

新規の好熱性キチン分解細菌 *Paenibacillus thermoaerophilus* TC22-2b 株由来キチナーゼの性質と構造に関する研究

Studies on properties and structure of a chitinase from a novel thermophilic
chitin-degrading bacterium, *Paenibacillus thermoaerophilus* strain TC22-2b

11D5701 上田 純子 指導教員 黒沢 則夫

SYNOPSIS

Chitin, a major structural component of exoskeletons of arthropods and fungal cell walls, etc., is an abundant polysaccharide in nature. Chitinases, enzymes hydrolyzing chitin, are found in a variety of organisms and have potential for industrial applications. *Paenibacillus thermoaerophilus* strain TC22-2b, a novel thermophilic chitin-degrading bacterium, was isolated from compost. A novel chitinase (*PthChiA*) secreted from strain TC22-2b was purified by ammonium sulfate precipitation, colloidal chitin adsorption and ion exchange chromatography. Apparent molecular mass of *PthChiA* was approximately 48 kDa. The optimum temperature and pH of chitinase activity with colloidal chitin as a substrate were 60°C and pH 4, respectively. *PthChiA* retained $\geq 68\%$ of its initial activity after incubation at 30-50°C or pH 4-10. Using *p*-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside, the K_m and k_{cat} values were 1.4 mM and 9.6 s^{-1} , respectively. Hydrolysis products suggested that *PthChiA* degraded substrates in an endo manner. The genes for *PthChiA* was amplified by polymerase chain reaction and sequenced. The 1548 bp of DNA encoding 515 amino acids was obtained. The deduced amino acids contained putative signal peptide, followed by N-terminal amino acid sequences of purified *PthChiA*, glycoside hydrolases family 18 domain, fibronectin type III-like domain and carbohydrate binding module. This study showed the presence of thermophilic *Paenibacillus* species degrading chitin using a novel chitinase.

Key words: chitinase, GH 18, thermophilic, novel species, *Paenibacillus thermoaerophilus*

1. 序論

キチンは *N*-アセチル-*D*-グルコサミン (GlcNAc) が β -(1 \rightarrow 4)-グリコシド結合で直線状に連なった不溶性の多糖であり、自然界で多くの生物によって大量に生産される高分子化合物の一つである[1]。キチンは菌類の細胞壁や、線形動物の卵殻、節足動物の外骨格などに含まれ、海洋や土壌など環境中に広く分布しており、年間 100 億トン以上生産されると推定されている[1]。しかしながら、これらの環境においてキチンの顕著な蓄積が見られないことから、大量に生産されながら分解されていると考えられている[1]。一方で、キチンは様々な産業利用の可能性を持つ生物資源でもある[2]。

キチナーゼはキチンの β -(1 \rightarrow 4)-グリコシド結合を加水分解する酵素の総称である。キチナーゼの基質分解様式には大きく分けて、ランダムな位置で結合を切断し様々な *N*-アセチルキトオリゴ糖を放出するエンド型と、基質末端から分解していくエキソ型がある[2]。また、大部分のキチナーゼは、アミノ酸配列の相同性に基づいて、糖質加水分解酵素 (Glycoside hydrolases; GH) ファミリー18 と 19 に分類されている [3]。GH18 キチナーゼは細菌、古細菌、真菌、動物、植物などで見つかった[4]。一方で GH19 キチナーゼは主に植物から見つかった[4]、他には一部の

細菌などが有していることが知られている[2]。加えて、近年 GH ファミリー23 や 48 に属するキチナーゼも報告された[5, 6]。多くのキチナーゼは活性ドメインに糖質結合モジュール (CBM) のような機能ドメインが連結した構造を持つことが知られている[7]。

