

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450309

研究課題名(和文) 海洋生物からの新規キチナーゼの検索・機能解析および応用技術開発

研究課題名(英文) Search, characterization, and application of new chitinase from marine organisms

研究代表者

松宮 政弘 (MATSUMIYA, Masahiro)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60150702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：カニ・エビなどの甲羅を構成するキチン質は地球上に豊富に存在するが、その多くが利用されずに廃棄されている。一方、このキチン質をキチン分解酵素(キチナーゼ)で分解すると、機能性食品素材として有効活用できることがわかりだした。本研究ではカニ・エビのキチンの分解に適したキチナーゼを海洋生物から探し出す基礎研究、それを活用するための応用技術開発を実施した。

2魚種の胃より各2種、2種のタコより各1種、計6種のキチナーゼを分離し、機能を解析した。さらに魚類、軟体動物、カニより計11種のキチナーゼ全長遺伝子を取得した。機能解析から活用できるキチナーゼの遺伝子を選び、微生物によるキチナーゼ生産を実施した。

研究成果の概要(英文)：Chitinase is a useful enzyme for enzymatic production of chitin oligosaccharides which are bioactive substance. Therefore, we conducted purification, characterization, molecular cloning, and expression of chitinases from several kinds of marine organisms. Six kinds of chitinases were purified and characterized from two species of fish stomach, *Parapristipoma trilineatum* and *Sardinops melanostictus*, and two species of octopus salivary gland, *Octopus vulgaris* and *Octopus dofleini*. Eleven kinds of full length chitinase cDNA were obtained from four species of fish stomach, two species of octopus salivary gland, one species of cuttlefish liver, and one species of sea hare ovotestis. Expression vector system of chitinases from *Sebastiscus marmoratus* stomach and shark stomach were constructed and expressions were conducted using *E. coli* and yeast, respectively.

研究分野：水産利用学

キーワード：キチナーゼ 精製 機能解析 cDNAクローニング 発現 魚類 軟体動物 甲殻類

## 1. 研究開始当初の背景

(1)カニ・エビなどの甲殻を形成するキチン質は、地球上ではセルロースに次いで2番目に多いバイオマスである。キチナーゼはキチンを分解し、キチンオリゴ糖を生成する酵素である。キチンオリゴ糖は免疫賦活・肝機能改善・抗腫瘍作用を、単糖(N-アセチルグルコサミン)は甘味(砂糖の60%)を有して変形性関節炎治療作用・美肌効果などを示し、両者とも機能性食品素材として極めて有用である。しかしながら天然に存在するキチン質は強固な結晶構造を有して不溶性であり、これまでに報告されている微生物由来の酵素では殆ど分解されない。現在、キチンオリゴ糖やN-アセチルグルコサミンは、酸・アルカリ処理などで調製されているが、廃液処理や副産物が多く、酵素的製造に適した酵素の供給が望まれている背景がある。

(2)生物に分布するキチナーゼは食物の消化、脱皮、攻撃、生体防御などの様々な生理的役割を果たしていることが報告されている。一方、海洋生物のキチナーゼに関する情報は少なく、学術面においても基礎的知見の蓄積が望まれている背景がある。

## 2. 研究の目的

(1)各種海洋生物におけるキチナーゼ活性の分布を調べ、さらにキチナーゼを精製してその性状を明らかにする。また、遺伝子クローニングのための情報を得る目的で部分アミノ酸配列解析も解析する。さらに、キチンを分解してキチンオリゴ糖生成に役立つ新規キチナーゼを検索する目的のため、結晶性キチン分解能やオリゴ糖分解様式を詳細に調査する。

(2)海洋生物キチナーゼの構造を明らかにする目的のため、cDNA クローニングを実施し、全長遺伝子を取得する。さらにそれらキチナーゼの利用を目的とするため、異種宿主による発現系構築および発現を実施する。

## 3. 研究の方法

(1)キチナーゼの精製、性質・機能解析および部分アミノ酸配列の解析：粗酵素液調製、硫酸分画、アフィニティーカラム、疎水カラム、イオン交換カラム、ゲルろ過カラムなどを用いてキチナーゼを精製する。酵素反応の最適条件を調べる。高分子不溶性基質および低分子可溶性基質に対する分解能および分解様式を測定する。N-末端アミノ酸配列の測定。リジルエンドペプチダーゼ分解後にトリシン SDS-PAGE で分離し、PDEF 膜に転写後に内部アミノ酸配列を解析する。

