

キトサナーゼの加水分解特異性に関する研究

(Studies on Hydrolytic Specificity of Chitosanase)

平野勝紹

2013

目次

第1章 序論	1
第2章 <i>Aspergillus fumigatus</i> 由来キトサナーゼ II (AF キトサナーゼ II)の精製 および性質	12
第1節 諸言	12
第2節 実験材料および実験方法	15
第1項 実験材料	15
第2項 培地および培養	15
第3項 AF キトサナーゼ II の精製	18
第4項 キトサナーゼ活性測定法	18
第5項 タンパク質定量法	19
第6項 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)および活性染色	19
第7項 N 末端アミノ酸配列	20
第8項 至適 pH および pH 安定性の測定法	20
第9項 至適温度および温度安定性の測定法	21
第10項 AF キトサナーゼ II によるキトサン分解物の精製	21
第11項 エキソ-β-グルコサミニダーゼ(β-GlcNase)活性測定法	22
第12項 β-GlcNase によるオリゴ糖の分解	22
第13項 薄層クロマトグラフィー(TLC)	22
第14項 質量分析	23
第3節 実験結果	24
第1項 AF キトサナーゼ II の精製	24
第2項 AF キトサナーゼ II の酵素化学的性質	29

第3項 AFキトサナーゼ IIの切断特異性	34
第4節 考察	39
第3章 キトサナーゼによる <i>N</i> -モノアセチルキトサンオリゴ糖の分解様式	42
第1節 諸言	42
第2節 実験材料および実験方法	46
第1項 実験材料	46
第2項 部分 <i>N</i> -アセチルキトサンの調製	46
第3項 <i>Aeromonas</i> sp. No.10S-24 由来キチナーゼ IIの調製	47
第4項 部分 <i>N</i> -アセチルキトサンオリゴ糖の調製	48
第5項 還元糖の定量	49
第6項 キチナーゼ活性測定法	50
第7項 キトサナーゼ活性測定法	50
第8項 β -GlcNase 活性測定法	51
第9項 β -GlcNase によるオリゴ糖の分解	51
第10項 キトサナーゼによるキトヘキサオースの分解	51
第11項 薄層クロマトグラフィー(TLC)	51
第12項 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)	51
第13項 質量分析	52
第3節 実験結果	53
第1項 <i>N</i> ¹ -モノアセチルキトサンオリゴ糖[(GlcN) ₁₋₅ -GlcNAc]の調製	53
第2項 Randle-Morgan 法を用いた各種キトオリゴ糖の呈色	53
第3項 キトサナーゼによるキトオリゴ糖の分解	61
第4項 AFキトサナーゼ IIの(-1)サイトにおけるアセチル基認識	70

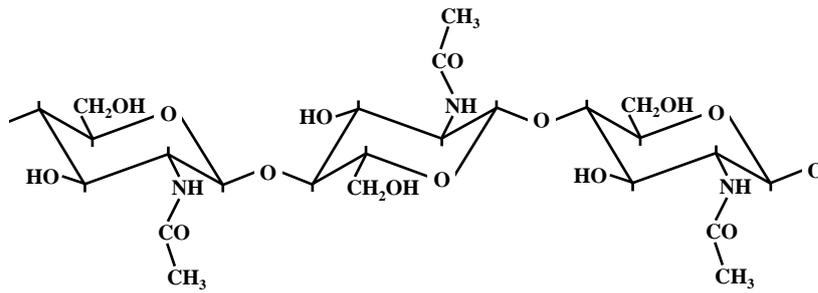
第 5 項 各種キトサナーゼによる(GlcN) ₅ -GlcNAc の分解様式	73
第 4 節 考察	79
第 4 章 <i>N</i> ¹ , <i>N</i> ⁴ -ジアセチルキトヘキサオース[(GlcN) ₂ -GlcNAc-(GlcN) ₂ -GlcNAc]を用いた キトサナーゼの切断特異性の決定	83
第 1 節 諸言	83
第 2 節 実験材料および実験方法	85
第 1 項 実験材料	85
第 2 項 還元糖の定量	85
第 3 項 キトサナーゼ活性測定法	85
第 4 項 キトオリゴ糖の <i>N</i> -アセチル化	86
第 5 項 β-GlcNase 活性測定法	86
第 6 項 β- <i>N</i> -アセチルグルコサミニダーゼ活性測定法	86
第 7 項 エキソグリコシダーゼによるオリゴ糖の分解	87
第 8 項 薄層クロマトグラフィー(TLC)	87
第 9 項 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)	87
第 10 項 質量分析	87
第 11 項 (GlcN) ₂ -GlcNAc-(GlcN) ₂ -GlcNAc の調製	88
第 12 項 <i>Amycolatopsis</i> sp. CsO-2 由来キトサナーゼ(CsO-2 キトサナーゼ)による キトサン分解物の精製	89
第 3 節 実験結果	90
第 1 項 (GlcN) ₂ -GlcNAc-(GlcN) ₂ -GlcNAc の調製	90
第 2 項 キトサナーゼによる(GlcN) ₂ -GlcNAc-(GlcN) ₂ -GlcNAc の分解	94

第3項 CsO-2 キトサナーゼおよび <i>Pseudomonas</i> A-01 由来キトサナーゼの (GlcN) ₂ -GlcNAc-(GlcN) ₂ -GlcNAc に対する作用	99
第4項 CsO-2 キトサナーゼの部分 <i>N</i> -アセチルキトサンに対する切断特異性	99
第4節 考察	113
第5章 総括	117
参考文献	125
謝辞	133

第1章 序論

キチンは、*N*-アセチル-D-グルコサミン(GlcNAc)を主構成物とし、GlcNAc および D-グルコサミン(GlcN)が β -1,4-グリコシド結合により直鎖状に連なった多糖(Fig. 1-1)である。キチンの構造は、セルロースによく似ており、2位の炭素に結合する官能基が、セルロースでは水酸基であるのに対し、キチンではアセトアミド基となっている。また、ピラノース環は椅子型の 4C_1 をとる。キチンの生物界における分布は、菌界、植物界および動物界と広域に及び、構造多糖としての役割を果たしている(金城と奥山, 2004)。菌界においては、カビおよびキノコなどの真菌類に、植物界では下等な藻類に分布し細胞壁の構成に関わっている。また、動物界においては、原動物から有鬚動物まで分布しており、特にカニ、エビおよび昆虫の外骨格を構築し、含有率が高い。このように、細胞壁および外骨格の構成成分として広域にわたり分布しているキチンは、セルロースに次ぐバイオマスと言われており、その年間合成量は 1×10^{11} トンと推測されている(Kim *et al.*, 2008)。一方、キチンの脱アセチル化物であるキトサンは、GlcNを主成分とし、キチンと同じく β -1,4-グリコシド結合により直鎖状に連なったアミノ多糖である(Fig. 1-1)。しかしながら、キトサンの分布はキチンと異なり狭域で、接合菌類の細胞壁などに存在が知られているのみである(Bartnicki-Garcia *et al.*, 1968)。現在、工業的に生産されているキチンは、カニおよびエビを原料としており、希塩酸により無機塩を、アルカリ処理によりタンパク質を除去することで得られる。また、このようにして得られたキチンを熱濃アルカリ処理することによりキトサンを得ることができる。

