用

応用理化学専攻 草桶秀夫

1) 本研究の背景と意義

カニやエビの殻に含まれるキチンは、セルロースに次いで、自然界に存在する最も豊富なバイオポリマーである。キトサンは、キチンを脱アセチル化して得られる。これらのキチン、キトサンは、生物資源の有効利用という視点から多くの産業分野への利用されている(表1)。また、微生物が生産する酵素によるキチン、キトサンの加水分解によって、キチン、キトサンオリゴ糖が得られる。オリゴ糖もまた、多くの生理的機能を有し、その機能を利用して産業への応用が試みられている。われわれは、これまでに、土壌微生物から新分離細菌 *Paenibacillus fukuinensis* IK-5 を発見し、この微生物がキチンとキトサンを分解する酵素、すなわち、キチナーゼとキトサナーゼを同時に生産することを見出し、これらの酵素のうちキトサナーゼの遺伝子構造と機能との関係を明らかにしている (H. Kusaoke *et. al.*, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 14685-14702)。

表1 キチン、キトサンの産業分野への利用

分野	機能・特性	応用例
化粧品	天然素材、保湿、増粘、製膜性	ヘアケア化粧品(シャンプー、リンス、整髪料)
繊維	抗菌性、防臭性、抗アレルギー性	機能性繊維素材(肌着、下着、靴下など)
食品	天然素材、鮮度保持、生体調整機能	保存料、機能性食品
農業	発芽成長促進、生体調整機能	土壌改良剤、植物活力剤、種子発芽剤、飼料
工業	染色性向上、親水性向上	紙力増強剤、表面処理剤
水処理	カチオン性高分子、凝集機能	排水浄化、汚泥凝集剤、金属キレート剤
医療	生体適合性、生分解性	損傷被覆材、手術用縫合糸、薬除放剤
環境	天然素材、吸着性、増粘性	シックハウス対策建材、消臭剤、水性塗料

2) 本研究の目的

本研究は、生物資源の有効利用という観点から、キチン、キトサンを同時に分解する微生物が生産する酵素の遺伝子構造の解明と本微生物を用いた植物成長への応用研究を行う。

3) 結果(実験手法を含む)と考察

3) - 1 実験手法

1. 酵素の精製

キトサナーゼおよびキチナーゼは、培養上清から硫酸沈殿、DEAE-Toyopearl650, ゲルクロマトフィーなどのカラムクロマトグラフィーによって精製し、これらの酵素の生化学的性質を調べるのに用いた。

2. キチナーゼのクローニング

精製キチナーゼのN末端アミノ酸配列から、キチナーゼ遺伝子のクローニングを行った。

ついで、その遺伝子を Plasmid vector pQE30(キアゲン社製)にサブクローニングし、大腸菌 BL21 において His-tag 融合タンパク質として発現させ、キチナーゼをニッケルキレートカラムにてアフィニティー精製を行った。

3. 野菜の成長試験

トマト、ナス、およびピーマンの苗の成長培地は、プラスチック製鉢中に土壤肥料 500g を加え、これに対し 1.0%/Weight または 0.5%/Weight の割合でキチン及びキトサンを配合したものをを用いた。また、キチナーゼ及びキトサナーゼ生産菌である土壤細菌 *Paenibacillus fukuinensis* IK 5 株の培養液 100ml を土壤 500g に対して加え、均一に混合した。次に、野菜の苗を土の入った鉢に植え、実が完熟するまで 60 日間から 70 日間栽培した。野菜の成長はデジカメによって幹、葉、実の大きさを測定し、さらにデジカメによって写真観察を行った。

3) - 2 結果と考察

1. *P. fukuinensis* IK-5 由来キトサナーゼの構造と機能

P. fukuinensis IK-5 が生産するキトサナーゼの遺伝子は 2,391 bp のオープンリーディングフレーム (ORF) で構成され、推定のプロモーター領域の近傍には遺伝子の発現調節に関与していると思われる逆向き反復配列が存在していた。その塩基配列からコードするタンパク質は 797 アミノ酸からなり、前駆体の分子量は 85,610 と推定され、本酵素はファミリー-46 キトサナーゼではなく、N末端領域にファミリー-8 糖質分解酵素ドメイン、C末端領域には discoidin ドメインをもつファミリー-8 グルカナーゼであった(図1)。このキトサナーゼ遺伝子のうち discoidin ドメインは、キトサンに結合するドメインであることを世界で初めて見出した。

X線結晶構造解析および点変異解析の結果から、IK5 由来キトサナーゼ遺伝子は N 末端から 302 番目のグルタミン酸および 312 番目のアスパラギン酸の 2 つの酸性アミノ酸がキトサナーゼ活性に関与していることを明らかにした(図2)。

