

細菌の機能性オリゴ糖を生産するキチン分解関連酵素の機能解析

日本大学 生物資源科学部 生命化学科 平野 貴子

【略歴】

2005年3月 日本大学生物資源科学部農芸化学科 卒業
2007年3月 日本大学大学院生物資源科学研究科博士前期課程 修了
2010年3月 日本大学大学院生物資源科学研究科博士後期課程 修了・博士(生物資源科学)
2010年4月～2011年3月 日本大学 ポスト・ドクトラル・フェロー
2011年4月～現在 日本大学 生物資源科学部 生命化学科 生物化学研究室 助手

はじめに

キチンは *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) が重合した多糖で、甲殻類の殻や昆虫の外皮、糸状菌の細胞壁などを構成する構造多糖であり、未利用バイオマス資源としてその利用価値が期待されてきた。*Vibrio* 属細菌などの海洋細菌は海底土壤中に散在するキチンを分解して栄養源としており、これにより海洋中のキチンは分解・消失していると考えられている。このキチン利用システムの中で、多くの *Vibrio* 属細菌は、キチナーゼ (EC 3.2.1.14) を分泌しキチンから GlcNAc の 2 糖である (GlcNAc)₂ を産生しているが、一部の *Vibrio* 属細菌はさらにキチンオリゴ糖脱アセチル化酵素 (COD, EC 3.5.1.105) [Carbohydrate Esterase (CE) family 4] を分泌し、(GlcNAc)₂ の還元性末端側のみを脱アセチル化してヘテロ 2 糖である 4-*O*-(*N*-acetyl-β-D-glucosaminy1)-D-glucosamine (GlcNAc-GlcN) を生産する¹⁾。これまでに、本ヘテロ 2 糖は COD 生産性 *Vibrio* 属に対して、特異的にキチナーゼ生産誘導因子や遊走性因子として働くことを解明した^{2, 3)}。従って、前述のキチン利用システムの中で、COD 生産性 *Vibrio* 属細菌は、自身が生産するシグナル因子によりキチナーゼをより多く生産して優位にオリゴ糖を得るとともに、GlcNAc-GlcN を認識して栄養源であるキチンへとより早く遊走していくと推測できる。つまり COD は本微生物のキチン利用に関する生態系において重要なシグナル物質の生産酵素と言える。GlcNAc-GlcN のようなオリゴ糖シグナルを利用することで、細菌を用いた効率の良いバイオマス分解法の開発が可能になると考えた。また、本 2 糖以外にも GlcNAc 鎖の部分脱アセチル化オリゴ糖が、微生物シグナルとして働く可能も視野にいれ、新規オリゴ糖の生産に COD が利用できるかどうか検討したいと考えた。そこで、まず、COD の酵素化学的性質の解明を目指した。

Vibrio 属細菌由来 COD の酵素化学的性質について

これまでも数種の *Vibrio* 属細菌について COD 遺伝子を有することがデータベース上に報告されていたが、COD は生産量が少なく、酵素が単離され調べられたものは *Vibrio alginolyticus* H-8⁴⁾、*Vibrio cholerae* EI Tor N16961⁵⁾、*Vibrio parahaemolyticus* KN1699^{6, 7)}、*Vibrio* sp. SN184⁸⁾ の 4 菌株だけであり、立体構造も解明されていなかった。

そこで、まず *Vibrio* 属の中から新規な COD 生産菌を探索した。これまでに、データベース上から発見した *Vibrio harveyi* ATCC BAA-1116 由来 COD のリコンビナント体を作成し、酵素化学的性質を調べた⁹⁾。また、以前の研究で保存菌株より発見した *Vibrio campbelli* NBRC15631 由来 COD²⁾ の遺伝子配列を解読した (GenBank accession ID: AB519818)。前述の 5 菌株の *Vibrio* 属由来 COD の酵素化学的性質は良く類似しており、いずれも単糖や長鎖の GlcNAc オリゴ糖には作用せず、主に 2 糖や 3 糖の非還元性末端側から 2 番目の GlcNAc 残基のアセトアミド基に作用し脱アセチル化する。至適 pH は中性から弱アルカリ性、至適温度はおおむね 45°C 付近であった。

Vibrio 属細菌由来 COD の立体構造について

本研究では、*V. parahaemolyticus* KN1699 由来リコンビナント COD を結晶化し、X 線結晶構造解析により COD の立体構造を解明した。本酵素は 1 つの Polysaccharide deacetylase domain (PDD) と 2 つの Carbohydrate binding domain (CBD) から成り、PDD と CBDs の間には Ca²⁺ が、PDD には Zn²⁺ が存在していた。両ドメインの機能を明らかにするため、CBDs 欠損体 (ΔCBD·COD) を作出し、キチン結合能を COD と比較した。その結果、CBDs の存在により COD はキチンに強固に結合することが分かった。また、(GlcNAc)₂ を基質として COD と ΔCBD·COD の Kinetic study を行った結果、CBDs を欠損することにより基質親和性に違いが見られたが、COD の触媒機能は保持されていた。従って、PDD と CBDs はそれぞれ活性に関与するドメインとキチンに結合するドメインという、独立した役割があることが示唆された。COD はオリゴ糖を基質とするにも関わらず CBDs を有することは大変興味深く、本菌のキチン分解システムにおける本ドメインの役割を調べていく予定である。