Chitin



Chitosan

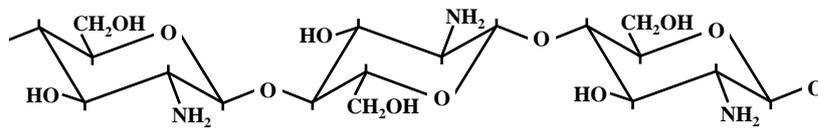


Fig. 1-1. Structure of Chitin and Chitosan.

近年、キチン質の有効利用に関する研究が盛んに行われており、キトサンは、医薬品や化粧品、食品、また、廃水処理への利用など幅広い分野で応用されている(平野, 2004)。また、キチンおよびキトサンの加水分解産物である6糖以上のキチンオリゴ糖[(GlcNAc)_n]およびキトサンオリゴ糖[(GlcN)_n]に抗腫瘍活性(Suzuki *et al.*, 1986, Qin *et al.*, 2002)、免疫賦活活性(Hirano *et al.*, 1991)、エリシター活性(Kendra and Hadwiger, 1984, Hirano *et al.*, 1989)および細菌の増殖抑制(Jeon and Kim, 2000, Zivanovic *et al.*, 2004)など様々な生理活性が見いだされている。このように、様々な生理活性を持つキチン質であるが、その消費量はセルロースと比べ極めて少ない。このように、キトオリゴ糖には様々な生理活性が報告されているが、糖配列の明確なキトオリゴ糖を単一に調製することは非常に困難であり、先に述べた生理活性も様々な重合度およびアセチル化度のキトオリゴ糖混合物で検討されていることが多い。現在、これらキトオリゴ糖は工業的には塩酸による酸加水分解により製造されている(Rupley, 1964)。しかしながら、化学的な加水分解によるキトオリゴ糖の製造法では、部分的な脱アセチル化や低分子化などの意図しない副反応が避けられず、特定の重合度をもつオリゴ糖を選択的に調製できないことや、モノマーや低重合度キトオリゴ糖が多く生産され、生理活性をもつと報告されている6糖以上の高重合度キトオリゴ糖の収率が低いなど問題が多い。加えて、この調製法には塩酸の処理が必要となるなど環境面においても負荷が高い。一方、キチン質を特異的に分解する糖質加水分解酵素であるキチナーゼおよびキトサナーゼを用いたキトオリゴ糖の調製は、キトオリゴ糖の回収率が高く、化学法では得難い高重合度のキトオリゴ糖を効率よく回

収できる。さらに、有害な廃液が出ないため環境負荷の観点からも化学法に比べて優れている。そのため、酵素法によるキトオリゴ糖の調製は有用であり、キチナーゼおよびキトサナーゼを用いたキトオリゴ糖調製への応用研究が行われている。

キチナーゼ(EC 3.2.1.14)は、キチンおよびキトデキストリン分子中の *N*-アセチル- β -グルコサミニド結合をエンド型で加水分解する酵素であり、キトサナーゼ(EC 3.2.1.132)は、部分 *N*-アセチルキトサン分子中に含まれる GlcN-GlcN 間の β -1,4-グリコシド結合をエンド型で加水分解する酵素と定義されている(Enzyme Nomenclature, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>)。現在、Henrissat ら(1991, 1993, 1996)は、糖質加水分解酵素をアミノ酸配列の類似性から 131 のファミリーに分類している(<http://www.cazy.org/>)。キチナーゼはこの分類によると、お互いにアミノ酸の相同性を示さない 2 つの糖質加水分解酵素ファミリー(GH-)、すなわち、GH-18 および 19 に分類されている。GH-18 キチナーゼ(Mitsutomi *et al.*, 1990, 1995 b, Ohtakara *et al.*, 1990)は、部分 *N*-アセチルキトサン分子中の GlcNAc-GlcNAc 間および GlcNAc-GlcN 間の *N*-アセチル- β -グルコサミニド結合を切断する。これに対して、GH-19 に属するキチナーゼ(Mitsutomi *et al.*, 1995 a, 1997)は、部分 *N*-アセチルキトサン分子中の GlcNAc-GlcNAc 間および GlcN-GlcNAc 間を切断する。一方、キトサナーゼは、GH-5、7、8、46、75、および 80 の 6 つの糖質加水分解酵素ファミリーに分類される(Table 1-1)。Streptomyces griseus HUT6037 由来キトサナーゼ(HUT キトサナーゼ、Tanabe *et al.*, 2003)は GH-5 に属し、キトサナーゼ活性を有する Trichoderma reesei 由来セロビオヒドラーゼ(Ike *et al.*, 2007)は GH-7 に分類されている。

Table 1-1. Classification of Glycosyl Hydrolase Family and Cleavage Specificity

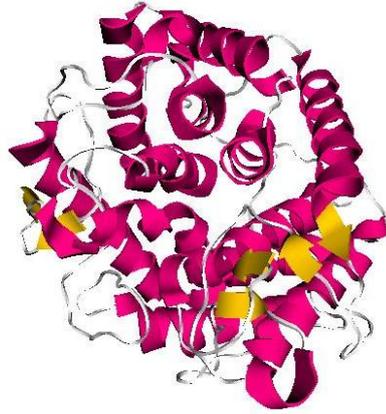
Chitosanase	Subclass	Cleavage point
GH Family 5		
<i>Streptomyces griseus</i> HUT6037	III	 
GH Family 7		
<i>Trichoderma reesei</i>	ND	
GH Family 8		
<i>Bacillus</i> sp. No. 7-M	II	
<i>Bacillus circulans</i> WL-12	III	 
<i>Bacillus</i> sp. K17	ND	
GH Family 46		
<i>Streptomyces</i> sp. N174	I	 
<i>Bacillus pumilus</i> BN262	I	 
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> UTK	I	 
<i>Bacillus circulans</i> MH-K1	III	 
<i>Amycolatopsis</i> sp. CsO-2	ND	
<i>Pseudomonas</i> sp. A-01	ND	
GH Family 75		
<i>Aspergillus fumigatus</i> Y2K	I	 
<i>Fusarium solani</i> sp. <i>phaseoli</i>	ND	
<i>Aspergillus oryzae</i> IAM2660	ND	
GH Family 80		
<i>Mitsuaria chitosanitabida</i>	ND	
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	ND	