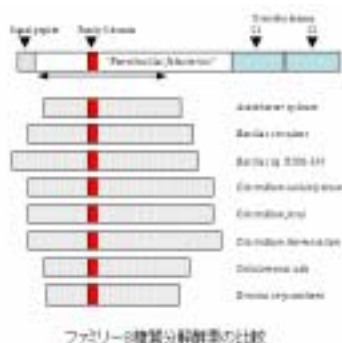


図1 *Paenibacillus fukuinensis* IK 5 由来キトサナーゼ遺伝子の構造

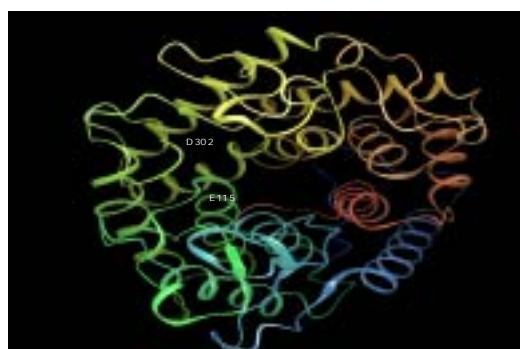


図2 *Paenibacillus fukuinensis* IK 由来キトサナーゼの立体構造

2. *P. fukuinensis* IK-5 由来キチナーゼの構造と機能

P. fukuinensis が生産する 2 種類のキチナーゼ遺伝子をクローニングし、大腸菌による大量発現および精製を行った。その結果、*P. fukuinensis* の培養上清の HW-55 S ゲルクロマトグラフィーによって、分子量約 80 kDa、約 70 kDa および約 45 kDa の 3 つのタンパク質が得られ

た。これらのタンパク質の活性染色の結果、80 kDa と 70 kDa の 2 つのタンパク質はキチナーゼ活性が認められ、45 kDa のタンパク質は活性が認められなかった。そこで、活性が認められた 2 つのキチナーゼについて、キチナーゼ遺伝子のクローニングを行った。その結果、ChiA 前駆体は、2,538 bp の O R F から構成され、845 個のアミノ酸からなり、分子量 88 kDa と推定された。塩基配列から本酵素は N 末端側にファミリー 18 キチナーゼドメインをもつ典型的なファミリー 18 糖加水分解酵素であることが判明した(図 3)。ChiB 前駆体は、2280 bp の O R F から構成され、759 個のアミノ酸からなり、分子量 80 kDa と推定された。この酵素も、N 末端側にファミリー 18 活性ドメインをもつ典型的なファミリー 18 糖加水分解酵素であることがわかった。2 つのキチナーゼのアミノ酸アライメントは、66% の相同性を示した。

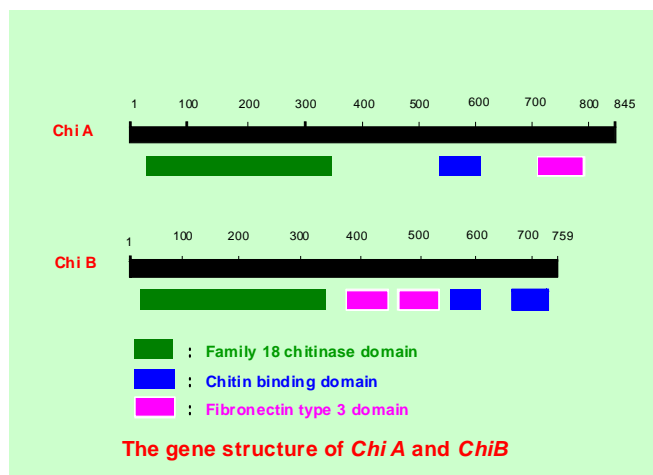


図 3 *Paenibacillus fukuinensis* IK 由来キチナーゼの遺伝子構造

以上、本研究の遂行によって、以下の結論が得られた。すなわち、分子生物学的手法により、*P. fukuinensis* IK-5 株由来キトサナーゼ遺伝子の構造を明らかにするとともに、本酵素は N 末端から 302 番目のグルタミン酸と 312 番目のアスパラギン酸が活性に関与することを明らかにした。また、本菌は、キトサナーゼを生産するとともに、キチンを分解する 2 種のキチナーゼを生産することおよびこれらの酵素の遺伝子構造を明らかにした (Kusaoke *et. al.*, Applied Microbial Biotechnology, 2010, 85, 95-104)。

3. *P. fukuinensis* IK-5 の菌体を配合した肥料を用いた野菜類の栽培による成長試験

キトサナーゼおよびキチナーゼ生産菌 *P. fukuinensis* IK-5 株を用い、トマトの成長特性について調べた。肥料中にキチン、キトサンおよび *P. fukuinensis* IK-5 株の配合によってトマトの葉、茎、果実などの成長が観察された。特に、IK-5 株の菌体にキチンを配合した場合、トマトの成長が向上した(図 4)。これらの結果は、*P. fukuinensis* IK-5 株が生産するキチナーゼとキトサナーゼによってキチン、キトサンが分解し、分解生成物であるキチン、キトサンのオリゴ糖がトマトの成長を促進したものと考えられる。