(2)キチナーゼの cDNA クローニングおよび異種宿主による発現：各器官より Total RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて mRNA より cDNA のテンプレートを合成する。精製キチナーゼの N-末端アミノ酸配列、内部アミノ酸配列および各種生物種の保存配列より縮重プライマーを設計し、ネステッド PCR にて DNA フラ

グメントを増幅する。得られた DNA フラグメントをベクターに結合させ、大腸菌に形質転換させ、プラスミド内で増幅させる。プラスミドを精製し、ベクターの配列より合成したプライマーを用いてシークエンス用 PCR を実施する。シークエンスにて部分塩基配列を明らかにする。得られた部分配列より上流および下流域のプライマーを設計し、5' および 3' RACE 法により上流および下流域を増幅させる。上記と同様に塩基配列を解析する。解析した塩基配列より開始コドンおよび終止コドンを検出し、それらの上流および下流域でプライマーを設計し、補正能を持つポリメラーゼを用いて再度全長 PCR を実施し、増幅物をベクターに連結後、大腸菌に取り込ませる。大腸菌ストックを作成し、塩基配列を再度確認する。塩基配列よりアミノ酸配列を演繹し、キチナーゼの活性ドメイン、キチン吸着ドメインなどの構造特性を明らかにする。その後、異種宿主による発現系を構築し、発現させる。

## 4. 研究成果

(1)魚類キチナーゼの精製・性質・機能解析：イサキ胃より 50 kDa および 60 kDa のキチナーゼ、マイワシ胃より 45 kDa および 49 kDa のキチナーゼを精製し、その性質、機能解析を実施した。マイワシ胃キチナーゼは結晶性キチン分解能が高い事を明らかにした。

(2)軟体動物ではマダコ唾液腺より 56 kDa キチナーゼ、ミスダコ唾液腺より 42 kDa キチナーゼを精製し、機能解析を実施した。マダコ唾液腺キチナーゼは最適が pH4.5、最適温度が 40 で、キチンナノファイバーを良く分解した。N-末端アミノ酸配列およびキチンオリゴ糖分解様式より、family-18 エンド型キチナーゼに属すると考えられた。

(3)魚類キチナーゼの cDNA クローニング：イサキ胃より 2 種のキチナーゼ全長遺伝子 *PtChi-1*、*PtChi-2*、カサゴ胃より 2 種のキチナーゼ全長遺伝子 *SmChi-1*、*SmChi-2*、マイワシ胃より 2 種のキチナーゼ全長遺伝子 *SmChi-1*、*SmChi-2*、ヨリキリザメ胃より 1 種のキチナーゼ全長遺伝子 *PgChi* を取得した。

(4)軟体動物キチナーゼの cDNA クローニング：コウイカ肝臓より 1 種のキチナーゼ全長遺伝子 1,508 bp (ORF は 1,380bp)、アメフラシよりキチン結合ドメインを欠く 1 種のキチナーゼ全長遺伝子 1,352 bp (ORF は 1,263bp) を取得した。

(5)甲殻類キチナーゼの cDNA クローニング：ガザミ中腸腺より 2 種のキチナーゼ全長遺伝子 *PotChi-1*、*PotChi-2* を取得した。

(6)キチナーゼの異種宿主発現：カサゴ胃キチナーゼ遺伝子をコールドショック発現ベクターに挿入した発現系を構築し、大腸菌による発現を実施した。また、ホシザメ胃キチナーゼを発現ベクター-pPICZ A に挿入して酵母を用いた発現を実施し、発現条件を検討した。前者より僅かながら発現を観察し、発

現条件を検討中。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Gaku Matsunaga, Syuuji Karasuda, Ryo Nishino, Hideto Fukushima, Masahiro Matsumiya, Molecular cloning of a chitinase gene from the cvotestis of Kuroda's sea hare *Aplysia kurodai*, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 査読有, Vol. 7, 2016, pp. 38-46, DOI: [10.4236/abb.2016.71005](https://doi.org/10.4236/abb.2016.71005)

Satoshi Kawashima, Hiroki Ikehata, Chihiro Tada, Tomohiro Ogino, Hiromi Kakizaki, Mana Ikeda, Hideto Fukushima, Masahiro Matsumiya, Stomach chitinase from Japanese sardine *Sardinops melano-stictus*: purification, characterization, and molecular cloning of chitinase isozymes with a long linker, *Marine Drugs*, 査読有, Vol.14/22, 2016, pp. 1-13, DOI: [10.3390/md14010022](https://doi.org/10.3390/md14010022)