ND; Not determined, ●; GlcN, ○;GlcNAc, ▼; Cleavage point

Bacillus sp. No.7-M 由来キトサナーゼ(7M キトサナーゼ、Uchida *et al.*, 1989)、*Bacillus circurans* WL-12 由来キトサナーゼ(WL-12 キトサナーゼ、Mitsutomi *et al.*, 1998)および *Bacillus* sp. K17 由来キトサナーゼ(K17 キトサナーゼ、Fukazawa *et al.*, 2001)は GH-8 に属している。また、*Bacillus circurans* MH-K1 由来キトサナーゼ(MH-K1 キトサナーゼ、Yabuki *et al.*, 1988)、*Amycolatopsis* sp. CsO-2 由来キトサナーゼ(CsO-2 キトサナーゼ、Okajima *et al.*, 1994)、*Bacillus pumilus* BN262 由来キトサナーゼ(Fukamizo *et al.*, 1994)、*Streptomyces* sp. N174 由来キトサナーゼ(N174 キトサナーゼ、Fukamizo *et al.*, 1995)、および *Pseudomonas* A-01 由来キトサナーゼ(A-01 キトサナーゼ、Ando *et al.*, 2008)は GH-46 に分類されており、*Fusarium solani* sp. phaseoli 由来キトサナーゼ(Shimosaka *et al.*, 1996)、*Aspergillus fumigatus* Y2K 由来キトサナーゼ(Cheng *et al.*, 2006)および *Aspergillus oryzae* IAM2660 由来キトサナーゼ(Zhang *et al.*, 2001)は GH-75 に、*Matsuebacter chitosanotabidus* 3001 (現 *Mitsuaria chitosanitabida*)由来キトサナーゼ(Park *et al.*, 1999)および *Sphingobacterium multivorum* 由来キトサナーゼ(Matsuda *et al.*, 2001)は GH-80 にそれぞれ属している。一方、Fukamizoら(1994)は、部分 *N*-アセチルキトサン分子中の β -1,4-グリコシド結合の切断特異性によりキトサナーゼを Subclass I、II、および III の3つに分類した。Subclass Iキトサナーゼ(Fenton *et al.*, 1981、Fukamizo *et al.*, 1994、Cheng *et al.*, 2006)は、キトサン分子中の GlcN-GlcN 間および GlcNAc-GlcN 間を加水分解し、Subclass II のキトサナーゼ(Izume *et al.*, 1992)は GlcN-GlcN 間のみを、Subclass III キトサナーゼ(Mitsutomi *et al.*, 1992、1996、1998)は

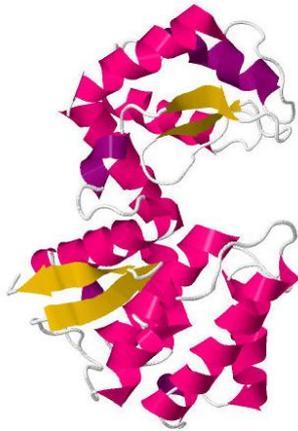
GlcN-GlcN 間および GlcN-GlcNAc 間を切断する。Table 1-1 に示すように、キトサナーゼの場合、GH ファミリーと切断特異性に関連性は見られない。また、キトサナーゼの立体構造は、1996 年に Marcotte ら(1996)により GH-46 に属し Subclass I に分類されるキトサナーゼである N174 キトサナーゼ(PDB ID: 1CHK)について、1999 年に Saito ら(1999)により GH-46 に属し Subclass III の切断特異性を示す MH-K1 キトサナーゼ(PDB ID: 1QGI)について、2004 年に Adachi ら(2004)により GH-8 に属する K17 キトサナーゼ (PDB ID: 1V5D)について報告されている(Fig. 1-2)。しかしながら、GH-5、7、75、および 80 のキトサナーゼについては、立体構造が明らかになっていない。K17 キトサナーゼは、 $(\alpha/\alpha)_6$ からなる二重バレル型構造をもっており、N174 キトサナーゼおよび MH-K1 キトサナーゼは、T4 ファージ由来リゾチームの構造と類似したダンベル形の構造をしている。さらに、N174 キトサナーゼでは、(-3)(-2)(-1)(+1)(+2)(+3)からなる 6 つのサブサイト構造をもつことが報告されており、(-1)(+1)間で基質を切断する(Boucher *et al.*, 1995)。また、X 線構造解析の結果、N174 キトサナーゼの触媒には電子供与体として Glu-22 が、電子受容体として Asp-40 が関係しており、これら電子供与体および受容体は、酵素-基質複合体において 12Å の距離をもち、水 1 分子が入るスペースがあることから、その反応機構はインバーティングメカニズムであると結論された(Marcotte *et al.*, 1996)。一方、GH-5 に分類されサブクラス III の切断特異性を示す HUT キトサナーゼは、その分解物の ¹H-NMR スペクトル分析により、β-アノマーを生成することから、リテイニング酵素であり、糖転移活性を有することが報告されている(Tanabe *et al.*, 2003)。このように、キトサナーゼは、近年、その酵

Glycosyl Hydrolase Family 8



Chitosanase from *Bacillus* sp. K17

Glycosyl Hydrolase Family 46



Chitosanase from *Streptomyces* sp. N174
(Subclass I)



Chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1
(Subclass III)

Fig. 1-2. Structure Comparison of Glycosyl Hydrolase Family 8 with Glycosyl Hydrolase Family 46.

