

講演番号：3J33a10

講演日時：3月19日 11:45～ J校舎 33会場

新規な一次構造をもつキチナーゼの同定

Identification of a structurally novel chitinase

堀内 あゆみ¹、ASLAM Mehwish¹、○金井 保^{1,2}、跡見 晴幸^{1,2} (1京大工、²CREST, JST)

Ayumi HORIUCHI¹, Mehwish ASLAM¹, ○Tamotsu KANAI^{1,2}, Haruyuki ATOMI^{1,2} (1Kyoto Univ.,
²CREST, JST)

超好熱菌 *Thermococcus chitonophagus* はキチンを唯一の有機物源とする培地により単離されたアーキアである¹。本菌は複数種のキチナーゼをもつことが予想されており^{2,3}、さらに GH18 型キチナーゼの一部をコードする遺伝子断片が単離されている⁴。しかしながら本菌のキチン分解・資化システムの全貌は未解明であった。我々は本菌のキチン分解・資化に関わる遺伝子群を網羅的に同定することを目的として、本菌のドラフトゲノム解析を行った。次世代シーケンサー HiSeq 2000 (イルミナ) により得られたゲノムデータ (総コンディグ数 20、総コンティグ塩基数 1,964,779 bp、予想 ORF 数 2,168) 内には、GH18 型キチナーゼの遺伝子が 2 つ存在し (*Tc-ChiA*, *Tc-ChiC*)、さらに N 末端の分泌シグナルに続き、2 つの chitin-binding domain (ChBD) と機能未知ドメインをもつ遺伝子が存在した (*Tc-ChiD*)。 *Tc-ChiD* は ChBD をもつ分泌タンパク質であることから、細胞外でキチン分解に関与することが予想された。しかし *Tc-ChiD* の機能未知ドメインは、これまでにキチナーゼ活性が確認されているいずれの糖質加水分解酵素ファミリー (GH18/GH19/GH23/GH48) とも相同性を示さず、唯一、中温偏性嫌気性細菌 *Clostridium botulinum* (ボツヌリス菌) に広く分布する機能未知タンパク質との相同性を示した。我々は *Tc-ChiD* が構造的に新規なキチナーゼである可能性を考え、その特性解析を行った。大腸菌を用いて調製し、精製した組換え *Tc-ChiD* タンパク質を用いて、GlcNAc から (GlcNAc)₆ までの鎖長のキチンオリゴ糖に対する加水分解活性を調べた (反応温度 85°C)。その結果、*Tc-ChiD* は (GlcNAc)₄ 以上の鎖長のキチンオリゴ糖に対して加水分解活性を示し、(GlcNAc)₂ と (GlcNAc)₃ を生成することが判明した。また還元末端側が *p*-ニトロフェニル基で修飾されたキチンオリゴ糖を用いた活性測定により、本酵素はキチン鎖の還元末端側より 2 つめ (もしくは 3 つめ) のグリコシド結合を切断することが判明した。超好熱菌ではキチン鎖の非還元末端側を切断するキチナーゼとして、*Thermococcus kodakarensis* の *ChiA* などが知られているが⁵、*Tc-ChiD* のようにキチン鎖の還元末端側から切断する酵素は初めてである。今後、*Tc-ChiD* と既存の耐熱性キチナーゼを組み合わせることで、高いキチン分解活性をもつシステムの開発や菌体の育種に繋がることを期待される⁶。

[References]

1. R. Huber *et al.*, *Arch. Microbiol.*, 164: 255-264 (1995).
2. E. Andronopoulou and C. E. Vorgias, *Extremophiles*, 7: 43-53 (2003).
3. E. Andronopoulou and C. E. Vorgias, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65, 694-702 (2004).
4. E. Andronopoulou and C. E. Vorgias, *Protein Express. Purif.*, 35, 264-271 (2004).
5. T. Tanaka *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 5338-5344 (1999).
6. A. Horiuchi *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 82: 3554-3562 (2016).

chitinase, hyperthermophile, archaea

発表責任者：金井保 (kanai@sbchem.kyoto-u.ac.jp)