

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：51201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25850077

研究課題名(和文)キチン質の酵素糖化促進因子の解析

研究課題名(英文)Analysis of factors for enzymatic chitin solubilization

研究代表者

中川 裕子(Nakagawa, Yuko)

一関工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：70435577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：将来的に食品分野に応用が可能なStreptomyces griseusを材料に、多糖バイオマスであるキチン質の酵素分解を飛躍的に促進する因子である多糖モノオキシゲナーゼ(LPMO10)の解析を行った。S. griseusのゲノム中に存在する6つのLPMO10のうち、5つについて解析を行い、4つはキチン分解を促進することを証明した。最も解析の進んだSgLPMO10FについてはFEBS Journalに成果を報告し、セルロース分解を促進することが判明したSgLPMO10Aに関しては投稿準備中である。

研究成果の概要(英文)：The lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) have ability to boost the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. In the genome of Streptomyces griseus, 6 LPMO10 genes exist. We analyzed 5 SgLPMO10s and 4 of them showed ability to boost the enzymatic conversion towards alpha and beta-chitin. As regards to SgLPMO10F, we had published a paper in the FEBS Journal. SgLPMO10A, which is active on cellulose, showed novel activity as deacetylase. These data can be applied enzymatic conversion of polysaccharide biomass.

研究分野：農芸化学

キーワード：多糖バイオマス 酵素分解 ブースター 分解促進 LPMO キチン セルロース Streptomyces griseus

1. 研究開始当初の背景

キチンはカニ、エビなどの甲殻類や昆虫類の外骨格、菌類の細胞壁などに含まれ、セルロースに次ぐ第二のバイオマス多糖資源と言われている。環境に負荷のかからない酵素分解法でキチン鎖の構成成分単糖である *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を得るため、酵素分解力の向上に関して、基礎研究が進められていた。

研究代表者は、実用化を視野に入れ、古くからストレプトマイシンの製造に利用されており、食品製造用酵素の生産菌として食品添加物収載リスト (食添リスト) に登録されている *Streptomyces* 属を材料に使用した。*S. griseus* を培養する際にキチンを炭素源に与えると、キチナーゼや、キチン結合ドメイン (CBD) を有するタンパク (CBP)、セリンプロテアーゼ等の分泌が増加し、遺伝子の転写量も増加する。CBP は基質とキチン分解酵素の結合の機会を増やし、分解における相乗効果をもたらすのではないかという点に着目して研究を始めた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、キチン質の効率的な酵素糖化に関わる因子を解明し、産業応用に資することである。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。これまでキチナーゼの研究は多くなされてきたが、キチナーゼの分解効率を爆発的に向上させるキチン結合タンパク (CBP、現在の LPMO10)、及びキチン結合ドメインを持つプロテアーゼを詳細に解析することで、直接糖化の効率化につなげ、食品製造に応用可能な酵素カクテルを提案する。

3. 研究の方法

研究代表者が在外中にキチンの酵素分解を促進することを見出した *S. griseus* の SgLPMO10s (旧 SgCBPs) 3種、及び、機能未知で基本構造の異なる1種をプレバチルスの系で異種発現させ、組換えタンパクを精製して解析に用いる。直接活性測定は MALDI-TOF MS 及び UHPLC によって検出し、多糖分解酵素と組み合わせて HPLC 等を用いた反応産物の定量を行う。反応に重要なアミノ酸残基に関しては、変異体を作成し、解析する。高効率で反応産物が得られる基質と酵素、SgLPMO10 の組み合わせや反応条件を調べる。

4. 研究成果

(1) 精製方法が確立していなかったキチン結合ドメインを持つプロテアーゼや、SgLPMO10A (旧 SgCBP V) の異種発現及び精製方法を確立した。また、野生型の組換えタンパクと同様の手法では精製できないアミノ

酸変異タンパク質数種に関して、精製方法を検討・確立した。

(2) 組換えタンパクの大量精製法に関して検討し、プレバチルスの系を用いて、多いものでは数十 mg 単位でタンパクを精製することができた。精製が非常に困難であったプロテアーゼに関して数 mg を確保しつつある。

(3) SgLPMO10A, C, D, F を -及び -キチンに作用させ、 α -キチンにも β -キチンにもキチナーゼ C と SgLPMO10F の組み合わせが最も効果的であることを明らかにした (表 1)。

SgLPMO10A は、添加の有無でキチン分解産物量に明確な差は現れなかったため、表には記載していない。

表 1 SgLPMO10s 添加、及び未添加時の α -及び β -キチン分解産物量の比較

	α -chitin			β -chitin		
	ChiA	ChiB	ChiC	ChiA	ChiB	ChiC
SgLPMO10C	4.7	3.9	4.2	4.2	13.6	20.9
SgLPMO10D	3.6	3.6	3.1	2.8	7.8	8
SgLPMO10F	3.6	4.2	6	6	15.2	30.3

