

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 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：51201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780097

研究課題名（和文）キチン質の直接糖化に相乗効果をもたらす酵素及び因子の探索

研究課題名（英文）Study of enzymes and factors provide direct solubilization of chitin

研究代表者 中川 裕子 (NAKAGAWA YUKO)

一関工業高等専門学校 物質化学工学科 助教

研究者番号：70435577

研究成果の概要（和文）：

放線菌由来のキチン結合タンパク 3 種類が、 α -及び β -キチンの酵素分解を爆発的に向上させることを明らかにした。最も効果的な組み合わせでは、24 時間でキチン結合タンパクを添加しない場合の 30 倍もの二糖を生成量することができた。放線菌由来の粗酵素、及び *Serratia marcescens* のキチン分解系を用いて、 α -キチンを分解すると、結晶化度の低下に伴って糖化率が上がることを証明した。

研究成果の概要（英文）：

We revealed three chitin binding proteins (CBPs) from *Streptomyces griseus* boosted enzymatic solubilization of α - and β -chitin. The amount of (GlcNAc)₂ from the best combination with one of the CBP and a chitinase was about 30 times higher than that without the CBP after 24 h incubation.

We proved crystallinity was affected to α -chitin solubilization by using a commercially available enzyme from *S. griseus* or the chitinolytic system in *Serratia marcescens*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
23 年度	700,000	210,000	910,000
24 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物学

キーワード：キチン キチン分解酵素 糖化促進 キチン結合タンパク *N*-アセチルグルコサミン 組換え酵素

1. 研究開始当初の背景

近年、キチンやそのオリゴ糖に免疫賦活活性、医用・生体適合材料、植物病防除剤などの可能性が示され、機能的食品や生体機能素材として用途開発が盛んに行われている。また、キチン由来の単糖である *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) は変形性関節症の緩和

作用や美肌効果などが証明され、急速に市場が拡大している。キチンはカニ殻やエビ殻を、脱灰、除タンパク、脱色処理することにより調製され、GlcNAc はキチンを濃塩酸分解と酵素分解を組み合わせで製造されるが、製造工程が煩雑な上に大量の酸排液が発生し環境負荷が著しい。これを解決するために、キ

チナーゼなどの酵素のみでキチンを単糖まで分解する方法も提案されている。しかし、酵素が高価であること、材料として汎用されている α -キチンが水をはじめとする各種溶媒に不溶である上に、結晶構造が強固で分解され難いことなどから、酵素糖化法は実用化には至っていない。

代表者所属機関の戸谷ら(2009)は、キチンやカニ殻を新たに開発したコンバージミルでメカノケミカル粉碎すれば、食添リストに掲載されている *Streptomyces* 属由来の粗酵素によって直接糖化が可能であることを証明した(独)生研センターイノベーション創出基礎的研究推進事業(発展型)。これらのことから、研究代表者は、メカノケミカル粉碎により得られた特殊な微粉末を利用すれば、キチン質の直接酵素分解に関与する酵素の相乗効果(キチナーゼ間、キチナーゼ・プロテアーゼ間)を証明できるのではないかとの着想に至った。

また、キチナーゼは触媒ドメインの研究が多いが、水に拡散しないキチン質の表面に結合して分解に効果を発揮する CBD の有効性も重要である。強力な CBD とキチン分解酵素を組み合わせることでメカノケミカル粉碎キチンに対する分解効率が上がることを想定した。

2. 研究の目的

カニ殻などのキチン質から単糖を製造する際に環境負荷の原因となる、酸やアルカリによる現行法の化学処理を完全になくし、新しい方法を確立する。即ち、メカノケミカル粉碎によって強固な結晶構造が崩れたキチン質と、食品製造用酵素を利用してキチン分解効率を向上させ、キチンを覆っているタンパクをプロテアーゼ等で分解することで、直接糖化の効率化につなげ、高価なキチナーゼ使用量の低減を実現する。

3. 研究の方法

- 1) カニ殻を炭素源にした際の *S.griseus* から単離した RNA を材料に、Real-time PCR を行い、発現誘導される酵素を同定する。また、同培養条件で分泌されるメジャーなタンパクを分離・同定することにより、候補のキチナーゼ、及びプロテアーゼを絞り込む。
- 2) 候補酵素の異種発現を行って、精製する。精製方法に関して、条件検討を行う。
- 3) キチン質に対する相乗効果を調べる。効果的な組み合わせ、割合を明らかにする。

