

## 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12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：21580254

研究課題名（和文） 結晶性キチン高分解能を示す海洋生物キチナーゼの構成ドメインとその構造・機能特性

研究課題名（英文） Structure and function of crystalline chitin hydrolyzing 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

研究成果の概要（和文）：地球上で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ンを機能性食品として有効利用するため、エビ・カニなどの結晶性キチンの甲羅を持つ甲殻類を捕食する海洋生物よりキチナーゼを精製し、その性状および酵素反応特性を明らかにした。また数種海洋生物キチナーゼのcDNAをクローニングし、それらの構造を明らかにし、さらに有用キチナーゼについてはその発現系を構築した。

研究成果の概要（英文）： Crystalline chitin is a major structural structure component of arthropods. We purified several chitinases from marine organisms which take the arthropods as food and investigated the enzymatic properties and reaction. We also obtained several cDNA clones of the chitinases from marine organisms and investigated the structure and function of the chitinases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：代謝・酵素

## 1. 研究開始当初の背景

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り、その有効利用が期待されている。しかしながら現状では主にアルカリ処理して得られるキトサンに調製するか、あるいは酸加水分解して得られるグルコサミン（苦み・渋みを呈する）に調製され利用されているのみである。一方、キチンのキチナーゼによる分解生成物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）は変形性関節炎の治癒・美肌効果や甘味（砂糖の60%）などを示し、機能性食品素材として極めて有用である。また、化学合成されたN-アセチルグルコサミンの食品への利用は認可されないため、酵素を用いた本方法が最も主要な調製方法である。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ず、それがキチンオリゴ糖・単糖の大量生産を不可能にしている。そのため、結晶性キ

チン高分解能を示すキチナーゼのニーズが高まっていた。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまでの研究において、海洋生物には既報の微生物キチナーゼにはみられない強固な $\alpha$ 結晶性キチンを分解するキチナーゼ活性を持つ生物種が存在することを観察してきた。そこで本研究では強固な $\alpha$ 結晶性キチンを分解し、キチンオリゴ糖・単糖の大量生産に役立たせるため、海洋生物よりキチナーゼの検索、精製、性状・機能解析、cDNA クローニング（一次構造解析）および発現系構築を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 数種海洋生物を試料とし、硫酸分画、アフィニティーおよびイオン交換カラムクロマトグラフィーなどを用いてキチナーゼを精製した。またそれらの酵素学的性質、酵素反応特性、部分アミノ酸配列を調べた。

(2) 数種海洋生物を試料とし、Total RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて mRNA より cDNA のテンプレートを作成した。ファミリー18キチナーゼの保存配列より縮重プライマーを設計し、PCRにてDNAフラグメントを増幅させた。この塩基配列を解析し、5' および 3' RACE 法により上流および下流域を増幅させ、さらに全長を増幅させキチナーゼ遺伝子のクローンを得た。得られた塩基配列よりキチナーゼの一次構造、ドメイン構造、推定立体構造を明らかにした。

(3) 海洋生物キチナーゼ遺伝子を大腸菌発現用ベクター(p-coldTF) に連結し、大腸菌内に取り込ませた。37°Cで生育後、IPGE を添加し、15°Cで24時間生育させ、低温下でキチナーゼを発現させた。

## 4. 研究成果

(1) 数種海洋生物キチナーゼの精製・性質および酵素反応特性について：

・イサキ胃より49kDaキチナーゼを精製した。本酵素はキチンの非還元末端より2分子のGlcNAcを良く遊離する酵素と考えられた。N-末端アミノ酸配列はすでに報告したシログチ42kDaキチナーゼのそれと22残基まで一致した。pNp-GlcNAc<sub>n</sub> (n=2,3) に対する最適pHはいずれもpH3.5の酸性域に認められ、胃酸の存在する胃内酸性pHと良く符号した。反応時間10分間では70°Cの比較的高温に最適温度が認められた。

・シログチ胃より56kDaキチナーゼアイソザイムを精製した。本酵素は酸性域で良く作用し、最適温度は70°Cに認められた。本酵素のpNp-(GlcNAc)<sub>n</sub> (n=2-4) に対する分解能はpNp-(GlcNAc)<sub>3</sub> >> pNp-(GlcNAc)<sub>2</sub> > pNp-(GlcNAc)<sub>4</sub> だった。また、本酵素は