素化学的性質、立体構造および反応機構などが明らかとなってきたが、キチナーゼに比べると不明な点が多い。

先にも述べたとおり、キトサナーゼはキトサン分子中の GlcN-GlcN 間を優先的に切断する酵素であるが、多くのキトサナーゼは、20-30% アセチル化されたキトサンをよく分解することが知られている(Yabuki *et al.*, 1988、Izume *et al.*, 1992、Uchida *et al.*, 1994、Zhang *et al.*, 2000、Tanabe *et al.*, 2003、Gao *et al.*, 2008)。このことは、キトサナーゼが基質となる部分 *N*-アセチルキトサンのアセチル基を認識していることを示唆している。しかしながら、キトサンは、その重合度、脱アセチル化度および糖配列が不明確で、酵素に対するアセチル基の影響を検討することは困難である。したがって、キトサナーゼ研究に適した重合度および糖配列が明確なキトオリゴ糖を調製することは、キトサナーゼの基質認識の検討を行うために重要であり、これらヘテロキトオリゴ糖を用いたキトサナーゼの切断特異性の解明は、キトサナーゼを用いた生理活性を有するキトオリゴ糖の酵素的調製法の開発に寄与する。

Aeromonas sp. No.10S-24 由来キチナーゼ II(10S-24 キチナーゼ II)は、部分 *N*-アセチルキトサンの GlcNAc-GlcNAc 間および GlcNAc-GlcN 間を切断する GH-18 エンド型キチナーゼであり、分解生成物として、還元末端にのみ GlcNAc 残基をもつ *N*¹-モノアセチルキトサンオリゴ糖[(GlcN)_n-GlcNAc]あるいは還元末端および非還元末端に GlcNAc 残基を有するジアセチルキトサンオリゴ糖[GlcNAc-(GlcN)_n-GlcNAc]を生成する。また、本酵素は、キチナーゼにもかかわらずアセチル化度の低いキトサンをよく分解するため、酸加水分解では調製が難しい高重

合度キトオリゴ糖を調製することが可能である(Mitsutomi *et al.*, 1996)。また、当研究室において調製された *Bacillus amyloliquefaciens* UTK 由来キトサナーゼ(UTKキトサナーゼ、Uchida *et al.*, 1994)は、基質となる部分 *N*-アセチルキトサン分子中の GlcN-GlcN 間および GlcNAc-GlcN 間を切断する Subclass I キトサナーゼであり、また、得られる分解生成物は(GlcN)_nに加え、(GlcN)₂-GlcNAc、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂および(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAcと、その糖配列に特徴がある(Seki *et al.*, 2000)。このように、酵素を用いて部分 *N*-アセチルキトサンを分解することにより、糖配列の明確な高重合度のキトオリゴ糖を調製することができる。

本研究では、これらヘテロキトオリゴ糖を用いてキトサナーゼ活性に及ぼすアセチル基の影響を明らかにすることを目的とした。まず、第2章において、*A. fumigatus* ATCC13073 が生産する分子量 23,500 のキトサナーゼ(AFキトサナーゼ II)を精製し、その酵素化学的性質およびその切断特異性について検討した。次に、第3章では、還元末端に GlcNAc 残基を有する *N*¹-モノアセチルキトヘキサオース[(GlcN)₅-GlcNAc]を酵素的に調製し、(GlcN)₅-GlcNAc のキトサナーゼ活性測定用基質としての有用性について検討した。また、(GlcN)₅-GlcNAc を用いた反応速度論的解析により AFキトサナーゼ II、7Mキトサナーゼおよび MH-K1キトサナーゼのアセチル基認識について検討を行い、(+3)サイト近傍は GlcN よりも GlcNAc に対し親和性が高いことを明らかにした。第4章では、*N*¹,*N*⁴-ジアセチルキトヘキサオースを用いた迅速かつ簡便な切断特異性の解析法を開発し、本方法により CsO-2 および A-01キトサナーゼがキトサン分子中の GlcN-GlcN 間、GlcN-GlcNAc 間および GlcNAc-GlcN 間を切断する新規な切断特異

性をもつキトサナーゼであることを見出した。

本論文はヘテロキトオリゴ糖を用いたキトサナーゼの加水分解特異性に関する研究の成果をまとめたものである。

第2章 *Aspergillus fumigatus* 由来キトサナーゼ II (AF キトサナーゼ II)

の精製および性質

第1節 諸言

キトサナーゼ(EC 3.2.1.132)は、キトサンの分解を触媒する糖質加水分解酵素で、主に部分 *N*-アセチルキトサン分子中の GlcN-GlcN 間の β -1,4-グリコシド結合を加水分解する(Enzyme Nomenclature, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>)。部分 *N*-アセチルキトサンの加水分解産物であるキトオリゴ糖には様々な生理活性が報告されており(Kim *et al.*, 2008)、機能的キトオリゴ糖の調製に応用するために、微生物由来のキトサナーゼについて研究が行われてきた。これまでに、細菌(Yabuki *et al.*, 1988, Boucher *et al.*, 1992, Izume *et al.*, 1992, Okajima *et al.*, 1994, Mitsutomi *et al.*, 1998, Park *et al.*, 1999, Tanabe *et al.*, 2003, Kobayashi *et al.*, 2011)および真菌(Shimosaka *et al.*, 1993, Kim *et al.*, 1998, Cheng *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 2001, Eom *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2005)が生産するキトサナーゼが精製され、その酵素化学的性質や加水分解様式が調べられてきた。現在、これらキトサナーゼは、その一次構造の類似性に基づき GH-5、7、8、46、75 および 80 の6つの糖質加水分解酵素ファミリーに分類されている(<http://www.cazy.org/>)。GH-46、75 および 80 は、キトサナーゼのみが分類されている糖質加水分解酵素ファミリーであり、その中でも GH-75 には真菌由来のキトサナーゼのみが分類されている。一方、Fukamizo ら(1994)は、構造による分類とは別に、キトサンに対する切断

特異性により、キトサナーゼを3つの Subclass に分類した。Subclass I キトサナーゼ (Fenton *et al.*, 1981、Fukamizo *et al.*, 1994、Cheng *et al.*, 2006)は、キトサン分子中の GlcN-GlcN 間および GlcNAc-GlcN 間を加水分解し、Subclass II のキトサナーゼ(Izume *et al.*, 1992)は GlcN-GlcN 間のみを、Subclass III キトサナーゼ(Mitsutomi *et al.*, 1992、1996、1998)は GlcN-GlcN 間および GlcN-GlcNAc 間を切断する。このように構造および切断特異性によりキトサナーゼは分類されているが、キトサナーゼの構造と切断特異性の関係については明らかになっていない。