Hiromi Kakizaki, Mana Ikeda, Hideto Fukushima, Masahiro Matsumiya, Distribution of chitinolytic enzymes in the organs and cDNA cloning of chitinase isozymes from the stomach of two species of fish, chub mackerel (*Scomber japonicus*) and silver croaker (*Pennahia argentata*), *Open Journal of Marine Science*, 査読有, Vol. 5, 2015, pp. 398-411, DOI: [10.4236/ojms.2015.54032](https://doi.org/10.4236/ojms.2015.54032)

Ryo Nishino, Akiyoshi Suyama, Mana Ikeda, Hiromi Kakizaki, Masahiro Matsumiya, Purification and characterization of a liver chitinase from golden cuttlefish, *Sepia esculenta*, *Journal of Chitin and Chitosan Science*, 査読有, Vol. 2 (3), 2014, pp. 238-243, DOI: [10.1166/jcc.2014.1065](https://doi.org/10.1166/jcc.2014.1065)

Naoya Fujitani, Hirotaka Hasegawa, Hiromi Kakizaki, Mana Ikeda, Masahiro Matsumiya, Molecular cloning of multiple chitinase genes in swimming crab *Portunus trituberculatus*, *Journal of Chitin and Chitosan Science*, 査読有, Vol. 2, No. 2, 2014, pp. 149-156, DOI: [10.1166/jcc.2014.1046](https://doi.org/10.1166/jcc.2014.1046)

Teruhisa Suzuki, Hiromi Kakizaki, Mana Ikeda, Masahiro Matsumiya, Molecular cloning of a novel chitinase gene from blue shark (*Prionace glauca*; Chondrichthyes) stomach, *Journal of Chitin and Chitosan Science*, 査読有, Vol. 2, No. 2, 2014, pp. 143-148, DOI: [10.1166/jcc.2014.1050](https://doi.org/10.1166/jcc.2014.1050)

Tomohiro Ogino, Hirotaka Tabata, Mana Ikeda, Hiromi Kakizaki, Masahiro Matsumiya, Purification of a chitinase

from the posterior salivary gland of common octopus *Octopus vulgaris* and its properties, *Journal of Chitin and Chitosan Science*, 査読有, Vol. 2, No. 2, 2014, pp. 135-142,

DOI: [10.1166/jcc.2014.1049](https://doi.org/10.1166/jcc.2014.1049)

Hiromi Kakizaki, Kaneyuki Hamaguchi, Mana Ikeda, Masahiro Matsumiya, Cloning of a novel chitinase cDNA from the stomach of the coelacanth *Latimeria chalumnae* (Sarcopterygii), *Journal of Chitin and Chitosan Science*, 査読有, Vol. 2, No. 2, 2014, pp. 123-129,

DOI: [10.1166/jcc.2014.1051](https://doi.org/10.1166/jcc.2014.1051)

Mana Ikeda, Daisuke Shirase, Takuya Sato, Mika Ueda, Shinichi Hirabayashi, Masahiro Matsumiya, Primary structure and enzymatic properties of chitinase isozymes purified from the stomach of the marbled rockfish *Sebastiscus marmoratus*, *Journal of Chitin and Chitosan Science*, 査読有, Vol. 2, No. 2, 2014, pp. 106-116, DOI: [10.1166/jcc.2014.1048](https://doi.org/10.1166/jcc.2014.1048)

〔学会発表〕(計 30 件)

荻野智大、柿崎博美、池田愛、福島英登、松宮政弘：マダコ唾液腺、盲嚢および中腸腺に存在するキチナーゼの性状比較と中腸腺キチナーゼの cDNA クローニング、日本水産学会秋季大会、2015 年 9 月 23 日、東北大学（宮城県・仙台市）

西野亮、柿崎博美、池田愛、福島英登、松宮政弘：アオリイカにおけるキチナーゼの体内分布と cDNA クローニング、日本水産学会秋季大会、2015 年 9 月 23 日、東北大学（宮城県・仙台市）

松永岳、西野亮、柿崎博美、福島英登、松宮政弘：アメフラシ *Aplysia kurodai* 生殖腺キチナーゼの cDNA クローニング、日本水産学会秋季大会、2015 年 9 月 23 日、東北大学（宮城県・仙台市）

川島聖史、水野寛己、柿崎博美、池田愛、福島英登、上田光宏、松宮政弘：ホシザメ胃由来キチナーゼ遺伝子のクローニングおよび異種宿主発現、日本水産学会秋季大会、2015 年 9 月 23 日、東北大学（宮城県・仙台市）

Satoshi Kawashima, Hiromi Kakizaki, Kaneyuki Hamaguchi, Mana Ikeda, Hideto Fukushima, Masahiro Matsumiya, Molecular cloning of a chitinase gene from the stomach of cloudy catshark *Scyliorhinus torazame* (Chondrichthyes), 13<sup>th</sup> International Conference on Chitin and Chitosan, Session A, Aug. 30<sup>th</sup>-Sept. 2<sup>nd</sup> 2015, Münster, Germany.

