

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19380097

研究課題名（和文）天然キチン結晶多形の生合成機構を探る

研究課題名（英文）Studies for biosynthesis mechanism of natural chitin polymorphism

研究代表者

木村 聡 (KIMURA SATOSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：00420224

研究成果の概要（和文）：本研究では、生物が結晶形の異なるキチンを作り分ける仕組みの解明へ向け、様々な天然キチン試料の構造解析とキチン合成生物の培養を進めた。*Phaeocystis* の大量培養で得た高晶性  $\alpha$  キチンは、構造解析に有効な極めて高精度な X 線回折像と  $C^{13}$  固体 NMR スペクトルを与えた。ハオリムシ棲管に関する形態と構造解析により、 $\beta$  キチンの水和構造および棲管内のキチンの三次元構築を明らかにすることができ、生合成機構に関する重要な知見を得た。一方、ヤムシ類のキチン合成酵素遺伝子の部分配列の取得に成功した。

研究成果の概要（英文）：In the research, various chitin samples were collected and their structural analysis was achieved to understand a mechanism for biosynthesis of natural chitin polymorphs. Highly crystalline  $\alpha$ -chitin obtained by mass cultivation of *Phaeocystis* enabled highly precise analysis of X-ray diffraction as well as solid-state NMR. The results lead to precise determination of  $\alpha$ -chitin unit cell. However, several minor signals which cannot be explained by the published model, suggesting possibility of larger unit cell. X-ray diffraction and electron microscopy analyses of crystalline  $\beta$ -chitin in tubes *Lamellibrachia* revealed that the microfibrils have a three dimensional orientation in the tube wall. This alignment can be ascribed to possible biosynthetic mechanism of this chitin, i.e. chitin-synthesizing enzymes travelling one-way, consistent with the motion of the worm body in the tube. The crystal transition between the dihydrate and anhydrous forms of  $\beta$ -chitin was also monitored by synchrotron X-ray diffraction under controlled relative humidity, the results revealed the crystal transition between the dihydrate and anhydrous forms was shown to take place reversibly through an intermediate structure, the monohydrate form, showing a large hysteresis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2008 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・林産科学、木質工学

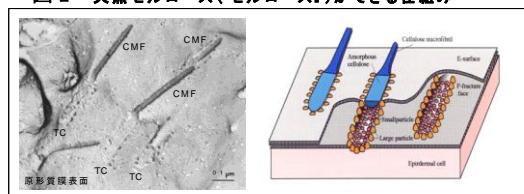
キーワード：天然キチン、 $\alpha$ -キチン、 $\beta$ -キチン、*Phaeocystis*、ハオリムシ

## 1. 研究開始当初の背景

地球上におけるキチンの年間の生合成量は $1 \times 10^9$ トンとも、セルロースに匹敵する $1 \times 10^{11}$ トンとも推定されている。現在、地球規模で利用可能なキチンは毎年、数十万トンと見積もられているが、実際の利用は数千トン以内である。一方、キチンと構造的に類似した天然多糖であるセルロースは、木材、紙、繊維として多方面に大量に使用され続けている。しかし近年、キチンやキトサンにセルロースにはない性質がいくつも発見され、医療、化粧品、食品、農業分野で次々にキチンやキトサンを含む新商品が市場に出回るようになり、それに伴ってキチンの生産量も増加傾向にある。これらキチンの新規利用の背景は抗菌作用や生体適合性など、セルロースには見られない生理活性が発見されているためである。加えて、天然キチン結晶多形の一つである $\beta$ キチンでは、キチン単分子鎖シート間に、各種の低分子物質を取り込んで層間化合物を作る現象が研究されており、キチン特有の結晶構造を基盤とした新規材料開発の期待も高い (Noishiki et al, *Biomacromol.* 2003, 2004など)。このように地球に残された最後のバイオマス資源としてキチンの有効利用に関するポテンシャルは今後ますます大きくなると予想される。そしてキチンの新規材料としての可能性を模索するためには、材料としての基盤となる天然キチンの構造と生合成機構を明らかにしておく必要がある。