キチナーゼは多様な生物から見つかったが、特に微生物由来のキチナーゼは、環境中のキチン分解に重要な役割を果たしていると考えられている[8]。また、キチナーゼはキチンオリゴ糖生産などのへ応用が期待されており[2]、キチン分解微生物は産業用キチナーゼの供給源として注目され[9]、これまでに *Bacillus* 属、*Paenibacillus* 属、*Streptomyces* 属、*Vibrio* 属など様々な系統のキチン分解微生物が分離、解析されてきた[10, 11]が、環境中には未だに分離されていない微生物が数多く存在していると考えられている。また、記載されている基準株のキチナーゼについて調べられた例は少ない。菌株を記載するにあたっては菌株の性質を多方面から調べ、分類学的位置を決定し、さらに微生物保存機関に寄託して入手可能となるようにする。記載は微生物の多様性に関する知見を蓄積する上で基礎となる重要なことであると考えられる。本研究では、キチン分解微生物やキチナーゼの多様性に関する知見を広げること、産業用キチナーゼの新たな供給源を取得する

ことを目指し、新たなキチン分解微生物を分離し、記載すること、そして分離株が有するキチナーゼの性質を明らかにすること、さらに分離株が有するキチナーゼ遺伝子を取得し、キチナーゼの構造を推定することを目的とした。ここでは、特に高温で良好に生育する好熱性微生物に注目した。好熱性微生物は常温性微生物に比べて高い安定性を有する酵素を生産することが知られており、産業用キチナーゼの供給源として有用なのではないかと思われる。

2. 材料および方法

2-1. 新規の好熱性キチン分解細菌 TC22-2b 株の分離および多相分類学的解析

剪定枝堆肥 (55°C) から TC22-2b 株を分離した。本株について、コロイダルキチンおよび酵母エキスを含む modified Brock's basal salts (MBS) 寒天培地上で培養し、クリアゾーン形成を観察することによりキチン分解活性の有無を確認した。

TC22-2b 株からゲノム DNA を抽出し、これを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により 16S rRNA 遺伝子を増幅した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、BLAST 検索と細菌基準株との相同性の算出を行った。そして、近隣結合法、最節約法および最尤法により系統樹を作成した。本菌株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列を国際塩基配列データベース (GenBank/EMBL/DBJ) に登録した (アクセション番号 AB738878)。TC22-2b 株の表現性状として、形態、生理・生化学的性状、化学分類学的性状を解析した。また、分子系統解析の結果から推定された TC22-2b 株に近縁な細菌基準株である *P. elgii* NBRC 100335^T、*P. validus* NBRC 15382^T、*P. hodogayensis* JCM 12520^T、*P. ginsengarvi* DSM 18677^T も同時に解析し、本菌株との性状の比較を行った。なお、TC22-2b 株を微生物保存機関である German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) および Japan Collection of Microorganisms (JCM) に寄託保存した (寄託番号 DSM 26310 および JCM 18657)。

2-2. *Paenibacillus thermoaerophilus* TC22-2b 株由来キチナーゼ (*PthChiA*) の精製と解析

TC22-2b 株を MBS-YC 培地 [MBS (pH 7.8) に 0.2% 酵母エキスおよび 0.3% コロイダルキチンを加えた培地] で 50°C にて 5 日間培養し、培養上清中のキチナーゼを硫酸沈殿、コロイダルキチンへの吸着、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。キチナーゼ活性はコロイダルキチンを基質とし、Schales 変法 [12] により還元糖の生成量を測定することにより定量した。SDS-PAGE により精製キチナーゼ (*PthChiA*) の分子量を推定した。エドマン分解法により N 末端アミノ酸配列を解析した。また、キチナーゼ活性に対する温度および pH の影響を調べるために、30-80°C および pH 3-10 で活性測定を行った。また、同条件で *PthChiA* を 2 時間インキュベートした後に残存活性を測定することで熱安定性および pH 安定性を調べた。反応

速度論的解析では、*p*-ニトロフェニル *N,N'*-ジアセチル-β-D-キトビオシド [pNP-(GlcNAc)₂] を基質として用いた。また、*PthChiA* の分解様式を調べるため、*N*-アセチルキトオリゴ糖の 2 量体 (G2) ~6 量体 (G6) およびコロイダルキチンを基質として分解実験を行い、薄層クロマトグラフィー (TLC) により加水分解産物を調べた。