Ryo Nishino, Hiromi Kakizaki, Mana Ikeda, Hideto Fukushima, Masahiro Matsumiya, Molecular cloning of a chitinase from the liver of Japanese common squid *Todarodes*

*pacificus*, 13<sup>th</sup> International Conference on Chitin and Chitosan, Session D, Aug. 30<sup>th</sup>-Sept. 2<sup>nd</sup> 2015, Münster, Germany.

Kazumasa Kajiwara, Ryo Nishino, Hideto Fukushima, Masahiro Matsumiya, Distribution of chitinase and cellulase activity in the several organs of a fish, largescale blackfish *Girella punctate*, 13<sup>th</sup> International Conference on Chitin and Chitosan, Session D, Aug. 30<sup>th</sup>-Sept. 2<sup>nd</sup> 2015, Münster, Germany.

Hiromi Kakizaki, Satoshi Kawashima, Taro Tsukamoto, Miku Fujiwara, Mana Ikeda, Hideto Fukushima, Masahiro Matsumiya, Molecular cloning of chitinase gene from the kidney of five fish species, 13<sup>th</sup> International Conference on Chitin and Chitosan, Session B, Aug. 30<sup>th</sup>-Sept. 2<sup>nd</sup> 2015, Münster, Germany.

荻野智大、柿崎博美、池田 愛、福島英登、松宮政弘：マダコ盲囊キチナーゼの精製と性状、第 29 回日本キチン・キトサン学会大会、2015 年 8 月 20 日、東海大学熊本キャンパス（熊本県・熊本市）

松永 岳、柿崎博美、池田 愛、福島英登、上田光宏、松宮政弘：カサゴ胃由来キチナーゼの大腸菌による発現、第 29 回日本キチン・キトサン学会大会、2015 年 8 月 20 日、東海大学熊本キャンパス（熊本県・熊本市）

柿崎博美、池田 愛、藤原美玖、福島英登、松宮政弘：数種硬骨魚類におけるキチン分解酵素の体内分布と cDNA クローニング、第 29 回日本キチン・キトサン学会大会、2015 年 8 月 20 日、東海大学熊本キャンパス（熊本県・熊本市）

Masahiro Matsumiya, Hiromi Kakizaki, Mana Ikeda, Glycoside hydrolase family18 chitinase from the stomach of fish: characteristics of isozymes, 29th Annual Symposium of the Protein Society, 22-25 July 2015, Barcelona, Spain.

藤谷直矢、長谷川浩隆、柿崎博美、池田愛、松宮政弘：ガザミ中腸腺キチナーゼの性状と cDNA クローニング、日本水産学会秋季大会、2014 年 9 月 20 日、九州大学（福岡県、福岡市）

西野亮、池田愛、柿崎博美、松宮政弘：コウイカ肝臓キチナーゼの一次構造と特性、日本水産学会秋季大会、2014 年 9 月 20 日、九州大学（福岡県、福岡市）

荻野智大、柿崎博美、池田愛、松宮政弘：2 種のタコにおけるキチン分解酵素の体内分布とミズダコ唾液腺キチナーゼの性状、日本水産学会秋季大会、2014 年 9 月 20 日、九州大学（福岡県、福岡市）

鈴木輝久、今村良、柿崎博美、池田愛、松宮政弘：軟骨魚類ホシザメおよびヨシキリザメ胃におけるキチナーゼの存在と性質、日本水産学会秋季大会、2014 年 9 月 20 日、九州大学（福岡県、福岡市）

柿崎博美、岩田龍一、勝瀬竜土、塚本太郎、藤原美玖、池田愛、松宮政弘：数種魚類におけるキチン分解酵素の体内分布とキチナーゼの cDNA クローニング、2014 年 9 月 20 日、九州大学（福岡県、福岡市）

川島聖史、池端弘樹、多田千紘、柿崎博美、池田愛、上田光宏、松宮政弘：マイワシ胃キチナーゼアイソザイムの性状と一次構造の比較、2014 年 9 月 20 日、九州大学（福岡県、福岡市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松宮 政弘 (MATSUMIYA, Masahiro)  
日本大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号：60150702