特に β -キチンを基質に用いた場合には、反応開始 24 時間後の反応生成物が、SgLPMO10F 未添加の場合と比較して、30 倍以上に増大した。しかし、LPMO10 が基質に与える効果は、もともと分解が容易な β -キチンよりも α -キチンに対しての方が大きかった。キチン分解酵素と SgLPMO10F の最適な混合割合は 0.2 μ M と等濃度であること、至適 pH は中性付近であることが分かった。

(4) SgLPMO10F に関して、アミノ酸置換した変異体を数種作成し、特に効率の良い分解が難しいとされる -キチンの酵素分解に効果的な変異体を作成することに成功した (図 1)。この SgLPMO10F に関してはここまでの成果で論文発行済みである。現在この変異体が -キチンの酵素分解に効果的な理由を探究している。

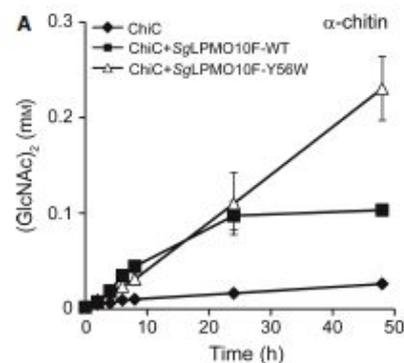


図 1. α -キチンを基質にした際の SgLPMO10F (WT) と SgLPMO10F のアミノ酸置換体 (Y56W) の分解産物量
反応開始 48 時間後に WT と Y56W の間に明確な差がみられる。

(5) 機能未知であった SgLPMO10A がキチン上でもセルロース上でも活性を持つことを明らかにした。キチンを基質とした際には脱アセチル化能を持つ可能性が示され、SgLPMO10A が新規の機能を持つ LPMO10 であることが示唆された。セルロースを基質にした際には、セルラーゼのブースターとして働き、特に分解しにくい紙を基質にした際に酵素分解効率を飛躍的に向上させることが明らかになった (図2)。SgLPMO10A に関しては、投稿準備中である。

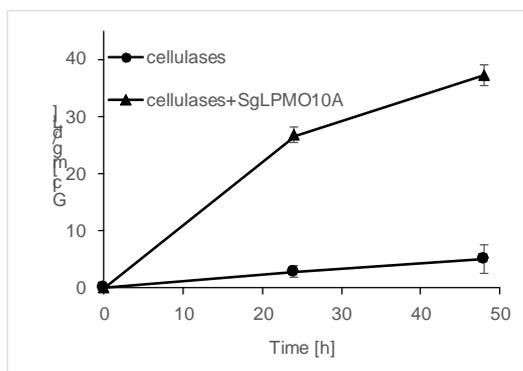


図 2. セルラーゼによるろ紙の酵素分解に SgLPMO10A の有無が与える効果
SgLPMO10A を添加した場合の 48 時間後のグルコース生成量は、未添加の約 8 倍になっている。

(6) 基質の物性評価と LPMO10s の触媒機構の詳細な解析から、LPMO10s が結晶性の高い多糖をメカノケミカル粉砕し、結晶化度を下げた際と同様の働きをすることが考察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Effect of sub- and supercritical water treatments on the physicochemical properties of crab shell chitin and its enzymatic degradation. 査読有
Mitsumasa Osada, Chika Miura, Yuko S. Nakagawa, Mikio Kaihara, Mitsuru Nikaido, Kazuhide Totani. Carbohydrate Polymers 134 (2015.12) 718-725

DOI: [10.1016/j.carbpol.2015.08.066](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.066)

A small lytic polysaccharide monoxygenase from *Streptomyces griseus* targeting - and -chitin. 査読有
Nakagawa YS, Kudo M, Loose JS, Ishikawa T, Totani K, Eijsink VG, Vaaje-Kolstad G. FEBS J. 282(6) (2015.3) 1065-1079

DOI: [10.1111/febs.13203](https://doi.org/10.1111/febs.13203)

Conversion of -chitin substrates with varying particle size and crystallinity reveals substrate preferences of the chitinases and lytic polysaccharide monoxygenase of *Serratia marcescens*. 査読有
Nakagawa YS, Eijsink VG, Totani K,

Vaaje-Kolstad G. J Agric Food Chem. 61(46) (2013.11) 11061-6.