A. fumigatus 由来キトサナーゼは、高いキトサン分解能を有し、生理活性を有するキトオリゴ糖の調製に有用な酵素であると考えられ、現在までに、*A. fumigatus* KH-94 (Kim *et al.*, 1998)、*A. fumigatus* Y2K (Cheng *et al.*, 2000)、*A. fumigatus* KB-1 (Eom *et al.*, 2003)などからキトサナーゼが精製されている。また、これら *A. fumigatus* 由来キトサナーゼは、いずれも完全に脱アセチル化されたキトサンを最もよく分解する。一方、本章において精製した *A. fumigatus* ATCC13073 由来キトサナーゼ II は、他の *A. fumigatus* 由来キトサナーゼと同様に高いキトサン分解能を有していたが、完全に脱アセチル化されたキトサンよりも 20-30%アセチル化されたキトサンをよく分解した。キトサナーゼは部分 *N*-アセチルキトサン分子中に含まれる GlcN-GlcN 間の β -1,4-グリコシド結合を主に切断するが、それに加え、ほとんどのキトサナーゼは GlcNAc-GlcN 間または GlcN-GlcNAc 間を分解する。これは、基質となるキトサンが、完全に脱アセチル化されておらず、10-30%程度アセチル化された状態で自然界に存在することと

関係していると考えられ、多くのキトサナーゼは完全に脱アセチル化されたキトサンよりも20-30%程度アセチル化されたキトサンをよく分解する(Yabuki *et al.*, 1988、Izume *et al.*, 1992、Uchida *et al.*, 1994、Zhang *et al.*,2000、Tanabe *et al.*, 2003、Gao *et al.*, 2008)。このように、基質のアセチル基がキトサナーゼの触媒反応に何らかの影響を与えている考えられる。

そこで、本章では、アセチル基のキトサナーゼ活性に及ぼす影響を検討するために、まず、*A. fumigatus* ATCC13073 の培養ろ液からキトサナーゼを精製し、酵素化学的性質および切断特異性を検討したので報告する。

第 2 節 実験材料および実験方法

第 1 項 実験材料

グルコサミン塩酸塩およびグライコールキトサンは和光純薬工業株式会社より購入した。キトオリゴ糖 [(GlcN)_n, n=2-6] は焼津水産化学工業株式会社より、脱アセチル化度 75%および 96%の粉末キトサンは片倉チッカリン株式会社より供与されたものを用いた。キトサン 7B (脱アセチル化度 70%)、8B (脱アセチル化度 80%)、9B (脱アセチル化度 90%)、10B (脱アセチル化度 100%)および 粉末キチン(キチン EX)はフナコシ株式会社製のものを用いた。コロイダルキチンは Jeuniaux (1958)の方法に従い粉末キチンより調製した。カルボキシメチルセルロース (CMC)は片山化学工業株式会社より購入した。 *Penicillium* sp. AF-9-P-128 由来エキソ-β-グルコサミニダーゼ (β-GlcNase、内田ら、1995)は、当研究室で精製されたものを使用した。 *Aspergillus fumigatus* ATCC13073 は Leeds 大学 David J. Adams 博士から恵与された。

第 2 項 培地および培養

A. fumigatus の培養には、Vogel's N 培地(Vogel, 1964, Table 2-1)を用いた。孢子懸濁液は、Escottら(1998)の方法により調製した。孢子懸濁液を 1×10^6 個/mLとなるように、2% (w/v)スクロースを含む Vogel's N 培地(Table 2-4) 50 mL に加え、37°C、200 rpm で振盪培養した。24 時間培養後、培養液を遠心分離(2,000 g、15 分)し、菌体を回収し、Vogel's N 培地で 2 回洗浄した。その後、菌体を 1%グルコサミン(w/v)を含む Vogel's N 培地(Table 2-5) 500 mL に移し、再

Table 2-1. Composition of Vogel's N Medium

50× Vogel's N	10 mL
0.01% Biotin	2.5 mL
Distilled water	487.5 mL
	500 mL

Table 2-2. Composition of 50× Vogel's N Solution

Distilled water	775 mL
Trisodium citrate dihydrate	125 g
Potassium dihydrogenphosphate (KH ₂ PO ₄)	250 g
Magnesium sulfate heptahydrate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	10 g
Ammonium nitrate (NH ₄ NO ₃)	100 g
Calcium chloride dihydrate (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	5 g
Trace element solution	5 mL
0.01% Biotin	2.5 mL
Chloroform	2 mL

Table 2-3. Composition of Trace Element Solution

Distilled water	95 mL
Citric acid monohydrate	5 g
Zinc sulfate heptahydrate (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	5 g
Ammonium iron(II) sulfate [(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄)·7H ₂ O]	1 g
Copper(II) sulfate pentahydrate (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	250 mg
Manganese(II) sulfate monohydrate (MnSO ₄ ·H ₂ O)	50 mg
Boric acid (H ₃ BO ₃)	50 mg
Sodium molybdate dihydrate (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	50 mg
Chloroform	1 mL

**Table 2-4. Composition of Vogel's N Medium
Containing Sucrose**

50 × Vogel's N	1 mL
Sucrose	1 g
0.01% Biotin	25 μL
Distilled water	49 mL

**Table 2-5. Composition of Vogel's N Medium
Containing Glucosamine**

50 × Vogel's N	1 mL
10% GlcN	50 mL
0.01% Biotin	250 μL
Distilled water	445 mL

び、37°C、200 rpm で24時間培養した。得られた培養液を遠心分離(20,000 g、20分)し、培養上清を粗酵素液として回収した。

第3項 AFキトサナーゼIIの精製

以後の実験は、4°Cで行った。粗酵素液を0.05 M酢酸緩衝液(pH 5.0)に対し透析(透析用セルロースチューブ、三光純薬株式会社)後、0.05 M酢酸緩衝液(pH 5.0)により平衡化したCM-Sephadex C-50カラム(カラムサイズ:2.6×19 cm、流速:30 mL/h)に供した。同緩衝液で未吸着画分を溶出後、0-2.0 M NaCl 直線濃度勾配により吸着画分を溶出した。活性画分を回収後、限外ろ過(Diaflo 限外濾過膜 YM-10、東洋濾紙株式会社)による濃縮および0.05 Mリン酸緩衝液(pH 6.8)へのバッファー交換を行った。その後、濃縮液を、0.05 Mリン酸緩衝液(pH 6.8)で平衡化したSephadex G-100カラム(カラムサイズ:2.6×100 cm、流速:10 mL/h)に供し、同緩衝液で溶出させた。

第4項 キトサナーゼ活性測定法

キトサナーゼ活性は、可溶性キトサンを基質に用い、酵素分解により生成する還元糖量を、ImotoとYagishita(1971)によるSchales(1945)法の改良法に従い測定した。0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.3)に溶解した0.5%キトサン(脱アセチル化度99%)0.9 mLに酵素溶液0.1 mLを加え、37°Cで10分間反応させた後、Schales試薬(0.05%フェリシアン化カリウムを含む