天然キチンの結晶構造に関して、X線や電子顕微鏡および固体NMRによる構造解析が行われてきた。現在、天然キチンには $\alpha$ と $\beta$ キチンの2種の結晶多形が報告され、 $\alpha$ キチンはNアセチルグルコサミン鎖の分子鎖がその極性を交互に配列した結晶形態(逆平行鎖)、

図1 天然セルロース(セルロースI)ができる仕組み

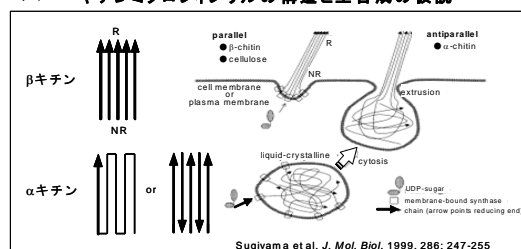


天然セルロースは原形質膜上の合成酵素複合体から生合成される。各酵素によるグルカン鎖の非還元末端へグルコースの付加反応と同時に、伸長したグルカン鎖が結晶化するため、平行鎖構造であるセルロースIが生合成される。

$\beta$ キチンではマイクロフィブリル内でキチン分子鎖の方向が揃った結晶(平行鎖)であることが提案されている。逆平行鎖である $\alpha$ キチンは、生産量と利用面で最多量である甲殻類や昆虫類により合成される。一方、天然セルロースは例外無く平行鎖構造(セルロースI)で生合成される。 $\alpha$ キチンが逆平行鎖のマイクロフィブリルとしてどのような機構で生物が生合成するのか大きな謎である。

天然セルロースの生合成の場合、細胞膜上のセルロース合成酵素の集合体(ターミナルコンプレックス=TCと呼ばれる)がグルカン鎖を同時に合成・結晶化することが明らかにされている (Kimura et al., *Plant Cell*, 11, 2075, 1999; Kimura et al., *J. Bacteriology*, 183, 5668, 2001)。TCからのグルカン鎖の分泌は一方方向にのみ起こるので、形成されたセルロースマイクロフィブリル内の分子鎖の配向の極性が揃っている(平行鎖)ことは考え易い(図1)。しかし、逆平行鎖で結晶化する $\alpha$ キチンマイクロフィブリルの合成の機構に関して、そのメカニズムは全く不明である。

図2 キチンマイクロフィブリルの構造と生合成の仮説



キチンには $\alpha$ 、 $\beta$ の2種の結晶タイプが知られており、最多量に存在するのは逆平行鎖タイプである $\alpha$ キチンである。逆平行鎖のマイクロフィブリルが生合成されるためには、折りたたみ構造もしくはグルカン鎖が交互に逆向きに結晶化する必要がある。両者の生合成の仮説として $\beta$ キチンはセルロースの場合と同様な合成酵素の集合体が、 $\alpha$ キチンの場合は非晶状態で蓄積されたキチン分子が分泌時に結晶化するという“紡糸”のような機構が提案されている。

$\alpha$ キチンの生合成機構として二つの仮説が考えられる。一つは天然セルロースの仕組みと同様にTCが関与するがTCは分子鎖方向の異なるキチン鎖を同時に合成する説、もう一つは細胞内の分泌小胞内で合成されたキチン鎖が細胞外へ分泌される際に熱力学的に安定な逆平行鎖として結晶化する説である。しかしこれまで、キチン合成生物のTCは報告されておらず、細胞内のキチン分泌小胞の存在も確認されていない(図2)。

## 2. 研究の目的

天然キチンの生合成機構の研究が困難な理

由の一つは、有効なモデル生物が確立されていないことである。これまで、天然キチンの結晶構造に主眼においた研究では、入手しやすく結晶性の高いキチンを生産する生物を用いて進められたってきたが、それらの多くはキチン生合成の研究モデルとしては適していなかった。一方、酵母のようにキチン生合成に関与する酵素および遺伝子解析が進んでいるものでは、合成するキチンの結晶性が低いため構造解析試料としては適していなかった。