DOI: [10.1021/jf402743e](https://doi.org/10.1021/jf402743e)

糖質資源の活用に向けた酵素分解系の開発 査読有

中川裕子 応用糖質科学 (2013.8) 第 3 巻 (3) 197-199

地域糖質資源を活用した機能性食品・素材の開発 査読有

戸谷一英, 古関健一, 中川裕子, 長田光正, 二階堂満 応用糖質科学 (2013.5) 第 3 巻 (2) 159-165

〔学会発表〕(計 27 件)

国際学会

Functional analysis of SgLPMO10A, one of LPMOs from *Streptomyces griseus*. Kazuki Sato and Yuko Nakagawa. STI-Gigaku 長岡技術科学大学 2017.1.5-7 SgCBP V of AA10s from *Streptomyces griseus* accelerated enzymatic chitin degradation. Daisuke Chiba and Yuko Nakagawa. The 3rd International Symposium on Technology for Sustainability 2013 pp.100 Hong Kong/China 2013.11.20-22

AA10-type (auxiliary activity family 10) proteins from *Streptomyces griseus* accelerate enzymatic chitin degradation. Y. S. Nakagawa, M. Kudo, V. G. H. Eijsink, K. Totani, G. Vaaje-Kolstad. 第 10 回 Asia-Pacific Chitin & Chitosan Symposium 第 27 回日本キチン・キトサンシンポジウム 米子コンベンションセンター pp.182 Yonago/Japan 2013.10.4-8

Development of functional materials utilizing squid pens in Sanriku. Kenichi Koseki, Yuko S. Nakagawa, Mitsumasa Osada, Mitsuru Nikaido, Takashi Watanabe, Kazuhide Totani. 第 10 回 Asia-Pacific Chitin & Chitosan Symposium 第 27 回日本キチン・キトサンシンポジウム 米子コンベンションセンター Yonago/Japan 2013.10.4-8

New method for -chitin production from squid pens by high-temperature water treatment. Mitsumasa Osada, Takumi Yaegashi, Kazushi Kikuta, Kenichi Koseki, Yuko Nakagawa, Mitsuru Nikaido, Takashi Watanabe, Kazuhide Totani. 第 10 回 Asia-Pacific Chitin & Chitosan Symposium 第 27 回日本キチン・キトサンシンポジウム 米子コンベンションセンター Yonago/Japan 2013.10.4-8

国内学会

Streptomyces griseus 由来の LPMO10 の解析 中川裕子, 渡辺惣汰, 石川隆大, Jennifer S.M. Loose, 竹林晃, 加藤早紀, 森俊明, 戸谷一英, Vincent G.H. Eijsink, Gustav Vaaje-Kolstad 日本農芸化学会 2017 年度大会 京都女子大学 2017.3.17-20

Streptomyces griseus 由来 LPMOs、SgLPMO10A の機能解析 里和希、千葉大介、戸谷一英、中川裕子 日本農芸化学会 2017 年度大会 京都女子大学 2017.3.17-20

Streptomyces griseus 由来の LPMO10 の解析 中川裕子、Jennifer. S.M. Loose, 石川隆大、千葉大介、竹林晃、戸谷一英、Vincent G.H. Eijsink, Gustav Vaaje-Kolstad 第 30 回日本キチン・キトサン学会大会 ウェスタ川越 2016.8.19 キチン・キトサン研究 22, 2 pp. 120-121

変異体を用いたキチン分解促進因子 SgLPMO10F の機能解析 渡辺惣汰, 石川隆大, 加藤早紀, 森俊明, 戸谷一英, Vincent G.H. Eijsink, Gustav Vaaje-Kolstad, 中川裕子 第 30 回日本キチン・キトサン学会大会 (ポスター発表) ウェスタ川越 2016.8.18-19 キチン・キトサン研究 22(2) pp. 131

Streptomyces griseus 由来 LPMO , SgLPMO10A の機能解析 里和希 千葉大介 中川裕子 平成 27 年度東北地区高等専門学校専攻科産学連携シンポジウム 仙台工業高等専門学校 広瀬キャンパス 2016.12.5-6

キチン分解促進因子 SgLPMO10F の変異体の発現と精製 渡辺惣汰、中川裕子 平成 27 年度東北地区高等専門学校専攻科産学連携シンポジウム 仙台工業高等専門学校 広瀬キャンパス 2016.12.5-6

様々なキチン上におけるキチン分解酵素反応の 1 分子計測と機能性材料への展開 加藤早紀, 増井有子香, 森俊明, 中川裕子 第 64 回高分子討論会 東北大学川内キャンパス 2015.9.15-17

AFM 力学計測を用いたキチン表面への種々のキチン分解酵素反応の解析 加藤早紀, 森俊明, 中川裕子 第 64 回高分子学会年次大会 札幌コンベンションセンター 2015.5.27-29

高速 AFM を用いたキチン分解酵素のキチンへの結合・分解挙動の直接イメージング 増井有子香, 加藤早紀, 森俊明, 中川裕子 第 64 回高分子学会年次大会 札幌コンベンションセンター 2015.5.27-29

