

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月8日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580102

研究課題名（和文）キチナーゼ高分泌能を有するキチン非資化性大腸菌を用いた発酵法によるキチンの糖化

研究課題名（英文）Saccharification of chitin by chitinase-secreting *Escherichia coli* that possess no ability for chitin oligosaccharide consumption研究代表者 西尾 俊幸 (NISHIO TOSHIYUKI)  
日本大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号：10256836

## 研究成果の概要（和文）：

*Vibrio* 属細菌のキチナーゼ遺伝子を分泌シグナル配列と共にベクターに導入し作成したプラスミドを、キチンオリゴ糖に対する資化能が低い大腸菌宿主に導入し、リコンビナントキチナーゼ高分泌能を有するキチンオリゴ糖非資化性大腸菌を作成した。粉末状キチンを添加した培地中で本形質転換大腸菌を培養することにより、キチナーゼを連続的に生産・分泌させながら難分解性のキチンを糖化することを試みた。その結果、収率はまだ低いながらも、簡便かつ安価にキチンから *N,N'*-ジアセチルキトビオース [(GlcNAc)<sub>2</sub>] を生産することができた。

## 研究成果の概要（英文）：

We have succeeded in making recombinant chitinase-secreting *Escherichia coli* that possess no ability for chitin oligosaccharide consumption. By cultivating this transformed bacteria in liquid medium containing powdered chitin, though yield was still low, *N,N'*-diacetylchitobiose was produced from chitin.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費     | 合計        |
|--------|-----------|----------|-----------|
| 2009年度 | 2,200,000 | 660,000  | 2,860,000 |
| 2010年度 | 600,000   | 180,000  | 780,000   |
| 2011年度 | 900,000   | 270,000  | 1,170,000 |
| 年度     |           |          |           |
| 年度     |           |          |           |
| 総計     | 3,700,000 | 1110,000 | 4,810,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：発酵生産、バイオマス分解

## 1. 研究開始当初の背景

キチンの分解により得られる単糖 (*N*-アセチルグルコサミン; GlcNAc) やオリゴ糖 [(GlcNAc)<sub>n</sub>] には、変形関節炎改善、肌老化抑制、免疫賦活、整腸作用などの様々な効果が見いだされている。これらのことから、特に GlcNAc はサプリメントとしてその需要が増加している。キチンからの単糖やオリゴ糖

の生産については、現在は大量の強酸を加えて加熱する化学分解法が主に行なわれている。しかし、化学分解によるキチン糖化法は副産物の生成、着色、危険性、および環境汚染など、多くの問題点を抱えている。また、分解物が食品を対象とするものであれば、製造上好ましくない。これらのことから、キチンの糖化に関しても、デンプンやセルロース

と同様に酵素を用いた生化学的糖化を行なうことが望まれている。酵素糖化によりキチンから単糖やオリゴ糖を大量かつ安価に製造することができれば、これらの用途がさらに拡大することが期待できる。しかし、キチンの酵素糖化については実質的な良い方法が全く無いのが現状である。それは、キチンはセルロースと同様に強固な結晶構造を形成している構造多糖であり、酵素の作用を受けにくい反応に時間がかかり酵素失活を招きやすいことと、キチン分解酵素であるキチナーゼを大量に生産できる微生物が未だに見いだされていないことなどが原因である。本研究では、キチンの酵素糖化におけるこれらの問題点を解消すべく、新しい方法でキチンの酵素糖化を検討する。

## 2. 研究の目的

キチンは、カニやエビなどの甲殻類の殻、イカなどの軟体動物の中骨、昆虫の外皮、および糸状菌の細胞壁などを構成する主要な構造多糖で、セルロースに次いで自然界に豊富に存在するバイオマス資源の1つである。カニ・エビ殻やイカ中骨については、毎年相当な量が廃棄されているため、その有効利用が求められている。上記のようにキチン由来の単糖やオリゴ糖は有用な生理機能を発揮することが知られている。そこで本研究では、キチンの有効利用に向けた研究の一環として、本多糖類の効率的な糖化について検討する。糖化法については、バイオマス資源として有用なデンプンやセルロースと同様に、酵素や微生物を利用した生化学的糖化を実現させる。つまり、本研究の目的は、キチン由来の単糖やオリゴ糖を安価かつ大量に供給できる生化学的糖化の要素技術を開発することである。

