



Title	海洋細菌 <i>Alteromonas</i> sp. 0-7株のキチン分解機構に関する研究
Author(s)	折越, 英介
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47252
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 おり 折 こし 越 ひで 英 ゆき 介

博士の専攻分野の名称 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 第 2 1 4 3 5 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 19 年 3 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 名 海洋細菌 *Alteromonas* sp. O-7 株のキチン分解機構に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 山元 弘

(副査)

教 授 前田 正知 教 授 中川 晋作 教 授 平田 收正

論 文 内 容 の 要 旨

キチンは、*N*-アセチルグルコサミン残基が β -(1,4) 結合した水に不溶性のホモポリマーであり、セルロースに次ぐ再利用可能なバイオマスとして注目されている。キチンは、甲殻類、昆虫の外骨格および菌類の細胞壁などの構成成分として含まれ、植物界におけるセルロースと同様に生物体の支持や防護の役割を担っている物質であり、自然界に広く存在している。海洋環境において、キチンは、主に動物プランクトンに由来し、年間 10^{11} トン産生されていると見積もられているが、実際には海洋堆積物中にほとんど存在しない。この現象は、キチン分解細菌がキチンを分解していることによると考えられている。

種々の生理活性を示すキチンオリゴ糖ならびに変形関節症の予防および改善に効果のある *N*-アセチルグルコサミンの効率的な酵素生産は、多方面から期待されている。そこで、キチン分解細菌のキチン分解機構を分子レベルで明らかにすることを目的に、海洋に生息するキチン分解細菌の分離を行った。その中でキチナーゼ活性が高く、かつ安定的にキチナーゼを産生する *Alteromonas* 属 O-7 株をモデル細菌とした。

本研究では、本菌の 4 種類のキチナーゼ遺伝子 (*chiA*, *chiB*, *chiC*, *chiD*) をクローニングし、これらの塩基配列から推測されるアミノ酸配列を解析した。4 種類のキチナーゼは、シグナルペプチド、種々キチナーゼと相同性が高く、主に細菌由来のキチナーゼに認められるファミリー 18 に分類される触媒ドメイン、AKWWTQ モチーフを有する、タイプ 3 に分類されるキチン結合ドメイン、およびドメイン間の最適な立体配置を保持するために必要なエラストティックリンカーであると推測されるフィブロネクチンタイプ 3 ドメインを共通に有していた。また、ChiA 触媒ドメインの N 末端側には、多発性のう胞腎疾患の原因タンパク質である、ポリシスチン内に存在する繰り返し配列と類似する PKD (polycystic kidney disease) ドメインが存在した。

4 種類のキチナーゼに共通に見出された触媒ドメインは、他のキチナーゼとも相同性が認められた。その中で最もよく保存されているアミノ酸残基が、 β -(1,4) グルコシド結合を切断する触媒残基であると推測された。そこで、部位特異的変異法により変異型 ChiA を作製し、それらのアミノ酸残基のキチナーゼ活性に及ぼす影響について検討したところ、D311 および E313 がキチンの β -(1,4) グルコシド結合を切断する触媒残基であることが示唆された。また、D311 のカルボキシル基と基質の距離が、活性発現に重要であると推測された。

4 種類のキチナーゼに共通に見出された AKWWTQ モチーフを有するドメインの機能を調べたところ、本ドメインは、キチン、結晶セルロース、キトサンなどの不溶性多糖に結合能を有することが明らかとなった。

ChiA の N 末端に存在する PKD ドメインに存在する 4 つの芳香族アミノ酸残基のキチナーゼ活性に及ぼす影響に

ついて検討した結果、W30 および W67 をアラニンに置換した 2 アミノ酸残基の変異体 (W30A/W67A) の酵素活性は、不溶性基質である粉末キチンおよびコロイダルキチンを用いた場合、それぞれ 12.4% および 32.8% にまで減少した。しかし、本変異体は、可溶性基質であるグリコールキチンを用いた場合、73.2% の残存活性が認められた。したがって、W30 および W67 は、不溶性のキチンを加水分解するために重要な役割を果たしているアミノ酸残基であると考えられた。また、PKD ドメインは、粉末キチンに対して結合能を示した。以上の結果から、PKD ドメインは、W30 および W67 は、不溶性のキチンと結合することにより、効率的にキチンを加水分解すると推測された。