高温高圧水処理によるイカ中骨からのキチン調製 長田光正, 古関健一, 古川滉人, 中川裕子, 渡邊崇, 二階堂満, 戸谷一英 日本農芸化学会 2015 年度大会 岡山大学・津島キャンパス 2015.3.26-29

高速 AFM によるキチン分解酵素反応の 1 分子観察 加藤早紀, 増井有子香, 中川裕子, 森俊明 日本化学会第 95 春季年会 日本大学船橋キャンパス 2015.3.26-29

種々のキチン分解酵素によるキチンへの結合・分解挙動の AFM 1 分子解析 加藤早紀, 中川裕子, 森俊明 第 63 回高分子討論会 長崎大学 2014.9.24-26

Streptomyces griseus 由来のキチン分解促進因子 SgCBP IV の解析 石川隆大, 工藤まどか, 戸谷一英, Vincent G. H. Eijsink,

Gustav Vaaje-Kolstad, 中川裕子 第 28 回キチン・キトサンシンポジウム 順天堂大学 本郷・お茶の水キャンパス 2014.8.7-8

-キチンナノファイバーの製造と物性評価 戸谷一英, 二階堂望, 中川裕子, 二階堂満, 長田光正, 甲野裕之, 伊藤良仁, 高橋亨, 小浜恵子, 古関健一, 石村惣一, 田代勝男, 谷口隆雄, 成廣和枝, 山下和彦 第 28 回キチン・キトサンシンポジウム 順天堂大学本郷・お茶の水キャンパス 2014.8.7-8

高温高圧水を用いたイカ中骨からの新規キチン調製法 長田光正, 古川滉人, 古関健一, 中川裕子, 渡邊崇, 二階堂満, 戸谷一英 第 28 回キチン・キトサンシンポジウム 順天堂大学 本郷・お茶の水キャンパス 2014.8.7-8

⑲ AFM を用いたキチン分解酵素反応の 1 分子観察 森俊明, 加藤早紀, 中川裕子 第 24 回バイオ・高分子シンポジウム 東京工業大学 2014.7.24-25

⑳ *Serratia marcescens* 2170 由来の CBP21 のファミリー 19 キチナーゼによるキチン分解への効果 高橋亮大, 森山拓実, 猪又義広, 杉本華幸, 中川裕子, 鈴木一史, 戸谷一英, 渡邊剛志 日本農芸化学会 2014 年度大会 明治大学・生田キャンパス 2014.3.27-30

㉑ *Streptomyces griseus* 由来の AA10 family のキチン分解促進効果 中川裕子, 工藤まどか, 竹林晃, 戸谷一英, 大塚未来, 渡邊剛志, Vincent G.H. Eijsink, Gustav Vaaje-Kolstad 日本農芸化学会 2014 年度大会 明治大学・生田キャンパス 2014.3.27-30

㉒ *Streptomyces griseus* 由来の AA10, SgCBP V の諸性質と機能解析 千葉大介, 畠山彩乃, 戸谷一英, 中川裕子 日本農芸化学会 2014 年度大会 明治大学・生田キャンパス 2014.3.27-30

㉓ 三陸のイカ中骨を活用した機能性素材の開発 戸谷一英, 片ヶ瀬峻哉, 古関健一, 中川裕子, 長田光正, 渡邊崇, 二階堂満, 甲野裕之, 伊藤良仁, 高橋亨, 小浜恵子, 谷口隆雄, 成廣和枝, 山下和彦, 石村惣一, 伊藤典久, 田代勝男 日本農芸化学 2014 年度大会 明治大学・生田キャンパス 2014.3.27-30

㉔ 水産廃棄物からの機能性素材開発 & ウニの陸上養殖により被災企業をサポート - 三陸地域資源由来の廃棄物を活用した機能性素材・食品の開発 - 戸谷一英, 古関健一, 渡邊崇, 長田光正, 中川裕子, 二階堂満 アグリビジネス創出フェア 2013 東京ビッグサイト 2013.10.23-25

㉕ 産官学連携による東日本大震災の復興支援 - 三陸地域資源を活用した機能性素材・食品の開発 - 戸谷一英, 古関健一, 渡邊崇, 長田光正, 中川裕子, 二階堂満 産学連携学会第 11 回大会<岩手大会> いわて県民情報交流センター 2013.6.20-21

〔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 (Yuko S. Nakagawa)

一関工業高等専門学校・未来創造工学科
化学・バイオ系・准教授

研究者番号：70435577

(4)研究協力者

Gustav Vaaje-Kolstad

Vincent G. H. Eijsink

森 俊明 (Toshiaki Mori)