しかし最近、高結晶性キチンを合成する生物の新たな発見、キチン合成生物の培養法の確立、ゲノム情報の蓄積などの研究基盤が整備されつつあり、結晶構造解析と生合成研究を両立可能なキチン合成生物がいくつか提案されている。

表1 代表的なキチン合成生物と天然キチンの結晶形態

生物種	分類	部位	結晶型	結晶性	遺伝子情報	培養
出芽酵母	菌類	細胞壁	不明	低	全ゲノム	可能
糸状菌	菌類	細胞壁	不明	低	全ゲノム	可能
<i>Phaeocystis</i>	ハプト藻	分泌多糖	$\alpha$	高	不明	可能
<i>Thalassiosira</i>	珪藻	条棘	$\beta$	高	全ゲノム	可能
ヤムシ	毛顎動物	顎毛	$\alpha$	高	部分ESTs	可能
ハオロムシ	環形動物	棲管	$\beta$	高	不明	-
ガザミ	甲殻類	外皮	$\alpha$	中	部分ESTs	種苗
カイコ	昆虫類	外皮	$\alpha$	中	全ゲノム	可能
ヤリイカ	軟体動物	嘴	$\alpha$	低	不明	-
		軟甲	$\beta$	低		

そこで、本研究では以下の課題に関する研究を遂行した。

(1) これまで研究されてきたものを含め、入手可能な天然キチンの網羅的な採集とこれらの構造を最新技術により解析し（結晶型とマイクロフィブリル形態）、天然キチン構造の構造データを整理する。

(2) 構造的に重要なキチンを合成する生物に関して組織化学手法を用いてキチン合成部位の解析を進めると同時に遺伝子情報を収集し、キチン結晶多形の生合成機構の研究基盤を確立する。

### 3. 研究の方法

(1) 天然キチン試料の収集。表1に示したキチン合成生物の採集や培養を行い、結晶形の異なるキチン試料を単離・精製した。

(2) 各種天然キチン試料に関して、回折(X線、電子線、放射光)および固体NMR、FTIRを使用してそれらの結晶構造や分子鎖のコンフォメーションに関する情報を整理した。

(3) ハオロムシ等のキチン性組織を光学・電子顕微鏡を使用して内部構造を観察し、キチンマイクロフィブリルの分布や存在状態を解析した。

(4) ヤムシ類で室内飼育が可能なカエディソヤムシ(学名)を試料にRACE法によるキチ

ン合成遺伝子のクローニングを進めた。

### 4. 研究成果

#### (1) 天然キチン試料の収集

海産性の微細植物プランクトン *Phaeocystis globosa* (NIES 1396、国立環境研究所より分譲)の大量培養システムを構築し、高結晶性の $\alpha$ キチンマイクロフィブリルの収集に成功した。また独立行政法人海洋研究開発機構(JAMSTEC)の協力により、高結晶性 $\beta$ キチンを合成するサツマハオロムシの採集に成功した。既に培養系の確立している珪藻( $\beta$ キチン)やイソヤムシ( $\alpha$ キチン)に関しても室内培養により高結晶性キチン試料を収集した。

#### (2) $\alpha$ キチンの構造解析

①  $\alpha$ キチンの結晶構造は甲殻類の腱を試料として報告されているが、水素結合の位置など議論されている(Minke & Blackwell, *J. Mol. Biol.*, **120**, 167, 1978)。本研究ではズワイガニ(*Chionoecetes* sp.)の腱由来の $\alpha$ キチンに関してシンクロトロン放射光を用い、100Kと300Kの温度条件にて高分解能X線回折像を撮影、構造精密化を行なった。その結果、 $\alpha$ キチン中のNアセチルグルコサミン残基のC6-O6間の水素結合の配座に関する情報を含む構造情報を精密化でき、 $\alpha$ キチンの結晶に関する新たな知見が得ることができた。

