

「平成18年度工学部予算重点配分研究テーマに係る研究報告書」

(1) 研究テーマ

Paenibacillus fukuinensis 由来キトサナーゼの酵母細胞への表層提示とコンビナトリアル変異による機能改変による分子レベルでの機能解明

(2) 研究代表者及び分担者（職・氏名）

工学研究科生物応用化学専攻・助教授・末 信一郎

福井県立大学生物資源学部・助教授・木元 久（研究協力者）

(3) 研究成果の概要

キトサンとは、カニやエビの殻から精製されたグルコサミンの連なったもので、キトサンを加水分解して得られるキトオリゴ糖にはビフィズス菌や乳酸菌などの腸内細菌を増やすなど人体へ好影響をもたらすことが知られている。また、抗がん効果や抗菌作用も認められており様々な分野で有用性を有する。キトオリゴ糖の中でも5～6のグルコサミン単位で構成されるキトオリゴ糖にはより高いこれらの効果があると言われていたが、多くのキトサナーゼはキトサンを2～3糖単位に分解するため、5～6糖を生成することは困難である。共同研究者である福井県立大 木元准教授らにより福井県の土壌から高いキトサナーゼ活性を有する細菌である *Paenibacillus fukuinensis* が得られており、本菌株が生産するキトサナーゼについては、176番アスパラギン酸が基質認識部位と推定されている。本研究では、この部位に特異的に変異を導入し他の19種類全てのアミノ酸に置換することで本酵素の基質認識性を向上させ、有用な5～6糖のキトオリゴ糖を優先的に生産する高機能体を取得することを目指した。

プラスミドベクターは酵母細胞表層提示用プラスミドである pCAS にキトサナーゼとフラッグタグを挿入した pCAS-CHI-FLAG を作成して、キトサナーゼの基質認識部位に部位特異的に変異を導入し、変異を導入したキトサナーゼを表層に発現した酵母を獲得した。フォワードプライマーに変異配列を設計し、QuikChange method によって変異の導入されたプラスミドライブラリーを作成した。変異導入した得られた19種類のプラスミドを用いて酵母の形質転換を行い19種類の変異体を発現した酵母を得ることができた。

グリコールキトサンをキトサナーゼ表層提示した酵母で24時間加水分解反応を行い、その反応液をDNS法を用いて遊離のグルコサミンに相当する還元糖量を求めキトサナーゼ活性を評価した。それぞれのアミノ酸置換体はコントロールのMT8-1株と同じく還元糖の生成はほとんど認められなかったが、システイン置換体（図1のC）については

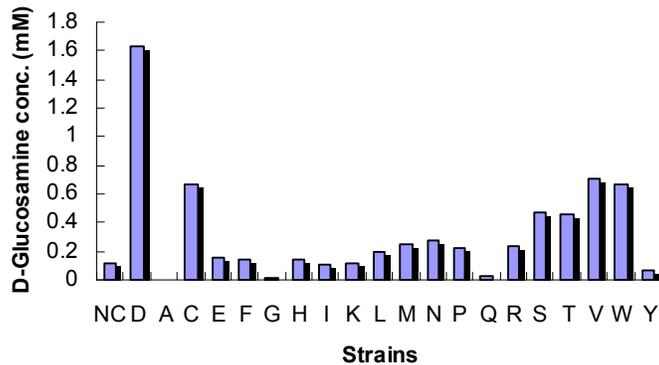


図1 各変異体のキトサナーゼ活性
 NC：対照、D：親株、その他のアルファベットは各変異体を表す

親株に対して約 42%の還元糖が生成していた。それぞれの変異体の生産した還元糖の定量を行った結果を図1に示す。次に、システイン置換体について HPLC によって分解物の確認を行った。ほとんど活性の見られなかったアラニン置換体では、親株型と同じく 2

糖、3 糖の生産しか見られなかったのに比べ、システイン置換体では、2 糖、3 糖に加え 4 糖の生産が確認できた。

今後は、さらに基質認識部位の周辺のアミノ酸残基を置換することで、本酵素によるオリゴ糖生産能を向上させていく予定である。

(4) 配分額及び経費の支出額内訳

設備費	円
消耗品	円
	円
	円
その他	円
	円
計	円

(5) その他特記事項

○学会発表

五十川團哉, 福田剛士, 村井(加藤)倫子, 木元 久, 草桶 秀夫, 植田 充美, 末 信一郎 *Paenibacillus fukuinensis* 由来キトサナーゼ変異体の網羅的ライブラリーの構築とその応用 日本生物工学会平成 19 年度大会 2007.9 発表予定

○論文等

T. Fukuda, D. Isogawa, M. Takagi, M. Kato-Murai, H. Kimoto, H. Kusaoke, M. Ueda, S. Suye, Yeast Cell Surface Expression of Chitosanase from *Paenibacillus fukuinensis*.

Biosci. Biochem. Biotechnol., submitted