## 3. 研究の方法

*Vibrio* 属細菌のジアセチルキトビオース [(GlcNAc)<sub>2</sub>]生産性キチナーゼの遺伝子を分泌シグナル配列と共にベクターに導入して作成したプラスミドを、キチンオリゴ糖トランスポーター遺伝子を欠損させた大腸菌宿主 [*Escherichia coli* BL21(DE3)] や、キチンオリゴ糖に対する資化能が弱い大腸菌宿主 [*Escherichia coli* HMS174(DE3)] に導入し、リコンビナントキチナーゼ高分泌能を有するキチンオリゴ糖非(難)資化性大腸菌を作成する。そして、これらの遺伝子導入大腸菌を粉末キチン添加培地中で培養することで、キチナーゼを連続的に生産・分泌させながらキチンを効率的に糖化し、(GlcNAc)<sub>2</sub>を培養液中に蓄積させる。本研究の概略を図1に示す。

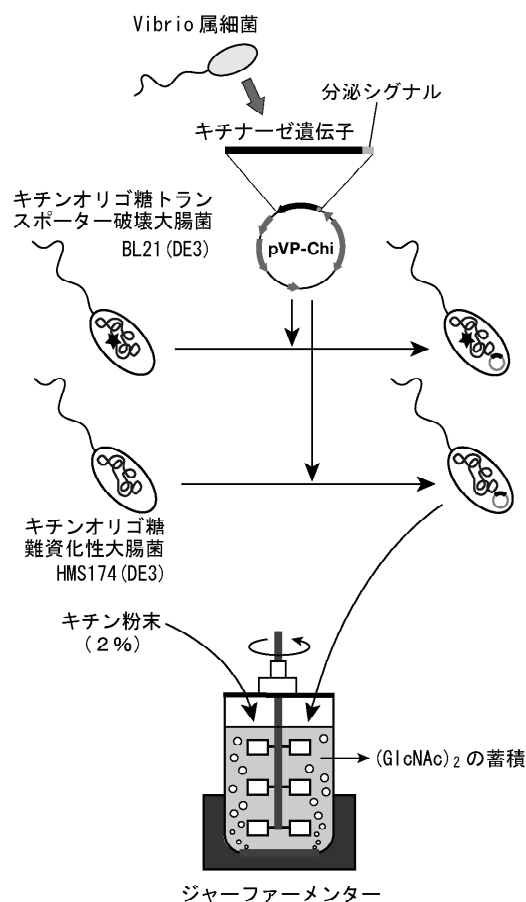


図1. リコンビナントキチナーゼ生産・分泌能を有するキチンオリゴ糖難資化性大腸菌を用いた発酵法によるキチン糖化

## 4. 研究成果

(1) B株由来の遺伝子発現用宿主大腸菌である *E. coli* BL21(DE3) は、(GlcNAc)<sub>2</sub> に対するトランスポータータンパク質 (IIC, IIB, IIA) を発現するため (GlcNAc)<sub>2</sub> を資化してしまう。そのため、本大腸菌をそのまま宿主として用いた発酵法によるキチン糖化を行った場合、リコンビナントキチナーゼの作用によってキチンから生産された (GlcNAc)<sub>2</sub> が細胞内に取り込まれ代謝されてしまうため、本オリゴ糖の培地中への蓄積量が減少してしまう。そこで、簡易相同組換え法 (One step inactivation method) によって本菌の染色体 DNA 上の IIC タンパク質の遺伝子をノックアウトした *E. coli* HMS174(DE3) 変異株を作成し、これにキチナーゼ生産・分泌用プラスミドを導入し、それを用いてキチン糖化を行った。その結果、IIC 遺伝子非ノックアウト菌 (wild type) に比べて、ノックアウト菌では培地中への (GlcNAc)<sub>2</sub> 蓄積量は明らかに増加したが、培養時間の経過に伴って大部分が資化されてしまった。ノックアウトした IIC タンパク質の遺伝子は、以前に Roseman らによって確認されたものであるが、他にも同様な

トランスポータータンパク質の遺伝子が存在し、それが  $(\text{GlcNAc})_2$  の取り込みに関与している可能性も否定できない。いずれにしても、この原因については今後詳しく調査してゆくつもりである。

(2) 次に、キチンオリゴ糖に対する資化能がもともと低い K 株由来の大腸菌 [*E. coli* HMS174(DE3)] を宿主として用い、本菌にキチナーゼ生産・分泌用プラスミドを導入することで、リコンビナントキチナーゼ高分泌能を有するキチンオリゴ糖難資化性大腸菌の作成を行なった。また、キチンオリゴ糖資化能を有する大腸菌 [BL21(DE3) 株] にキチナーゼ遺伝子を導入したのも比較実験のために使用した。これらの遺伝子組換え菌によるキチナーゼの生産を、コロイダルキチンを含む寒天培地上でのクリアゾーン形成により確認したところ、いずれの菌株についてもクリアゾーンが形成されたことから強力にキチナーゼを生産・分泌していることが確認された(図2)。