0.5 M 炭酸ナトリウム溶液) 2 mL を加え反応を停止した。その後、蒸留水 0.5 mL を加え 15 分間煮沸した。冷却後、420 nm における吸光度を測定した。キトサナーゼ活性 1 unit の定義は、1 分間に 1 μ mol のグルコサミンに相当する還元糖を遊離する酵素量とした。

第 5 項 タンパク質定量法

タンパク質の定量は、Coomassie Plus -The Better Bradford Assay kit (Thermo Science)を用い、Bradford (1976)法に従って行った。標準物質として牛血清アルブミンを用いた。

カラムクロマトグラフィーを行った際のタンパク質測定には、280 nm における吸光度を測定した。

第 6 項 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)および活性染色

SDS-PAGE は、Laemmli (1970)の方法に従って行った。分離用ゲルに 0.1% SDS を含む 12.5%ポリアクリルアミドを、濃縮ゲルに 0.1% SDS を含む 4.5%ポリアクリルアミドを用いた。タンパク質バンドは、Coomassie Brilliant Blue R-250 により染色した。標準タンパク質には、 α -Lactalbumin (14.4 kDa)、Soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa)、Carbonic anhydrase (30 kDa)、Ovalbumin (45 kDa)、Bovine serum albumin (66 kDa)、および Phosphorylase b (97 kDa) (Low Molecular Weight Calibration Kit for Electrophoresis, Amersham Biosciences)を用いた。

活性染色を行うときは、0.1% SDS および 0.01% グライコールキトサンを含む 12% ポリアクリ

ルアミドを用いた。泳動後、ゲルをカゼイン緩衝液(pH 9.0)に浸し、2 時間振盪した。その後、0.5 M 酢酸緩衝液(pH 6.0)に交換し、37°C で 15 時間反応させた。キトサナーゼ活性は、ゲルを Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色することで可視化した。標準タンパク質には、Aprotinin (9 kDa)、Lysozyme (21 kDa)、Myoglobin (28 kDa)、Carbonic anhydrase (35 kDa)、Ovalbumin (47 kDa)、Glutamate dehydrogenase (62 kDa)、Bovine serum albumin (88 kDa)、 β -Galactosidase (116 kDa)、Myosin (193 kDa) (Prestained Protein Marker、ナカライテクス株式会社)を用いた。

第 7 項 N 末端アミノ酸配列

N 末端アミノ酸配列の測定は、The Protein Sequencing Facility of the School of Biochemistry and Molecular Biology of the University of Leeds に分析を依頼した。

第 8 項 至適 pH および pH 安定性の測定法

至適 pH は pH 4.0 から pH 6.2 の間で測定し、キトサナーゼ活性測定は本節第 4 項に従った。pH 安定性に用いる酵素は、pH 1.0-11.0 の範囲で 40°C、2 時間処理し、本節第 4 項に従い残存活性を測定した。pH 1.0 から pH 3.0 の範囲においては 0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液を、pH 3.0 から 8.0 においては McIlvain's 緩衝液を、pH 9.0 から 11.0 の領域では Atkins and Pantin's 緩衝液を用いた。

第9項 至適温度および温度安定性の測定法

至適温度は、30℃から70℃の範囲で測定し、その他の条件は本節第4項に従った。

温度安定性は、30℃から98℃において15分間処理した後、本節第4項に従い残存活性を測定した。

第10項 AFキトサナーゼIIによるキトサン分解物の精製

脱アセチル化度75%キトサン2.5gを0.1M酢酸溶液200mLに溶解させた後、0.1M水酸化ナトリウム溶液を用いpH5.5に調整し、2%アジ化ナトリウムを5mL添加後、0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)により500mLに定容し、キトサン溶液とした。キトサン溶液にAFキトサナーゼII(3.25 units/mL)を1mL添加後、37℃で72時間反応させた。10分の煮沸により反応を停止させ、ロータリーエバポレーターにより濃縮後、電気透析(Micro Acylizer G1、旭化成工業株式会社、透析膜:AC-110-10)を行った。透析液は、0.1M酢酸溶液を用いてpH5.0に調整し、20mM酢酸緩衝液(pH5.0)で平衡化したCM-Sephadex C-25カラム(カラムサイズ:2.6×45cm、流速:39 mL/h)に供した。同緩衝液で未吸着画分を溶出後、0-1.0M NaCl直線濃度勾配により吸着画分を溶出した。回収した各画分は、電気透析、濃縮後、凍結乾燥した。さらに精製が必要な画分については、0.15M酢酸緩衝液(pH4.2)により平衡化したBio-Gel P-4カラム(カラムサイズ:2.6×180cm、流速:30 mL/h)に供した。得られた画分は、電気透析、濃縮後、凍結乾燥した。

第 11 項 エキソ-β-グルコサミニダーゼ(β-GlcNase)活性測定法

β-GlcNase 活性は、キトサンを基質に用い生成する還元糖量を Schales 法により測定することで算出した。すなわち、0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.7)に溶解した 0.5%キトサン(脱アセチル化度 99%) 0.9 mL を 37°C で 5 分間プレインキュベートした後、β-GlcNase 0.1 mL を添加し、37°C で 10 分間反応させた。その後、Schales 試薬 2 mL を加え反応を停止し、蒸留水 0.5 mL を加えた後 15 分間煮沸した。冷却、ろ過後、420 nm における吸光度を測定した。標準物質として GlcN を用い、1 分間に 1 μmol のグルコサミンを生成する酵素量を 1 unit とした。

第 12 項 β-GlcNase によるオリゴ糖の分解

オリゴ糖溶液(10 mg/mL) 100 μL に 0.04 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5)およびβ-GlcNase (0.5 units/mL)をそれぞれ 50 μL 加え、37°C で 20 時間反応し、その後、10 分間の煮沸により反応を停止した。

第 13 項 薄層クロマトグラフィー(TLC)

TLC プレート(TLC aluminium sheets silica gel 60, Merck)に 0.5 M リン酸ナトリウム溶液を噴霧し、風乾した。105°C で 1 時間加熱後、TLC プレートにサンプルをスポットした。*n*-プロパノール、水および 30%アンモニアを 70 : 15 : 15 の割合で混合した展開溶媒を用い、上昇法により 3 回展開した。風乾後、ジフェニルアミン-アニリン試薬を噴霧し、再び風乾後、105°C で 15 分間