(GlcNAc)<sub>4-6</sub> を分解し、family 18キチナーゼと同様に $\beta$ アノマーの増加した(GlcNAc)<sub>2,3</sub> を生成したことより、エンド型のキチン分解酵素と判断した。本酵素は結晶性 $\alpha$ -キチンのカニ殻キチンを結晶性 $\beta$ -キチンのイカ甲キチンより良く加水分解した。

・コウイカ肝臓より62kDaキチナーゼを精製した。本酵素はpH3.5に最適pHを示し、pH4-6で安定で、最適温度は50°Cに認められた。本酵素のpNp-(GlcNAc)<sub>n</sub> (n=2-4) に対する分解能はpNp-(GlcNAc)<sub>2</sub> > pNp-(GlcNAc)<sub>3</sub> > pNp-(GlcNAc)<sub>4</sub> だった。また、本酵素は(GlcNAc)<sub>5</sub>を分解し、family 18キチナーゼと同様に $\beta$ アノマーの増加した(GlcNAc)<sub>2,3</sub> を生成したことより、エンド型のキチン分解酵素と判断した。本酵素は0.5MNaCl存在下で1.5倍に活性が上昇した。不溶性基質に対し、本酵素はコロイダルキチンを良く分解した。結晶性キチンに対しては、エビ殻 $\alpha$ キチンを良く分解し、次いでイカ甲 $\beta$ キチン、カニ殻 $\alpha$ キチンの順であり、カイコ幼虫 $\alpha$ キチンに対する活性は著しく低かった。

(2) 数種海洋生物キチナーゼのcDNAクローニング：カサゴ胃、イサキ胃、アイナメ胃、シログチ胃およびマサバ胃よりそれぞれ2種のキチナーゼ遺伝子クローニングが得られた。それら遺伝子の全長はいずれも1.6~1.7kbpで、約500のアミノ酸残基をコードしていた。演繹アミノ酸配列はいずれも、N-末端側よりシグナルペプチド、ファミリー18活性ドメイン、リンカーおよびキチン結合ドメインを構成していた。また活性ドメインのアミノ酸配列には、他の脊椎動物family 18キチナーゼのactive siteと一致する配列が認められた。各魚種胃のキチナーゼcDNAは $\beta$ キチンおよび低分子基質分解能の高いAcidic Fish Chitinase-1 (AFCase-1)グループ(AFCase-1内アミノ酸配列で約80-90%の相同性)と $\alpha$ キチン分解能の高いAcidic Fish Chitinase-2 (AFCase-2)グループ(AFCase-2内アミノ酸配列で約90%の相同性)の2種のグループに分類される事を明らかにした。また両遺伝子は魚体内においては胃で優位に発現していた。脊椎動物family 18キチナーゼのアミノ酸配列より系統樹解析を実施したところ、両グループは哺乳類胃キチナーゼが形成するAcidic Mammalian Chitinase (AMCase)とは異なるグループであることが判明した。これらの結果より、魚類は脊椎動物内においても独自の構造・機能を示す複数のキチナーゼを胃に有し、餌料キチンを効率良く分解していると考えられた。

(3) 大腸菌による発現：マサバ胃およびシログチ胃キチナーゼアイソザイムの発現を大腸菌発現用ベクター(p-coldTF)を用いて実施し、可溶性酵素の調製および精製を検討した。

## 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7件)

① Mana Ikeda, Kouji Miyauchi, Masahiro Matsumiya (in press) Structure and functions of 42 kDa chitinase from the stomach of silver croaker *Pennahia argentatus*, Proceedings of the 9<sup>th</sup> Asia-Pacific Chitin Chitosan Symposium, 査読無, Nha Trang University (Nha Trang, Vietnam).