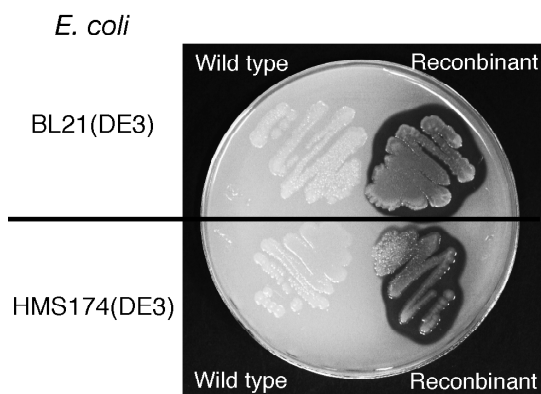
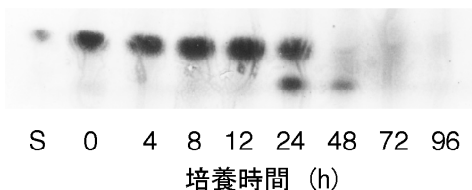


図2. 形質転換菌によるリコンビナントキチナーゼ生産・分泌の確認

上記の2種類の遺伝子組換え大腸菌について、まずはキチンオリゴ糖資化能を調べてみた。培養液中に1%濃度になるように  $(\text{GlcNAc})_2$  を添加し、キチナーゼ生産・分泌用プラスミドを導入した BL21(DE3) と HMS174(DE3) の量菌株を培養した。培養経過による  $(\text{GlcNAc})_2$  の減少について薄層クロマトグラフィーによって確認したところ、図3に示したように、BL21(DE3) 株では培養一日が経過したところで  $(\text{GlcNAc})_2$  が資化され始め培地中から消失して行ったが、HMS174(DE3) 株では4日間培養を行っても  $(\text{GlcNAc})_2$  はほとんど消失されなかった。なお、量菌株の増殖については、培養一日目までは差は見られなかったが、二日目以降からは BL21(DE3) 株の増殖速度が HMS174(DE3) 株に比べて高くなっていった(図4)。これは、BL21(DE3) 株が24時間ぐらいから  $(\text{GlcNAc})_2$

を資化し始めたが、HMS174(DE3) 株は本オリゴ糖の資化能が低いため栄養源として利用できなかったためであると考えられる。

*E. coli* BL21(DE3)



*E. coli* HMS174(DE3)



図3. 形質転換菌の  $(\text{GlcNAc})_2$  資化性 (Sは  $(\text{GlcNAc})_2$  標準品)

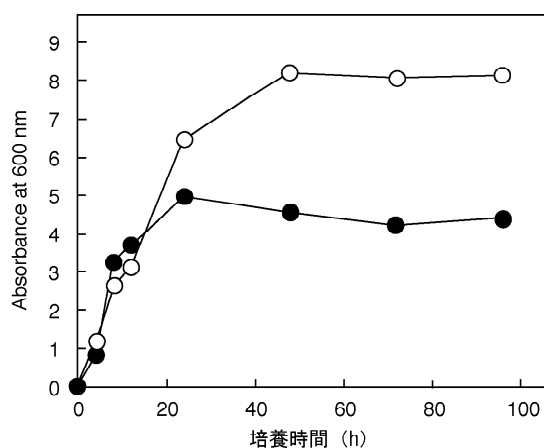


図4.  $(\text{GlcNAc})_2$  含有培地中での形質転換菌の生育状態

次に、両菌株による培養液中へのキチナーゼ分泌について、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により調べた。その結果、両菌株とも遺伝子発現誘導物質 IPTG を添加することで、キチナーゼを培養液中に大量に分泌することを確認した。

この結果を受けて、キチナーゼ生産・分泌用プラスミドを導入した HMS174(DE3) 株を、2%の  $\beta$ -キチンを含む液体培地で培養し、発酵法によるキチン糖化の実験を行った。なお、BL21(DE3) 株も比較を行うために本実験に用いた。その結果、予想通り BL21(DE3) 株においては生産された  $(\text{GlcNAc})_2$  は速やかに資化され、本オリゴ糖の培養液中への安定的な蓄積は見られなかった。それに対し、