2-3. *PthChiA* 遺伝子の増幅と分子構造の推定

PthChiA 遺伝子断片を増幅するため、*PthChiA* の N 末端アミノ酸配列あるいは GH18 キチナーゼのアミノ酸配列保存領域に基づいて縮重プライマーを設計した。これらのプライマーを用いてゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、電気泳動後に約 350 bp のバンドを切り出し、塩基配列解析を行った。続いて、*PthChiA* 遺伝子の全長および隣接する遺伝子を取得するために、*Bsp*T107 I あるいは *BSSH* II により分解したゲノム DNA を用いたインバース PCR を行った。塩基配列を決定した後、Genetyx を用いてアミノ酸配列を推定した。推定アミノ酸配列について Signal P を用いてシグナルペプチドの有無を、Pfam によりドメイン構造を推定した。そして、BLASTP を用いてデータベース上のアミノ酸配列と比較し相同性を算出した。

3. 結果

3-1. 多相分類学的解析による TC22-2b 株の同定と記載

TC22-2b 株はコロイダルキチンを含む個体培地上でクリアゾーンを形成したことからキチン分解活性を有することが分かった。続いて本菌株について、DNA 解析および表現性状の解析を合わせた多相分類学的解析を行うことにより分類学的位置を決定した。まず、TC22-2b 株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列のほぼ全長 (1474 bp) を取得し、既知の細菌基準株との相同性検索を行った結果、TC22-2b 株は *Paenibacillus elgii* と最も高い相同性 (93.4%) を示すことが分かった。原核生物において、16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性が 98.7% 未満の場合は別種である可能性が高いことが報告されている [13]。また、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく分子系統解析の結果、TC22-2b 株は *Paenibacillus* 属のクラスター内に位置した (図 1)。なお、最節約法および最尤法により作成した系統樹においても同様の樹形となり、本菌株が *Paenibacillus* 属に属することが確認された。なお、本菌株のゲノム DNA の G+C 含量は 59.1 mol% であった。

TC22-2b 株は芽胞形成能および運動性を有するグラム陽性桿菌であった。また、偏性好気性であり、生育温度範囲および生育 pH 範囲は 25-58°C (至適生育温度 50-55°C)、pH 6-9 (至適生育 pH 7-8) であった。また、NaCl 濃度が 4% 以上の培地では増殖が見られなかった。主要キノンおよび細胞壁ジアミノ酸は、それぞれ MK-7、meso-ジアミノピメリン酸であった。また、主要なリン脂質はジホスファチジルグリセロール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミンであった。TC22-2b 株と近縁

種との間で特に違いが見られた性状を表 1 に示した。特に、TC22-2b 株が 55°C で増殖するのに対し、いずれの近縁種も同温度で増殖しなかった。また、TC22-2b 株と近縁種の主要脂肪酸は類似していたが、それらの存在比は異なっていた。したがって、TC22-2b 株は分子系統解析だけでなく表現性状の比較からも明らかに近縁種とは別種であることが示された。以上の結果から本菌株は新種の *Paenibacillus* 属細菌であることが示され、*Paenibacillus thermoaerophilus* と命名、記載された[14]。

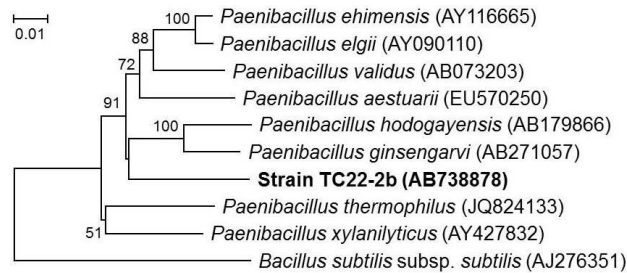


図 1. TC22-2b 株および近縁種の 16S rDNA 遺伝子塩基配列に基づき近隣結合法により作成した系統樹

枝の分岐付近に示した数字はブートストラップ確率を示す

表 1. TC22-2b 株と *Paenibacillus* 属近縁種基準株の性状比較
菌株: 1, TC22-2b; 2, *P. elgii* NBRC 100335^T; 3, *P. validus* NBRC 15382^T; 4, *P. hodogayensis* JCM 12520^T; 5, *P. ginsengarvi* DSM 18677^T. +, 陽性; -, 陰性; w, 弱陽性; NG, 増殖なし.