4. 研究成果

- 1) カニ殻を炭素源にした際の *Streptomyces griseus* から単離した RNA を材料に、Real-time PCR を行い、発現誘導される

酵素を同定した。キチン分解酵素、セリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼ、キチン結合タンパクを含む 14 遺伝子のうち、**8 遺伝子で誘導がかかっていた**。これらは全てキチン結合ドメインをもつキチナーゼ、セリンプロテアーゼとキチン結合タンパクであった。また、同培養条件で分泌されるメジャーなキチナーゼが、上記 Real-time PCR で絞り込んだものと一致していることを明らかにした。*S. griseus* を用いたこのような報告はなく、キチン分解系を明らかにする上で非常に興味深い結果だと考えられる。こうして**候補のキチナーゼ、及びプロテアーゼ、キチン結合タンパクを絞り込んだ**。

- 2) 候補酵素の大腸菌での異種発現を試み、キチナーゼ 2 種及びプロテアーゼ 1 種の発現に成功した。しかし、これらの酵素は不溶性になってしまい、活性を持った形での精製が難しかった。発現系を変えたものを作成したが、大部分が不溶性画分に発現するのは変わらなかった。そこで、**既に精製法が確立されている *Serratia marcescens* のキチナーゼを使用することにした**。
- 3) 大腸菌での発現が思わしくなかったキチン結合タンパク、及びプロテアーゼの発現にはブレビバチルス系の発現系を利用した。**キチン結合タンパク 4 種と、プロテアーゼの発現に成功した**。キチン結合タンパクに関してはノルウェーの UMB で精製法を習得した(Fig. 1)。プロテアーゼも収率は低いですが、精製法を確立した。

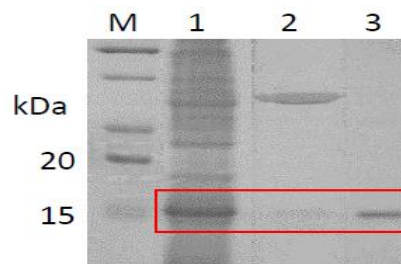


Fig. 1 キチン結合タンパクの精製
レーン 1 培養上清; 2 キチンアフィニティカラム精製後; 3 ゲル濾過カラム精製後

- 4) 得られた組換えタンパク質を *S. marcescens* 由来の 3 種類のキチナーゼと組み合わせて、 α -キチン、及び β -キチンに対する相乗効果を調べ、効果的な組み合わせを明らかにした。最も効果的だったのは、 β -キチンに ChiC とキチン結合タンパクのうちのひとつを作用させた際、1 日後の二糖生成量がキチン結

合タンパクを添加しなかった際の 30 倍にも増加した (Fig. 2)。

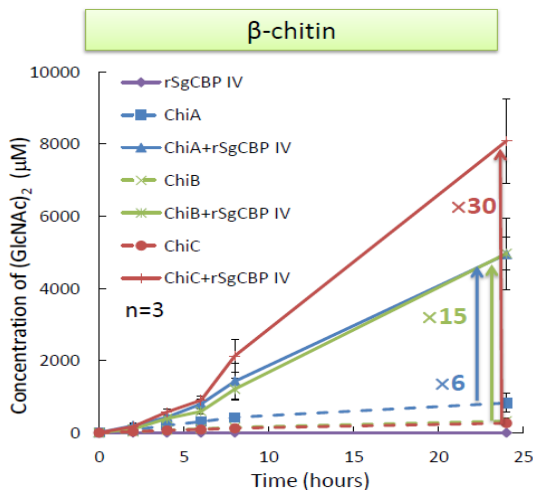


Fig. 2 キチン結合タンパクの酵素糖化促進効果

メカノケミカル粉碎による前処理は β -キチンには効果がないことが分かっていることから、 β -キチンの糖化にはこのキチン結合タンパクが非常に有効であると言える。

構造が強固で分解されにくい α -キチンでも、1 日後の糖化効率は軒並み 4-8 倍に増加した。この結果から、本キチン結合タンパクは、すでに実用化されているセルロース分解酵素に分解促進酵素が添加されているのと同様の使い方ができると考えられる。つまり、市販のキチナーゼに添加すれば、糖化効率を促進し、私用酵素量を減らすことができると考えられる。食品添加剤として認められている *Streptomyces* 属の酵素であることも大きい。これらの結果に関しては現在投稿論文を準備中である。