新規細菌属種由来 COD の酵素化学的性質について

これまでに *Vibrio* 属以外の細菌が生産する COD についての報告は無かった。本研究では、ゲノム DNA が解読されている細菌の中から、COD 遺伝子を有するものを探索した。その結果、*Shewanella woodiy* および *Shewanella baltica* が *Vibrio* 属由来 COD と相同性の高い配列を有することが分かった。*Vibrio* 属由来 COD 同士のアミノ酸配列相同性は概ね 80% 以上と高いが、*Vibrio* 属由来 COD とこれら新規 COD のアミノ酸配列相同性はそれよりも低い。さらに、*Shewanella baltica* 由来 COD は、CBD を 1 つしか持たず、他の COD との PDD に相当するアミノ酸配列相同性も低い。このことから、本 COD は酵素化学的性質も新規であると期待した。そこで、*S. woodiy* ATCC 51908 および *S. baltica* ATCC BAA-1091 由来 COD のリコンビナント体を作成し、酵素化学的性質を調べた。その結果、*S. woodiy*、*S. baltica* 由来の両 COD とともに、反応効率は *Vibrio* 属由来 COD よりも劣るが、基本的な酵素化学的性質は大差なかった。既報の COD は全て (GlcNAc)₂ に最も良く作用し、鎖長が長くなるに従い比活性は下がっていく。しかし、*S. baltica* 由来の COD では、(GlcNAc)₂ に最も良く作用するが 3 糖よりも 4 糖の方が作用し易い可能性が示された。今後は、本 COD と他の COD との構造的な差異も含めて、基質特異性を詳細に決定していく必要がある。

まとめ

特定の微生物シグナルとして働く GlcNAc-GlcN を生産する COD は、環境での生産量も少なく研究もあまり進んでいなかった。しかし、複数の細菌で COD 遺伝子の存在も報告されるようになり、立体構造も解明されたことからその機能について徐々に明らかになりつつある。本酵素の機能解明を進めていくことで、その利用価値が見いだされることを期待している。

謝辞

本研究は、日本大学 生物資源科学部 生命化学科 生物化学研究室にて 2004 年より継続して行ってきたテーマの一部である。博士後期課程より本研究テーマに従事させてくださり、またご指導くださった同研究室 西尾 俊幸 教授に感謝申し上げます。また、本研究で COD の立体構造解析にご協力くださった、横浜市立大学大学院 朴 三用 教授、杉山 佳奈子 博士に御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Kadokura, K., Rokutani, A., Yamamoto, M., Ikegami, T., Sugita, H., Itoi, S., Hakamata, W., Oku, T. and Nishio, T., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 357-365, 2007.
- 2) Hirano, T., Kadokura, K., Ikegami, T., Shigeta, Y., Kumaki, Y., Hakamada, W., Oku, T. and Nishio, T., *Glycobiology* **19**, 1046-1053, 2009.
- 3) Hirano, T., Aoki, M., Kadokura, K., Kumaki, Y., Hakamata, W., Oku, T. and Nishio, T., *Lett. Appl. Microbiol.* **53** 161-166, 2011.
- 4) Ohishi, K., Yamagishi, M., Ohta, T., Motosugi, M., Izumida, H., Sano, Hi, Adachi, K. and Miwa, T., *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 1113-1117, 1997.
- 5) Li, X., Wang, L. X., Wang, X. and Roseman, S., *Glycobiology* **17**, 1377-1387, 2007.
- 6) Kadokura, K., Sakamoto, Y., Saito, K., Ikegami, T., Hirano, T., Hakamata, W., Oku, T. and Nishio, T., *Biotechnol. Lett.* **29**, 1209-1215, 2007.
- 7) Kadokura, K., Sakamoto, Y., Rokutani, A., Ikegami, T., Hirano, T., Yamamoto, M., Saito, K., Hakamata, W., Itoi, S., Sugita, H., Oku, T., Nishio, T., *J. Appl. Glycosci.*, **55**, 157-164, 2008.
- 8) Sakamoto, Y., Kuno, E., Tomiyama, A., Hirano, T., Kumaki, Y., Tanaka, A., Kanda, H., Furuya, K., hakamata, W., Oku, T. and Nishio, T., *J. Appl. Glycosci.* **56**, 273-276, 2009.
- 9) Hirano, T., Maehara, Y., Uehara, R., Sakaki, Y., Shiraiishi, H., Ichimura, S., Hakamata, W. and Nishio, T., *Chitin and Chitosan Research* **19**, 321-324, 2013.