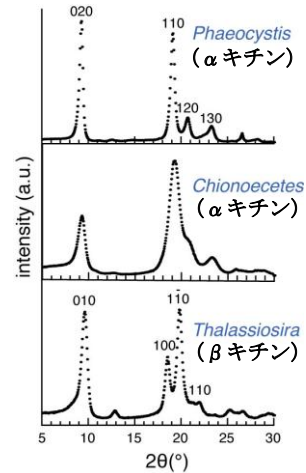


図3 天然キチンのX線ディフラクトメトリー

② *Phaeocystis*が生産する $\alpha$ キチンは結晶性が高く分散性に優れるため、構造解析のための試料として有望である。本研究で大量培養により収集した*Phaeocystis*の $\alpha$ キチン

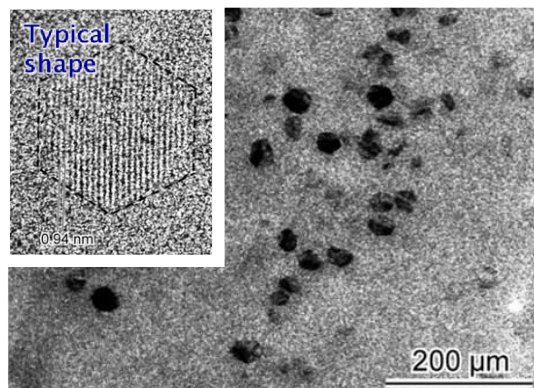


図4 *Phaeocystis*の合成する $\alpha$ キチンの横断面(黒く見える構造)の高分解能電子顕微鏡像(挿入図)

の粉末 X 線回折を行った結果、これまで知られていた天然  $\alpha$  キチンに比べ、極めてシャープな回折スペクトルを示すことがわかった (図 3)。そこで *Phaeocystis* の  $\alpha$  キチンをシンクロトロン高輝度 X 線回折および  $C^{13}$  固体 NMR 法により解析を進めた結果、従来の  $\alpha$  キチンモデル試料 (甲殻類キチン) では分離できなかった新規な X 線回折スポットおよび  $C^{13}$  固体 NMR スペクトルの存在を明らかにできた。特に  $C^{13}$  固体 NMR の結果は、*Phaeocystis* の  $\alpha$  キチンの結晶構造が既報の単位格子には当てはまらない可能性を示唆するものであった。また *Phaeocystis* の  $\alpha$  キチンは高分解能電子顕微鏡による形態観察にも適し、マイクロフィブリルの横断面の格子像撮影に成功した。 $\alpha$  キチン結晶の横断面は変形した六角形であることが本研究により明らかとなった (図 4)。今後 *Phaeocystis* の  $\alpha$  キチンの構造解析を進めることによる  $\alpha$  キチンの結晶構造の完全精密化および培養可能であることからキチン合成遺伝子の解析が期待される。

### (3) $\beta$ キチンの構造解析

① サツマハオリムシは自然界で最も高結晶性な  $\beta$  キチンを合成する生物である。 $\beta$  キチンが含まれる棲管に対してその横断面方向から X 線を入射し回折図を撮影した結果、棲管内で  $\beta$  キチンマイクロフィブリルが棲管の長軸方向に平行に堆積していること、そして全