- 5) プロテアーゼの多量精製は難航しているが、市販のプロテアーゼを用いた予備実験を行ったところ、**カニ殻のキチナーゼ分解にはプロテアーゼによる前処理が効果的**であること、また必要なキチン分解酵素の量を大幅に減らせることが明らかになった (Fig. 3)。また、プレリミナルではあるが、 β -キチンの分解に効果があるという結果が得られており、再現性を確かめる予定である。得られた 3 種のキチン結合タンパクに関して、至適 pH と最低使用濃度を決定した。キチン結合タンパクは、比較的低濃度で効果的に働くことが明らかになった。また、至適 pH は中性付近であった。キチン分解酵素へのキチン結合タンパク添加は少量で効果があり、穏やかな条件で作用することから、工業的利用への実現が可能であると考えられる。

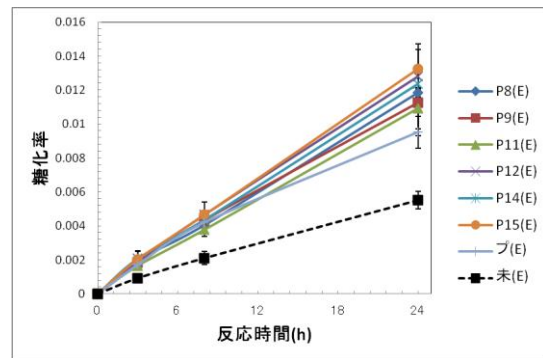


Fig. 3 市販のプロテアーゼのカニ殻分解促進効果

予備実験に使用した 16 種のプロテアーゼのうち 7 種が効果を示した。またこの際、キチン分解酵素は通常の 1/10 量でも十分な分解効率を示した。

- 6) ポイントミューテーションを入れたキチン結合タンパク質を作成して機能を詳細に解析するため、最も解析の進んでいるキチン結合タンパクの変異型コンストラクトを作成し、そのうち一つに関しては発現を確かめた。あと数種類作成予定である。
- 7) メカノケミカル粉碎したキチンに関する糖化への影響に関しては、 α -キチンでは結晶化度の低下に伴って糖化率が上がることを *S. griseus* の粗酵素、及び *S. marcescens* のキチン分解系を用いて証明した。特に *S. marcescens* のキチン分解系では、メカノケミカル粉碎によりキチン結合タンパクの効果が小さくなる (つまりキチン結合タンパクがなくてもキチン分解酵素が効率的に働くことができる) ということが明らかになった (Fig. 5)。現在投稿論文を準備中である。

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)

Yuko S. Nakagawa, Yasuhiro Oyama, Nobuko Kon, Mitsuru Nikaido, Koichi Tanno, Jun Kogawa, Shoji Inomata, Ayano Masui, Akihiro Yamamura, Mitsuaki Kawaguchi, Yoshiharu Matahira, Kazuhide Totani

Development of innovative technologies to decrease the environmental burdens associated with using chitin as a biomass resource: mechanochemical grinding and enzymatic degradation.

Carbohydrate polymers 83 (2011) 1843-1849. 査読有

[学会発表] (計 19 件)

工藤まどか, 中川裕子, Gustav

VaaJe-Kolstad, Vincent G. H. Eijsink, 戸谷一英
Streptomyces griseus 由来の CBM33, SgCBP IV のキチン酵素分解の促進
日本農芸化学会2012年度大会 2013年3月26日
仙台
千葉大介, 島山彩乃, 戸谷一英, 中川裕子
Streptomyces griseus 由来のCBM33, SgCBP V の機能解析 日本農芸化学会2012年度大会
2013年3月26日 仙台
Madoka KUDO, Yuko NAKAGAWA
One of CBM33s from *Streptomyces griseus* accelerated enzymatic chitin degradation.
International Symposium on Thechnology for Sustainability pp.25 2012年11月21-24日
Bangkok, Thailand
中川裕子
地域糖質資源の活用に向けた酵素分解系の開発 第37回糖質科学懇話会 2012年11月30日
江ノ島
戸谷一英, 古関健一, 中川裕子, 長田光正, 二階堂満 地域糖質資源を活用した機能性素材の開発 応用糖質科学シンポジウム 2012年9月21日 東京
Y. S. NAKAGAWA, M. KUDO, G. VAAJE-KOLSTAD, V. G. H. EIJSINK, and K. TOTANI
Synergistic effect of CBM33s from *Streptomyces griseus* for enzymatic chitin degradation. 6th Iberoamerican Chitin Symposium & 12th International Conference on Chitin and Chitosan 2012年9月2-5日 Fortaleza, Brazil
工藤まどか, 中川裕子, Gustav VaaJe-Kolstad, Vincent G. H. Eijsink, 戸谷一英
キチンの酵素分解における *Streptomyces griseus* 由来のCBM33の相乗効果 第26回キチン・キトサンシンポジウム 2012年7月13日 札幌
中川裕子, Gustav VaaJe-Kolstad, Vincent G. H. Eijsink, 戸谷一英
*Serratia marcescens*のキチン分解系においてメカノケミカル粉碎処理が与える効果 第26回キチン・キトサンシンポジウム 2012年7月13日 札幌
工藤まどか, 中川裕子, 鈴木一史, 渡邊剛志, 戸谷一英
Streptomyces griseus 由来推定キチン結合タンパクの異種発現と機能解析 日本農芸化学会大会 2012年3月24日 京都
中川裕子, 工藤まどか, VaaJe-Kolstad Gustav, Eijsink Vincent, 戸谷一英 *Streptomyces griseus* 由来のCBM33の機能解析 日本農芸化学会大会 2012年3月24日 京都
Yuko NAKAGAWA, Saeko TOCHIGI, Madoka KUDO and Kazuhide TOTANI
Study of synergistic activity for enzymatic chitin degradation