② Yujiro Kondo, Mana Ikeda, Kouji Miyauchi, Masahiro Matsumiya (in press) Molecular cloning of a stomach chitinase in the threeline grunt *Parapristipoma trilineatum*, Proceedings of the 9<sup>th</sup> Asia-Pacific Chitin Chitosan Symposium, 査読無, Nha Trang University (Nha Trang, Vietnam)

③ Shuji Karasuda, Mana Ikeda, Kouji Miyauchi, Masahiro Matsumiya (in press) Existence and physiological role of chitinase in the gonad of two species of sea hare, Kuroda's sea hare *Aplysia kurodai* and walking sea hare *Aplysia Juliana*, Proceedings of the 9<sup>th</sup> Asia-Pacific Chitin Chitosan Symposium, 査読無, Nha Trang University (Nha Trang, Vietnam).

④ Akiyoshi Suyama, Mana Ikeda, Kouji Miyauchi, Masahiro Matsumiya (in press) Some enzymatic properties of a chitinase from the liver of golden cuttlefish *Sepia esculenta*, Proceedings of the 9<sup>th</sup> Asia-Pacific Chitin Chitosan Symposium, 査読無, Nha Trang University (Nha Trang, Vietnam).

⑤ Mana Ikeda, Kouji Miyauchi, and Masahiro Matsumiya (in press): Purification and characterization of a 56 kDa chitinase isozyme (PaChiB) from the stomach of silver croaker *Pennahia argentatus*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有.

⑥ Masahiro Matsumiya, Mana Ikeda, Keiko Hutami, Sonomi Tanaka, Miyuki Arimoto, Shinya Ito, and Kouji Miyauchi (2011) Properties and cDNA cloning of the stomach chitinase from common mackerel *Scomber*

*japonicas*, In: *Advances in Chitin Science, Volume XIII*. Edited by V. Varlamov, S. Brastskaya, I. Yakovleva, and S. Senel, 査読無 pp338-343, Sain-Petersburg, Russia

⑦ Mana Ikeda, Kouji Miyauchi, Atsushi Mochizuki, and Masahiro Matsumiya (2009): Purification and Characterization of Chitinase from the Stomach of Silver Croaker *Pennahia argentatus*, *Protein Expression and Purification*, 査読有 65(2), 214-222.

[学会発表] (計20件)

① 柿崎博美・池田愛・宮内浩二・松宮政弘：マサバ胃キチナーゼアインザイムのcDNAクローニング、日本水産学会秋季大会、2011年9月29日(木)、長崎大学

② 須山晃佳・池田愛・宮内浩二・松宮政弘：コウイカ肝臓キチナーゼの精製と性質、日本水産学会秋季大会、2011年9月29日(木)、長崎大学

③ Akiyoshi Suyama, Mana Ikeda, Kouji Miyauchi, Masahiro Matsumiya: Some enzymatic properties of a chitinase from the liver of golden cuttlefish *Sepia esculenta*, 9<sup>th</sup> Asia-Pacific Chitin Chitosan Symposium, Aug. 3-6, 2011, Nha Trang University (Nha Trang, Vietnam).

④ Shuji Karasuda, Mana Ikeda, Kouji Miyauchi, Masahiro Matsumiya: Existence and physiological role of chitinase in the gonad of two species of sea hare, Kuroda's sea hare *Aplysia kurodai* and walking sea hare *Aplysia Juliana*, 9<sup>th</sup> Asia-Pacific Chitin Chitosan Symposium, Aug. 3-6, 2011, Nha Trang University (Nha Trang, Vietnam).

⑤ Yujiro Kondo, Mana Ikeda, Kouji Miyauchi, Masahiro Matsumiya: Molecular cloning of a stomach chitinase in the threeline grunt *Parapristipoma trilineatum*, 9<sup>th</sup> Asia-Pacific Chitin Chitosan Symposium, 9<sup>th</sup> Asia-Pacific Chitin Chitosan Symposium, Aug. 3-6, 2011, Nha Trang University (Nha Trang, Vietnam).

⑥ Mana Ikeda, Kouji Miyauchi, Masahiro Matsumiya: Structure and functions of 42 kDa chitinase from the stomach of silver croaker *Pennahia argentatus*, 9<sup>th</sup> Asia-Pacific Chitin Chitosan Symposium, Aug. 3-6, 2011, Nha Trang University (Nha

Trang, Vietnam).