同様に、*P. fukuinensis* IK-5 株の培養液をキチン、キトサンとともに肥料に配合し、ナスの成長性を調べた。その結果、図 5 に示すように *P. fukuinensis* IK-5 の菌体にキトサンを肥料中に配合した場合、ナスの茎、葉、および実の成長が認められた(図 6)。さらに、ピーマンの栽培による成長を観察したところ、IK-5 株の菌体にキチンを配合した肥料を用いた場合、最も茎、葉、実の成長が認められた(図 6)。

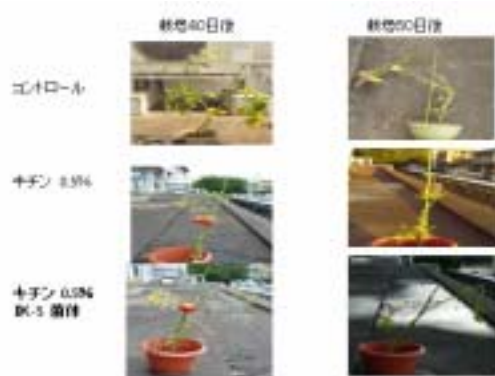


図4 *P. fukuinensis* IK-5 菌体とキチンの配合肥料を用いたトマトの栽培による成長試験

以上のように、*P. fukuinensis* IK-5 菌体とキチン、キトサンの配合肥料を用いた野菜の栽培による成長試験の結果から、以下の結論が得られた。キチン、キトサンおよび *P. fukuinensis* IK-5 株との配合によってトマト、ナス、ピーマンの葉、茎、果実などの成長が見出された。このことは、*P. fukuinensis* IK-5 株が生産するキチナーゼとキトサナーゼによってキチン、キトサンが分解し、分解生成物であるキチン、キトサンオリゴ糖がトマトの成長を促進したものと考えられる (Kusaoke *et al.*, Chitin and Chitosan Science, 2009, in press)。

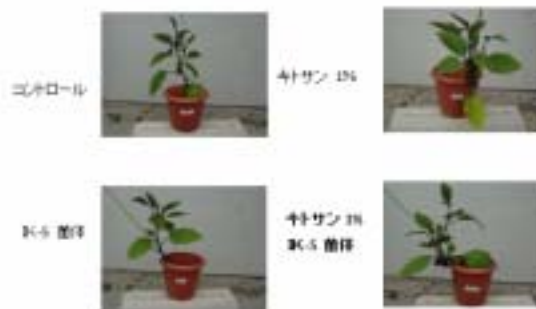


図5 *P. fukuinensis* IK-5 菌体とキトサンの配合肥料を用いたナスの栽培による成長試験

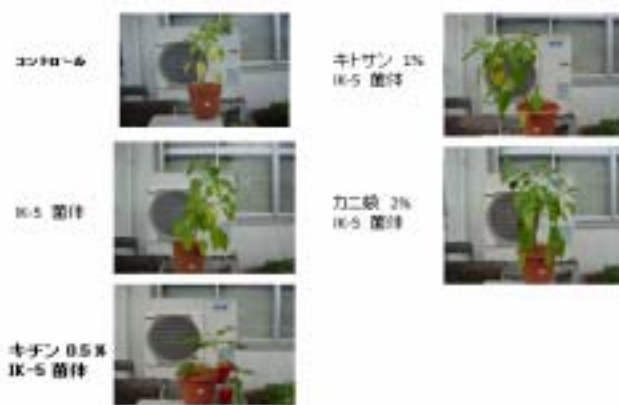


図6 *P. fukuinensis* IK-5 菌体とキチン、キトサンの配合肥料を用いたピーマンの栽培による成長試験

4) 国内外の研究のなかで占める本研究の位置づけ

微生物によるキチン、キトサン分解に関する研究は多く行われているが、1つの微生物から生産される2つの異なるキチン、キトサン分解酵素の遺伝子構造を明らかにした研究は初めてである。キチン、キトサンオリゴ糖の植物成長に関する研究も内外の研究者によって行われているが、キチン、キトサン分解微生物そのものを利用してトマトやナスなどの野菜類の成長効果を調べた研究はなく、その意義は大きい。

5) 新規性、独創的な点

P. fukuinensis IK-5 株由来の2つのキチンとキトサン分解酵素の構造と機能との関係を明らかにするとともに、キトサナーゼ遺伝子がキトサン結合ドメインをもつことを世界で初めて見出したこと。カニ殻キチン、キトサンを分解する本微生物の利用による野菜類の成長に関する本研究は、カニ殻生物資源の有効利用という観点から新たな成果である。