性質	1	2	3	4	5
55°Cでの増殖	+	-	-	-	-
カゼイン分解	-	+	-	-	-
デンプン分解	+	+	+	-	-
Tween 80 分解	NG	+	w	-	-
主要脂肪酸(% , w/w)					
n-C _{16:0}	25.5	26.4	19.1	16.2	11.4
iso-C _{16:0}	23.6	5.3	9.8	16.2	17.3
anteiso-C _{15:0}	21.5	42.3	37.1	38.4	39.6

3-2. *PthChiA* の精製および性質

P. thermoaerophilus TC22-2b 株の培養上清から精製したキチナーゼ (*PthChiA*) の分子量は、SDS-PAGE の結果から約 48 kDa と推定された。また *PthChiA* の N 末端アミノ酸配列は AVSTGKK であった。コロイダルキチンを基質とした時、*PthChiA* は 60°C で最大キチナーゼ活性を示し、50-70°C の範囲で最大活性の 69% 以上の活性が見られた。また、pH に関しては、pH 4 で最大活性が見られ、pH 4-7 の間で最大活性の 50% 以上の活性を示した。*PthChiA* は 30-50°C で 2 時間インキュベーション後も 68% 以上の活性を維持した。また、pH 4-10 で 2 時間インキュベーション後では 80% 以上の活性が維持された。pNP-(GlcNAc)₂ を基質として用いたところ、*PthChiA* の K_m 、 k_{cat} 、 k_{cat}/K_m は各々 1.4 mM、9.6 s⁻¹、6.8 mM⁻¹ s⁻¹ であった。加水分解産物の解析においては、G3、G4、G5、G6、コロイダルキチン (C) を基質

とした場合には分解産物が見られたが、G2 の場合は分解前の基質のみが検出された (図 2)。

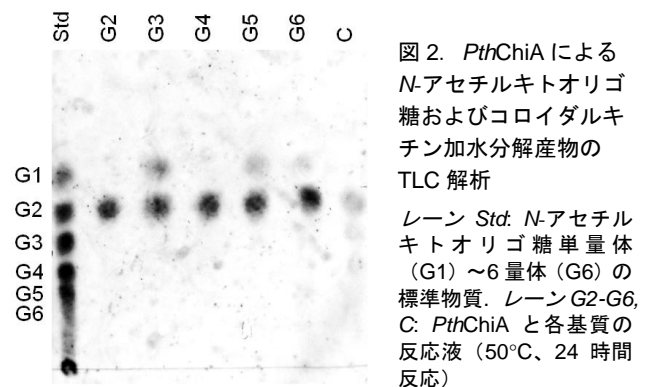


図 2. *PthChiA* による N-アセチルキトオリゴ糖およびコロイダルキチン加水分解産物の TLC 解析

レーン Std: N-アセチルキトオリゴ糖単量体 (G1) ~6 量体 (G6) の標準物質。レーン G2-G6, C: *PthChiA* と各基質の反応液 (50°C、24 時間反応)

3-3. *PthChiA* の推定分子構造

縮重プライマーを用いた PCR およびインバース PCR により *PthChiA* のオープンリーディングフレーム (ORF) とと思われる 1548 bp を得た。この塩基配列から 515 残基の推定アミノ酸配列が得られた。BLASTP によりデータベース上のアミノ酸配列との相同性検索をした結果、このアミノ酸配列と最も高い相同性を示したのは *Paenibacillus* sp. J14 株由来キチナーゼ (WP_028537743, 68.0%) であった。

Signal P および Pfam による解析の結果、*PthChiA* は N 末端側からシグナルペプチド、GH18 ドメイン、フィブロネクチンタイプ III 様ドメイン (Fn III)、糖質結合モジュール (CBM) からなるマルチドメイン構造を持つと推定された (図 3)。N 末端側の 38 残基のアミノ酸はシグナルペプチドであり、細胞外に分泌後に切断され、シグナルペプチド切断後の *PthChiA* の N 末端アミノ酸配列は AVSTGKK となると推測された。また、シグナルペプチド切断後の *PthChiA* は推定アミノ酸配列から分子量は約 50 kDa と算出された。そして、BLAST 検索の結果、*PthChiA* の各ドメインと最も高い相同性を示したのは GH 18 ドメインでは *Stigmatella aurantiaca* 由来キチナーゼ (WP_013376730, 77.8%)、FnIII では *Cohnella laeviribosi* 由来キチナーゼ (WP_033396084, 77.1%)、CBM では *Paenibacillus curdlanolyticus* 由来糖質結合タンパク質 (WP_006036861, 76.7%) であった。