4 種類のキチナーゼの特徴を明らかにする目的で、4 種類のキチナーゼの発現時期および発現量についてタンパク質レベルおよび転写レベルにおいて検討したところ、本菌を 1 % 粉末キチン存在下で培養した場合、全てのキチナーゼは培養 5 時間後から同時に発現が認められた。また、それらキチナーゼの産生量は、ChiA の産生量が最も高く、続いて ChiD、ChiB、ChiC の順であった。また、4 種類のキチナーゼ遺伝子は、培養 4 時間後からほぼ同時に転写され、その転写量は、タンパク質レベルと同様の傾向を示した。

4 種類のキチナーゼの至適温度について比較検討したところ、ChiA、ChiC および ChiD の至適温度は 40~50°C であったが、ChiB のそれは 30°C で、0°C 付近においても比較的高い活性を示した。また、ChiA、ChiC および ChiD は、40°C、60 分間処理で 70% 以上の残存活性を保持したが、ChiB は、10 分間処理で 40%、40 分間処理で 15% にまで低下し、熱安定性が低いことから、ChiB は、典型的な低温適応酵素であった。また、4 種類のキチナーゼの至適 pH は、いずれも中性付近であった。

4 種類のキチナーゼの基質特異性について比較検討したところ、グリコールキチンを基質とした場合、ChiC が最も高い活性を示し、コロイダルキチンでは、ChiD が、粉末キチンでは、ChiA が最も高い活性を示した。また、ChiB は、他のキチナーゼより相対活性は低かったが、3 種類の基質に対して同程度の分解活性を示した。4 種類のキチナーゼのキチン分解における相乗作用について検討したところ、ChiA、ChiB、ChiC および ChiD を 3 : 3 : 2 : 6 の割合で混合した場合、各酵素の単独での活性の総和と比較して、約 2 倍の相乗効果が観察された。したがって、異なる基質特異性を有するキチナーゼを混合することにより、効率的に粉末キチンを分解できることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

キチンは、*N*-アセチルグルコサミン残基が β -(1,4) 結合した不溶性のホモポリマーであり、セルロースに次ぐ再利用可能なバイオマスとして注目されている。海洋環境において、キチンは主に動物プランクトンに由来し、年間 10^{11} トン産生されていると見積もられているが、実際にはキチン分解細菌がキチンを分解するため、海洋堆積物中にほとんど存在しない。このようにキチン生成と分解は、海洋環境の維持に働く重要な要因であり、またキチンの分解経路を詳細に解析することは、キチンを生分解性素材として活用していく上で重要である。

こうした観点から本研究は、キチン分解酵素を有する海洋細菌の単離、酵素学的性状と、遺伝子レベルでの詳細な解析を試みた。その結果、

1. 種々の海域、各深度の海水中ならびに海底堆積物中より 1,702 株の海洋微生物をスクリーニングし、85 株のキチナーゼ産生菌から、キチナーゼ活性が高く、かつキチナーゼを安定に産生する細菌を単離し、*Alteromonas* sp. O-7 株と命名した。
2. *Alteromonas* sp. O-7 株から、4 種類のキチナーゼ遺伝子 (*chiA*, *chiB*, *chiC*, *chiD*) のクローニングに成功した。
3. 4 種類のキチナーゼ遺伝子を操作することで、酵素活性ドメインで働くアミノ酸残基構造を明らかにした。
4. 酵素活性モチーフの解析から、AKWWTQ モチーフと PKD ドメインの機能を明らかにした。
5. 4 種類のキチナーゼの酵素学的性状を調べることで、キチン分解のプロセスを明らかにした。

以上本研究は、キチン分解経路を明らかにすることで、生分解性ポリマーとしてのキチンの応用に、生態環境学からの視点に新境地を開いた重要な研究であり、薬学博士の学位を授与するにふさわしいものとする。