

高度好塩性古細菌に由来する多糖分解酵素を用いた新規オリゴ糖創製

八波 利恵

(東京工業大学大学院生命理工学研究科 生物プロセス専攻)

研究の目的

高度好塩性古細菌 *Halobacterium* sp. NRC-1 株の全ゲノム解析が終了し、キチナーゼホモログ (ChiN1 と命名) をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) の存在が明らかとなった。これまでに高度好塩性古細菌が生産するキチナーゼの報告はなく、この ORF がコードするキチナーゼの実体も明らかにされていない。既知のキチナーゼとのアミノ酸配列比較により、ChiN1 はマルチドメイン酵素であり、*N* 末端側のキチン結合ドメイン (ChBD)、その下流の Polycystic kidney disease I ドメイン (PKD)、さらに *C* 末端側の触媒ドメイン (CatD) の 3 つのドメインからなることが示唆された。一方、高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* TR-1 株の細胞表層には多量の糖タンパク質 (CSG) が存在しており、CSG 遺伝子における強力なプロモーターの存在が示唆された。本研究室では既に、CSG 遺伝子プロモーターを利用した ChiN1 遺伝子の *Ha. japonica* における高効率分泌発現に成功している。飽和食塩水という水分含量の少ない環境で機能する ChiN1 を用いることで、その逆反応を利用した有機溶媒中でのオリゴ糖の合成が可能になると期待される。本研究では、ChBD および PKD の機能に関する知見を得ることを目的として、CatD のみからなるドメイン欠失型酵素 ChiN1_{CatD} を調製し、ChiN1 との性質比較を行った。

方法、結果および結論

Ha. japonica において ChiN1 および ChiN1_{CatD} を発現させ、精製を行った。さらに精製標品を用いて性質を比較した。その結果、ChiN1_{CatD} の反応至適は pH 4.5 付近、反応至適温度は 50°C 付近、至適 NaCl 濃度は 1M 付近であり、ChiN1 とほぼ同様な性質を示した (Fig. 1)。一方、ChiN1_{CatD} は ChiN1 に比して不溶性キチンに対する結合能が低下しており (Table)、ChBD もしくは PKD が不溶性キチンへの結合に関与していることがわかった。同様に、ChiN1_{CatD} においては不溶性キチンの加水分解活性の低下が認められ (Fig. 2)、ChBD もしくは PKD は不溶性キチンの加水分解を促進することが明らかとなった。

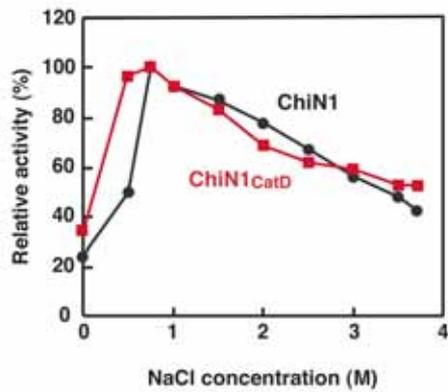


Fig. 1 Effect of NaCl concentration on activity

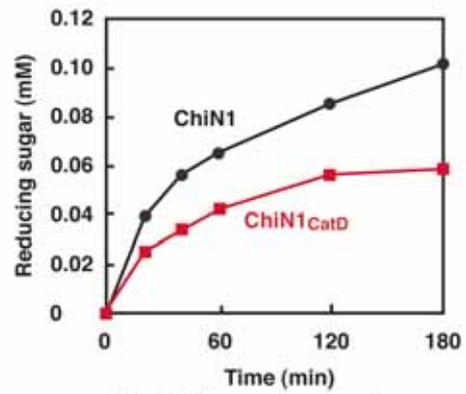


Fig. 2 Time course of insoluble chitin degradation

Table Binding activity toward insoluble chitin

	Binding rate
ChiN1	90%
ChiN1CatD	50%

現在、各種有機溶媒を用いて ChiN1 の有機溶媒耐性能を検討中である。今後は耐性を示した溶媒を用いて、新規オリゴ糖の創製を行う予定である。