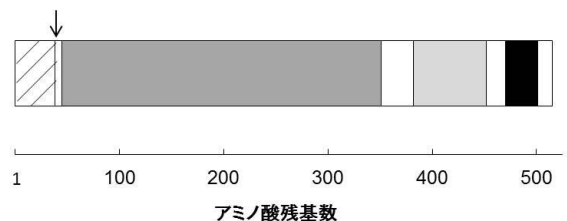


図 3. *PthChiA* のドメイン構造の模式図

斜線: シグナルペプチド、濃灰色: GH 18 ドメイン、淡灰色: FnIII、黒: CBM、矢印: 切断位置

4. 考察

Paenibacillus thermoaerophilus TC22-2b 株は細胞形態や主要キノン、細胞壁ジアミノ酸などは *Paenibacillus* 属細菌に一般的にみられるものであった [15] が、至適生育温度が 50-55°C と *Paenibacillus* 属細菌の中では高温だった。*Paenibacillus* 属細菌はこれまでに 150 種以上が記載されており Firmicutes 門の中でも特に種多様性の高い属の一つとなっているが、そのほとんどが 28-40°C で良好に生育する中温菌であり [15]、45°C 以上の高温域で良好に生育する好熱菌として記載されているのは本菌株と *P. thermophilus* (至適生育温度 42-45°C) [16] のみである。なお、*P. thermophilus* はキチン分解に関する報告はされておらず、本菌株はキチン分解活性を有する好熱性 *Paenibacillus* 属細菌の初めての報告となった。

P. thermoaerophilus TC22-2b 株由来キチナーゼ (*PthChiA*) の基質分解様式を調べるために、*PthChiA* による基質分解産物を TLC により調べた。キチナーゼの基質分解様式にはエンド型とエキソ型が知られているが、*PthChiA* の場合は、コロイダルキチンから数種類の分解産物 (G2、G3、G4) が検出されたことからエンド型であると思われる。また、二量体からは分解産物が検出されなかったため、二量体は本キチナーゼの基質にならないと思われる。

PthChiA は分子量約 48 kDa で好熱好酸性であった。これらの性質は必ずしもこれまでに知られている *Paenibacillus* 属細菌由来キチナーゼ [11, 17, 18, 19] と類似してはおらず、系統的に近縁ではない多様な微生物由来キチナーゼと類似している場合もあった。好熱好酸性キチナーゼは本菌株を含め、*Laceyella* 属細菌 [20]、*Streptomyces* 属細菌 [21]、*Rhodothermus* 属細菌 [22] など系統的に多様な細菌から見つかっている。同様にエンド型の分解様式を持つキチナーゼも系統的に多様な微生物から見つかっている [11, 21, 22]。pNP-(GlcNAc)₂ を基質とした場合の K_m および k_{cat} に関しては、*Paenibacillus* 属細菌ではこれまでに本菌株と *Paenibacillus* sp. FPU-7 株が分泌するキチナーゼ ChiW [19] で報告されている。*PthChiA* の K_m と k_{cat} はともに ChiW より高い値であり、 k_{cat}/K_m は ChiW より低かった。

PthChiA の推定アミノ酸配列から予想される *PthChiA* の性質と、*P. thermoaerophilus* TC22-2b 株の液体培養液から精製した *PthChiA* の性質が次の 5 点で一致した。1) GH18 ドメインが存在することと *PthChiA* がキチナーゼ活性を有すること、2) 基質へ結合する性質を持つことが知られている [23] CBM の存在と、*PthChiA* がコロイダルキチンへの吸着により精製されたこと、3) タンパク質の細胞外への輸送に関与するシグナルペプチドの検出と *PthChiA* が液体培養液の上清中から精製されたタンパク質 (細胞外タンパク質) であったこと、4) シグナルペプチド切断後の *PthChiA* の推定 N 末端アミノ酸配列と精製 *PthChiA* の N 末端アミノ酸配列、5) シグナルペプチド切断後の