⑦ 近藤雄次郎・宮内浩二・松宮政弘：イサキ胃2種のキチナーゼのcDNAクローニング、日本キチン・キトサン学会、第25回キチン・キトサンシンポジウム、2011年8月31日(水)、奈良県新公会堂

⑧ 池田 愛・宮内浩二・松宮政弘：シログチ胃キチナーゼアイソザイムの構造と酵素反応特性、日本キチン・キトサン学会、第25回キチン・キトサンシンポジウム、2011年8月30日(火)、奈良県新公会堂

⑨ 松宮政弘・南波麻里江・金田 葵・木村優作・鈴木 豪・浅見広太・池田 愛・宮内浩二：アイナメ胃3種キチナーゼの構造と機能、日本キチン・キトサン学会、第25回キチン・キトサンシンポジウム、2011年8月31日(水)、奈良県新公会堂

⑩ Masahiro Matsumiya, Mana Ikeda, Keiko Hutami, Sonomi Tanaka, Miyuki Arimoto, Shinya Ito, and Kouji Miyauchi. Properties and cDNA cloning of the stomach chitinase from common mackerel *Scomber japonicas*, 10<sup>th</sup> International Conference of the European Chitin Society, Saint-Petersburg, Russia, May 23, 2011.

⑪ 池田愛・宮内浩二・松宮政弘：シログチ胃キチナーゼアイソザイムの精製と性質、日本水産学会春季大会、2011年3月28日(月)、東京海洋大学

⑫ 近藤雄次郎・宮内浩二・松宮政弘：イサキ胃キチナーゼのcDNAクローニング、日本水産学会春季大会、2011年3月28日(月)、東京海洋大学

⑬ 宮内浩二・松宮政弘：ヤマトシジミリゾチームの一次構造解析、日本水産学会秋季大会、2010年9月24日(金)、京都大学農学部

⑭ 松宮政弘・鈴木 豪・浅見広太・池田愛・宮内浩二：アイナメ胃キチナーゼアイソザイムの一次構造と酵素反応特性、日本水産学会秋季大会、2010年9月23日(木)、京都大学農学部

⑮ 池田 愛・宮内浩二・松宮政弘：シログチ胃キチナーゼのcDNAクローニング、日本水産学会秋季大会、2010年9月23日(木)、京都大学農学部

⑯ 池田 愛・宮内浩二・望月 篤・松宮政弘：シログチ胃キチナーゼの精製と性質、日

本キチン・キトサン学会、第24回キチン・キトサンシンポジウム、2010年7月13日(火)～14日(水)、東京大学農学部

⑰ Masahiro Matsumiya. Properties of endo-type and exo-type chitinolytic enzymes from the liver of Japanese common squid *Todarodes pacificus* and utilization of those for enzymatic production of *N*-acetyl-D-glucosamine. International Symposium on Seafood Processing Technology and Safety Control System, Ocean University of China, Qingdao, China, Oct. 31st to Nov. 2nd, 2009.

⑱ Masahiro Matsumiya, Mana Ikeda, Ito Shinya, Kouji Miyauchi. Some properties of the stomach chitinases from two species of fish, silver croaker *Pennahia argentatus* and common mackerel *Scomber japonicas*. 11<sup>th</sup> International Conference on Chitin and Chitosan and 8<sup>th</sup> Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium, National Taiwan University of Science and Technology (NTUST), Taipei, Sept. 6-9, 2009.

⑲ 松宮政弘、伊藤伸也、池田 愛、宮内浩二：マサバ胃およびシログチ胃キチナーゼの酵素反応特性、日本水産学会秋季大会、2009年10月1日(木)、岩手県民情報交流センター・アリーナ

⑳ 松宮政弘、上田光宏、宮内浩二、田中苑美、有本美雪：マサバ胃キチナーゼのcDNAクローニング、日本キチン・キトサン学会、第23回キチン・キトサンシンポジウム、2009年8月20日(木)、佐賀県佐賀市、佐賀大学本庄キャンパス

[その他]

遺伝子番号取得

① DDBJ number: AB686658

② DDBJ number: AB686659

③ DDBJ number: AB626093

④ DDBJ number: AB626094

⑤ DDBJ number: AB605774

⑥ DDBJ number: AB605775

⑦ DDBJ number: AB689022

⑧ DDBJ number: AB642678

⑨ DDBJ number: AB642677

⑩ DDBJ number: AB686657

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

(2)研究分担者  
なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
なし ( )

研究者番号：