HMS174(DE3)株においては、キチン分解が進行すると共に培地中への(GlcNAc)<sub>2</sub>の生産と持続的な蓄積が確認された。これらの実験結果を図5に示す。また、HMS174(DE3)株を用いた培養液から(GlcNAc)<sub>2</sub>を活性炭クロマトグラフィーと結晶化の操作で精製したところ、約17%の収率(重量収率)で単離することができた。HMS174(DE3)株を用いた発酵法によるキチン糖化実験は繰り返し行ったが、いずれの場合も、(GlcNAc)<sub>2</sub>を17~18%の収率で安定的に得ることができた。

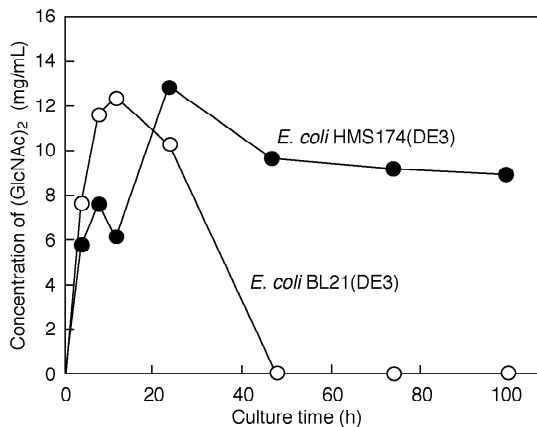


図5. 発酵法による(GlcNAc)<sub>2</sub>生産

以上の結果から、キチンオリゴ糖に対する資化能が低い大腸菌 HMS174(DE3)株を宿主として用いるリコンビナントキチナーゼ生産・分泌菌を作成し、本菌を用いて発酵法によるキチン糖化を行なうことで、キチンオリゴ糖の簡便かつ安価な生産方法を開発することができた。本方法により得られたオリゴ糖の収率は、まだあまり高くないが、今後はより高い収率での生産条件を検討して行く予定である。

現在、以上の結果を英文科学雑誌に発表すべく、論文を執筆しているところである。

(3) 我々は、キチン糖化に利用するための微生物キチナーゼについても、探索、精製、諸性質調査、構造解析などの基礎研究を進めている。現在までに、幾つかの *Vibrio* 属細菌からキチナーゼを単離し、それらについて様々な性質を明らかにしてきた。その成果については過去に多くの英文科学雑誌に発表してきた。

本研究の期間内においても、微生物キチナーゼについての基礎研究は続けており、今回新たに *Vibrio proteolyticus* のキチナーゼについて、活性に及ぼすC末端ドメインが及ぼす影響について明らかにした。本研究の結果は、英文科学雑誌に発表した。

## 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1件)

- ① S. Itoi, Y. Kanomata, S. Uchida, K. Kadokura, T. Nishio, T. Oku, H. Sugita, Effect of the C-terminal domain of *Vibrio proteolyticus* chitinase A on the chitinolytic activity in association with pH changes, *Letters in Applied Microbiology*, 査読有り, Vol. 54, 2012, pp. 441-446.

[学会発表] (計4件)

- ① 源 崇光, 西尾 俊幸, 他3名, リコンビナントキチナーゼ分泌大腸菌を用いた発酵法によるキチンの糖化, 日本農芸化学会, 2012年3月25日, 京都女子大学
- ② 源 崇光, 西尾 俊幸, 他3名, リコンビナントキチナーゼ分泌大腸菌を用いた発酵法によるキチンの糖化, 日本応用糖質学会, 2011年9月28日, 北海道大学
- ③ 北原 沙也加, 西尾 俊幸, 他3名, 連続半個相培養によるキチン糖化のためのキチナーゼ高生産放線菌のスクリーニング, 日本応用糖質学会, 2010年9月16日, 静岡県コンベンションアーツセンター・グランシップ
- ④ 古屋憲一, 西尾 俊幸, 他4名, 発酵法によるキチン糖化の要素技術開発に向けたキチンオリゴ糖非資化性大腸菌の作成, 日本応用糖質学会, 2009年9月16日, 弘前大学

[その他]

ホームページ等

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~cls/kenkyu/1abo5.html>

<http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/58/0005707/profile.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西尾 俊幸 (NISHIO TOSHIYUKI)  
日本大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号：10256836

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

杉田 治男 (SUGITA HARUO)  
日本大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号：50139052