Norwegian biochemical society 48th contact meeting 2012年1月19-22日 Storefjell, Norway
工藤まどか, 柘木佐枝子, 戸谷一英, 中川裕子
キチン質の酵素糖化に相乗効果をもたらす因子の解析 第25回キチン・キトサンシンポジウム 2011年8月30,31日 奈良
Yuko Nakagawa, Saeko Tochigi, Madoka Kudo, and Kazuhide Totani
Study of synergistic activity for enzymatic chitin degradation
21st International symposium on glycoconjugates 2011年8月21-26日 Vienna, Austria
中川裕子, 柘木佐枝子, 工藤まどか, 戸谷一英
キチン質の酵素糖化における相乗効果の検討 日本農芸化学会年会 2011年3月5日 日本農芸化学会2011年度大会講演要旨集 (震災のため、口頭発表はできず)
Y. NAKAGAWA, N. KON, N. YOSHIDA, M. NIKAIIDO, A. MASUI, A. YAMAMURA, M. KAWAGUCHI, Y. MATAHIRA, and K. TOTANI
Expression analysis of chitin inducible genes and study of synergistic activity on chitin degradation
Mechanochemical grinding and enzymatic degradation. 25th International Carbohydrate Symposium 平成22年8月1-6日 幕張
Kazuhide TOTANI, Yuko NAKAGAWA, Nobuko KON, Yasuhiro OYAMA, Mitsuru NIKAIIDO, Mitsumasa OSADA, Mikio KAIHARA, Koichi TANNO, Jun KOGAWA, Shoji INOMATA, Ayano MASUI, Akihiro YAMAMURA, Mitsuaki KAWAGUCHI and Yoshiharu MATAHIRA
Advanced utilization of chitin resources with technology for reducing environmental loads; Mechanochemical treatment and mechanism of enzymatic degradation. 25th International Carbohydrate Symposium 平成22年8月1-6日 幕張
Kazuhide Totani, Yuko Nakagawa, Mitsumasa Osada, Mikio Kaihara, Mitsuru Nikaido, Jun Kogawa, Shoji Inomata, Mitsuaki Kawaguchi, Ayano Masui, Akihiro Yamamura, Yoshiharu Matahira
Pretreatments and enzymatic degradation of chitin. Plant Polysaccharide and Applied Glycoscience Workshop 2010 2010年7月29-31日
中川裕子, 長田光正, 貝原巳樹雄, 二階堂満, 粉川潤, 猪俣尚治, 増井彩乃, 山村昭博, 川口光朗, 又平芳春, 戸谷一英
キチン質の前処理と酵素分解 第24回キチン・キトサンシンポジウム 2010年7月13-14日 東京
柘木佐枝子, 中川裕子, 二階堂満, 増井彩乃, 山村昭博, 川口光朗, 又平芳春, 戸谷一英

キチン酵素糖化に関与するStreptomyces
griseus由来の因子 第24回キチン・キトサン
シンポジウム 2010年7月13-14日 東京大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.ichinoseki.ac.jp/gyoseki/che/NakagawaYuko.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 裕子

一関工業高等専門学校 物質化学工学科
助教

研究者番号 : 70435577