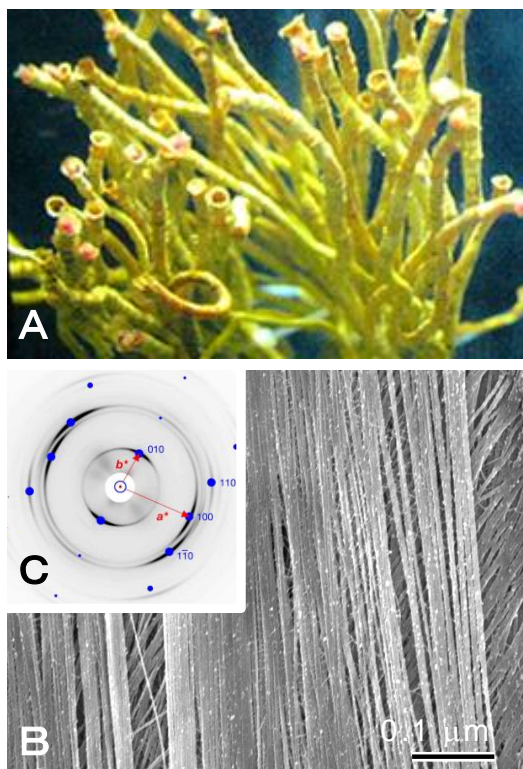


図 5 サツマハオリムシ棲管の  $\beta$  キチン  
棲管 (A) の内部でキチンマイクロフィブリルは長軸に平行に堆積している (B)。棲管内の全ての  $\beta$  キチンの還元末端は管の先端に揃っていることが X 線回折により示された (C)。

てのマイクロフィブリルの極性が揃っていることが回折図の解析によりわかった。すなわち、棲管内でキチンマイクロフィブリルの還元末端は全て棲管先端を向いていた (図 5)。同じ平行鎖である天然セルロースにおいて、このような組織を形成する例は知られていない。マイクロフィブリルの配向が三次元的に制御される機構と同時に材料としての興味が持たれる。

②  $\beta$  キチンはキチン単分子鎖シート間に低分子物質を取り込み層間化合物を形成する。採集後、未乾燥状態を維持しながらハオリムシ棲管の X 線回折を行うことにより  $\beta$  キチンが 2 水和物、すなわち N アセチルグルコサミン残基あたり 2 分子の水を含む形態で生合成されることが証明された。また同試料の配向試料を作製し、水和状態を維持したまま高分解能 X 線回折像を撮影することに成功し、現在、これまで解析困難であった  $\beta$  キチン水和物の精密解析へ向け、構造解析を進めている。

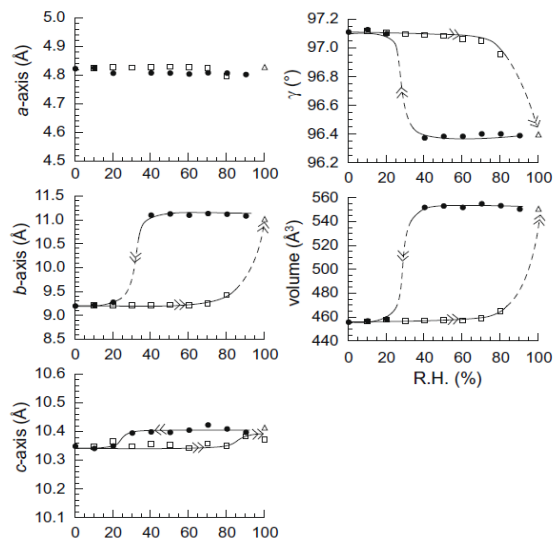


図 6  $\beta$  キチンの単位格子と格子体積の変化  
水和物からの乾燥過程 (●)、無水和物からの水和過程 (□)。完全な二水和物へは水浸漬を必要とする (△)。結晶転移が生じる領域を点線で示した。

③ 水和構造を形成する多糖類は多く知られているが結晶転移の過程不明な点が多い。 $\beta$  キチンも水和物から無水和物へ可逆的に結晶変異する。ハオリムシ  $\beta$  キチンの高結晶性と配向試料の作製が容易である点に着目し、 $\beta$  キチンの水和による結晶転移の解析を行なった。相対湿度を変化させながら連続的に X 線回折像を撮影し解析した結果、 $\beta$  キチン 2 水和物から無水和物への移行は相対湿度 30% から始まりその後の乾燥過程で無水和物へ移行するが、無水和物から水和物へ移行は相対湿度 70% から始まるもの相対湿度 100% においても 1 水和物の構造のまま維持され、水へ浸漬すると 2 水和物へ完全の移行することがわかった。すなわち、 $\beta$  キチンの水和は可逆的であるが、