PthChiA の推定分子量と精製 *PthChiA* の SDS-PAGE 結果から算出された分子量。*PthChiA* の推定アミノ酸配列中に見られたいずれのドメインも多くの細菌由来キチナーゼで見つかっている [24]。また、*PthChiA* の配列中には GH18 キチナーゼのアミノ酸配列保存領域 (DXXDXDXE) [25] も存在していた。*PthChiA* は上記のようにキチナーゼによく見られる構造を有している一方で、既知配列との推定アミノ酸配列相同性が 78% 未満であり、高い相同性を示す既知のキチナーゼはなかった。

5. 結論

本研究において新種の好熱性キチン分解細菌 *Paenibacillus thermoaerophilus* TC22-2b 株を分離し、記載することができた。そして、本菌株により分泌されたキチナーゼ (*PthChiA*) を精製し、性質を明らかにした。さらに *PthChiA* をコードする遺伝子の取得に成功し、分子構造の推定を行った。これらの結果により、高温環境でキチンを分解する好熱性 *Paenibacillus* 属細菌の存在が初めて示されたことから、キチン分解微生物の多様性に関する知見を広げることができたと思われる。また、本菌株は新種であり、分泌されたキチナーゼ *PthChiA* は既知のキチナーゼと高い相同性を示さなかったことから、新たなキチナーゼ供給源となる微生物資源を取得できたと考えられる。*PthChiA* は好熱性であり、さらに高い熱安定性および pH 安定性を有しており、これらの性質は産業利用において利点になると思われる。また、*PthChiA* 遺伝子を取得することができたので、今後は大腸菌などを用いて組換えタンパク質として *PthChiA* を生産することが可能になると思われる。

6. 参考文献

- [1] Gooday GW (1990) *Advances in Microbial Ecology* 11: 387-430.
- [2] Dahiya N et al. (2006) *Appl Microbiol Biotechnol* 71:773-782.
- [3] Henriessat B (1991) *Biochem J* 280:309-316.
- [4] Karlsson M et al. (2009) *J Mol Microbiol Biotechnol* 16:208-223.
- [5] Ueda M et al. (2009) *Appl Microbiol Biotechnol* 81:1077-1085.
- [6] Fujita K et al. (2006) *Biochem Biophys Res Commun* 345:502-507.
- [7] Adrangi S & Faramarzi MA (2013) *Biotechnol Adv* 31:1786-1795.
- [8] Gooday GW (1997) *Chitin Chitosan Res.* 3: 233-243.
- [9] Felse PA & Panda T (2000) *Bioprocess Eng* 23:127-134.
- [10] Bhattacharya D et al. (2007) *Crit Rev Biotechnol* 27:21-28.
- [11] Jung WJ et al. (2005) *J Microbiol Biotechnol* 15:274-280.
- [12] Imoto T & Yagishita K (1971) *Agric Biol Chem* 35: 1154-1156.
- [13] Stackebrandt E & Ebers J (2006) *Microbiol Today* 33:152-155.
- [14] Ueda J et al. (2013) *Int J Syst Evol Microbiol* 63:3330-3335.
- [15] Priest FG (2009) *Bergey's manual of systematic bacteriology* 3:269-295.
- [16] Zhou Y et al. (2012) *Antonie van Leeuwenhoek* 102:601-609.
- [17] Singh AK & Chhatpar HS (2011) *Appl Biochem Biotechnol* 164:77-88.
- [18] Loni PP et al. (2014) *J Basic Microbiol* 54:1080-1089.
- [19] Itoh T et al. (2014) *Biosci Biotechnol Biochem* 78:624-634
- [20] Shibasaki H et al. (2014) *Appl Microbiol Biotechnol* 98:7845-7853.
- [21] Tsujibo H et al. (2000) *Biosci Biotechnol Biochem* 64:96-102.
- [22] Hobel CF et al. (2005) *Extremophiles* 9:53-64.
- [23] Guillén D et al. (2010) *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1241-1249.
- [24] Suzuki K et al. (1999) *Biochem J* 343:587-596.
- [25] van Aalten DMF et al. (2000) *PNAS* 97:5842-5847.