加熱し、各スポットを発色させた。

第 14 項 質量分析

質量分析は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(Matrix-assisted laser desorption ionization、MALDI、Karas *et al.*, 1987)を用い、飛行時間質量分析(time of flight mass spectrometry、TOF MS)により行った。質量分析計は、4800 plus MALDI TOF/TOF™ analyzer (AB SCIEX)を用いた。マトリックスとして、AF キトサナーゼ II の測定には、シナピン酸を 10 mg/mL となるように 0.1%トリフルオロ酢酸を含む 50%アセトニトリルに溶解し、オリゴ糖の測定には、2,5-ジヒドロキシ安息香酸を 10 mg/mL となるように 50%アセトニトリルに溶解したものを
用いた。

第3節 実験結果

第1項 AFキトサナーゼIIの精製

前節第2項に従い得られた粗酵素液は、0.05 M 酢酸緩衝液(pH 5.0)により平衡化したCM-Sephadex C-50 に供した(Fig. 2-1)。CM-Sephadex C-50 の結果、3つの活性画分が確認され、F-1、F-2 および F-3 として回収した。3つの画分のうちメインピークである F-2 を Sephadex G-100 に供した結果、キトサナーゼ活性と 280 nm の吸光度のピークは完全に一致したため(Fig. 2-2)、この活性画分を AFキトサナーゼIIとして以後の実験に用いた。以上の精製過程を Table 2-6 に示す。本酵素は、500 mL の培養ろ液から 14.2 mg 得られ、回収率は 39.3% で精製率は 1.16 倍だった。

SDS-PAGE および活性染色の結果、AFキトサナーゼIIは均一に精製されていることが確認された(Fig. 2-3)。SDS-PAGE の結果、本酵素の分子量は 23,500 と算出され、MALDI-TOF MS では、23,524 であった(Fig. 2-3A、Fig. 2-4)。さらに、N 末端アミノ酸配列決定を行った結果、N 末端アミノ酸配列は、YNLPNNLKQIYDKHKGKXSK であった。AFキトサナーゼIIのN末端アミノ酸配列を BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)によりホモロジー検索した結果、*Aspergillus* sp. CJ22-326 由来キトサナーゼ(Chen *et al.*,2005)と 95%の相同性を、*A. fumigatus* KB-1 由来キトサナーゼII (Emo and Lee, 2003)と 93%の相同性を、*A. fumigatus* Y2K 由来キトサナーゼ(Cheng and Li, 2000)と 90%の相同性を、*Aspergillus oryzae* IAM2660 由来キトサナーゼ(Zhang *et al.*,2000)と 85%の相同性を示したことから、*A. fumigatus* ATCC13073

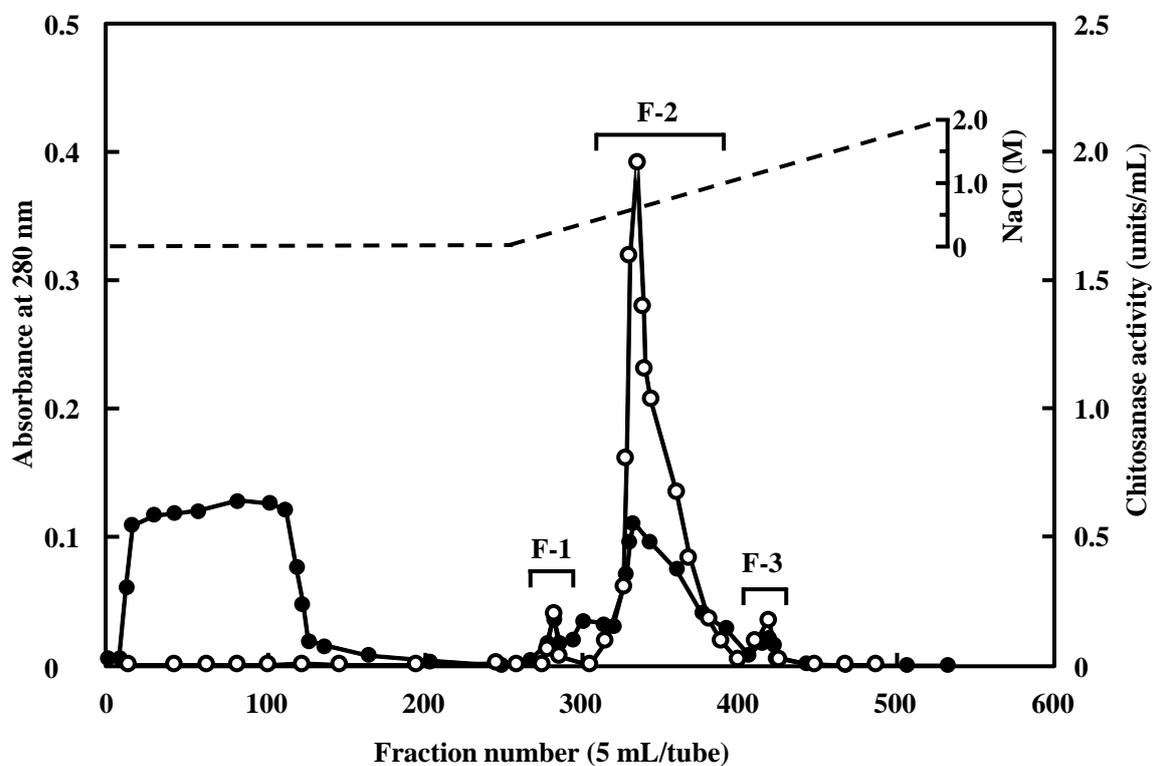


Fig. 2-1. Cation Exchange Chromatography of Chitosanases from *A. fumigatus* on CM-Sephadex C-50.

The experiment is described in the text. Symbols: ●, absorbance at 280 nm; ○, chitosanase activity, Line: ---, NaCl.