移行過程（1水和物）を経由して大きなヒステリシスを示しながら転移することを明らかにした（図6）。

（4）高結晶性 $\alpha$ キチンを合成する遺伝子を明らかにするため、カエデイソヤムシと *Phaeocystis* を対象に遺伝子クローニングを進めた。イソヤムシでは、既知のキチン合成遺伝子と高い相同性を持つ遺伝子断片を3種発見した。相同性解析の結果、ヤムシのキチン合成遺伝子は節足動物類や線虫類に高い相同性を有すること、すなわち前口動物に類縁である可能性が示唆された。キチン合成遺伝子の生物多様性、いまだ分類群が議論されているヤムシ類の系統を考える上で興味深い知見が得られた。

#### 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3件）

- ① Sikorski P, Hori R, Wada M. Revisit of  $\alpha$ -chitin crystal structure using high resolution X-ray diffraction data. *Biomacromolecules*, **10**, 1100-1105 (2009).
- ② Kobayashi K, Kimura S, Togawa E, Wada M. Crystal transition between hydrate and anhydrous  $\beta$ -chitin monitored by synchrotron X-ray fiber diffraction. *Carbohydrate Polymers*, **79**: 882-889 (2010)
- ③ Ogawa Y, Kimura S, Wada M, Kuga S. Crystal analysis and high-resolution imaging of microfibrillar  $\alpha$ -chitin from *Phaeocystis*. *Journal of Structural Biology*, (2010), in press, (doi:10.1016/j.jsb.2010.03.010)

〔学会発表〕（計6件）

- ① 木村聡, 和田昌久, 村上淳, 空閑重則, セルロース学会第14回年次大会, イカキチンの結晶多形, 2007年7月19日, 静岡大学学生会館
- ② 木村聡, ハオリムシ $\beta$ キチンの形態と構造, セルロース学会第15回年次大会, 2008年7月11日, 京都大学桂キャンパス
- ③ 小川悠, 木村聡, 和田昌久, 空閑重則, 戸川英二, ハプト藻 *Phaeocystis* が生産するキチンマイクロフィブリルの構造, セルロース学会大16回年次会, 2009年7月2日, 北海道大学学術交流会館
- ④ 木村聡, 小林加代子, 和田昌久, 空閑重則, ハオリムシ棲管の形態と構造 - 生合成機構に関する一考察 -, 第23回キチン・キトサンシンポジウム,

2009年8月20日, 佐賀大学本庄キャンパス

- ⑤ 小林加代子, 木村聡, 和田昌久, 空閑重則, 水の吸脱着による $\beta$ -キチンの結晶転移, 第23回キチン・キトサンシンポジウム, 2009年8月21日, 佐賀大学本庄キャンパス
- ⑥ 原正人, 木村聡, 渡邊宇外, 河野信, 後藤太一郎. ヤムシで見つかったキチン合成遺伝子ホモログ, 第23回キチン・キトサンシンポジウム, 2009年8月21日, 佐賀大学本庄キャンパス

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

木村 聡 (KIMURA SATOSHI)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教  
研究者番号：00420224

##### (2) 研究分担者

斎藤 幸恵 (SAITO YUKIE)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号：30301120  
(H20→H21：連携研究者)

堀内 裕之 (HORIUTI HIROYUKI)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号：00209280  
(H20→H21：連携研究者)

和田 昌久 (WADA MASAHISA)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号：40270897  
(H20→H21：連携研究者)

空閑 重則 (KUGA SHIGENORI)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：60012051  
(H20→H21：連携研究者)

後藤 太一郎 (GOTO TAICHIYOU)  
三重大学・教育学部・教授  
研究者番号：90183813  
(H20→H21：連携研究者)