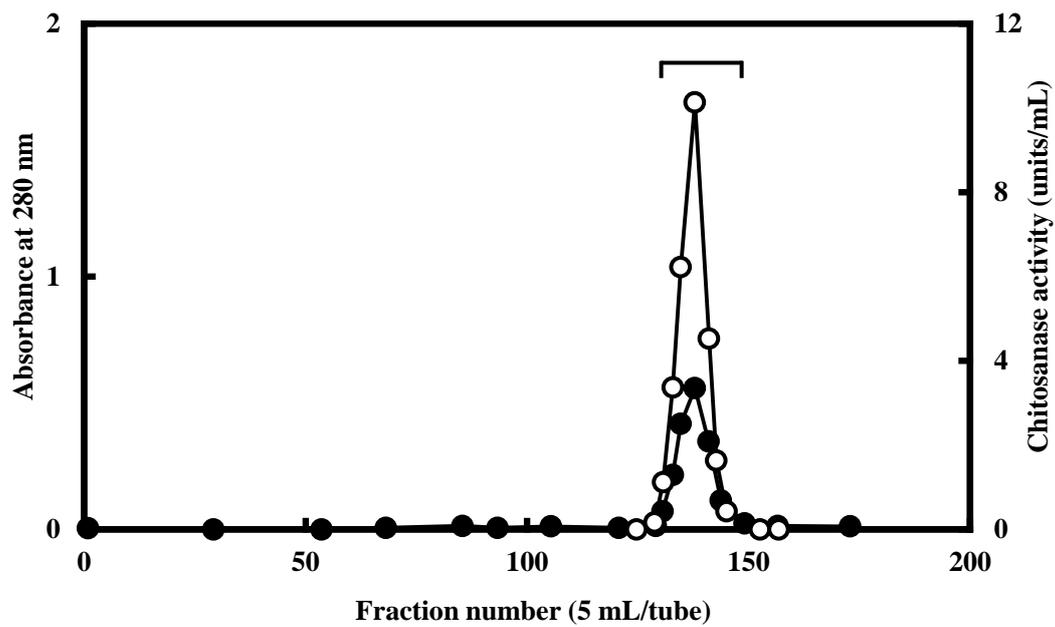


Fig. 2-2. Gel Filtration Chromatography of F-2 Fraction on Sephadex G-100.
 The experiment is described in the text. Symbols: ●, absorbance at 280 nm; ○, chitosanase activity.

Table 2-6. Purification of Chitosanase II from *A. fumigatus* ATCC13073

Step	Protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture filtrate	41.9	318	7.59	1.00	100
Dialysis	44.1	292	6.62	0.87	95.0
CM-Sephadex C-50	25.4	220	8.66	1.14	60.6
Sephadex G-100	14.2	125	8.80	1.16	39.3

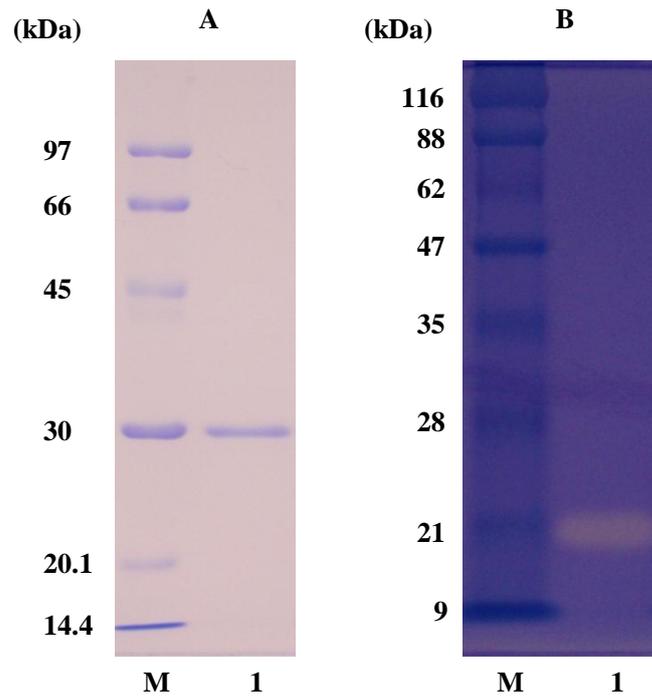


Fig. 2-3. SDS-PAGE (A) and Zymogram (B) of Purified Chitosanase II.

A, Lane M, molecular weight markers; lane 1, chitosanase II. B, Lane M, molecular weight markers; lane 1, chitosanase II.

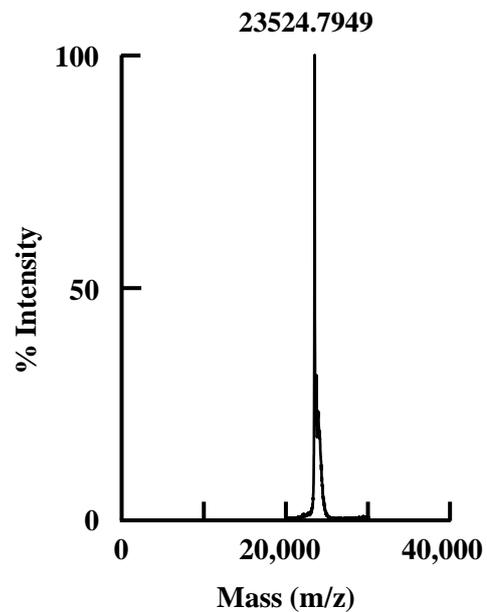


Fig. 2-4. MALDI-TOF MS Analysis of Chitosanase II.

由来キトサナーゼ II は糖質加水分解酵素ファミリー75 に属すると考えられる(Fig. 2-5)。

第 2 項 AF キトサナーゼ II の酵素化学的性質

(1) 至適 pH および pH 安定性

本章第 2 節第 7 項に従い、本酵素の至適 pH および pH 安定性を測定した(Fig. 2-6)。AF キトサナーゼ II は、pH 6.0 で最も高い活性を示した。また、pH 安定性を測定した結果、pH 1.0-9.0 の範囲において 90%以上の活性を保持し安定であった。

(2) 至適温度および温度安定性

前節第 8 項に従い、AF キトサナーゼ II の至適温度および温度安定性を測定した(Fig. 2-7)。その結果、本酵素は 40°C で最も高い活性を示し、30-60°C で処理したとき 80%以上の活性を保持していた。

(3) 基質特異性

AF キトサナーゼ II の基質特異性を検討した(Table 2-7)。AF キトサナーゼ II は、70%脱アセチル化されたキトサンに対して最も高い活性を示し、脱アセチル化度が上昇するにつれ活性は減少した。100%脱アセチル化されたキトサンに対する分解活性は、70%脱アセチル化されたキトサンの約 67%であった。また、キトサナーゼ II は、コロイダルキチンおよび CMC に対して分解活性を示さなかった。

<i>A. fumigatus</i> ATCC13073	YNLPNNLKQIYDKHK	-	GKXSK
<i>A. fumigatus</i> KB-1	YNLPNNLKQIYDKHK	-	GKXSX
<i>A. fumigatus</i> Y2K	YNLPNNLKQIYD	DHK	- - - - -
<i>A. oryzae</i> IAM2660	YDLPENLKQIYE	KHK	S GKCSK
<i>Aspergillus</i> sp. CJ22-326	YNLPNNLKQIYDKHK	-	GKCSK

Fig. 2-5. Sequence Similarity of the N-Terminal Domain of AF Chitosanase II with Other Chitosanases from *Aspergillus*. Amino acid residues identical to those of AF chitosanase II are indicated by a black back ground.

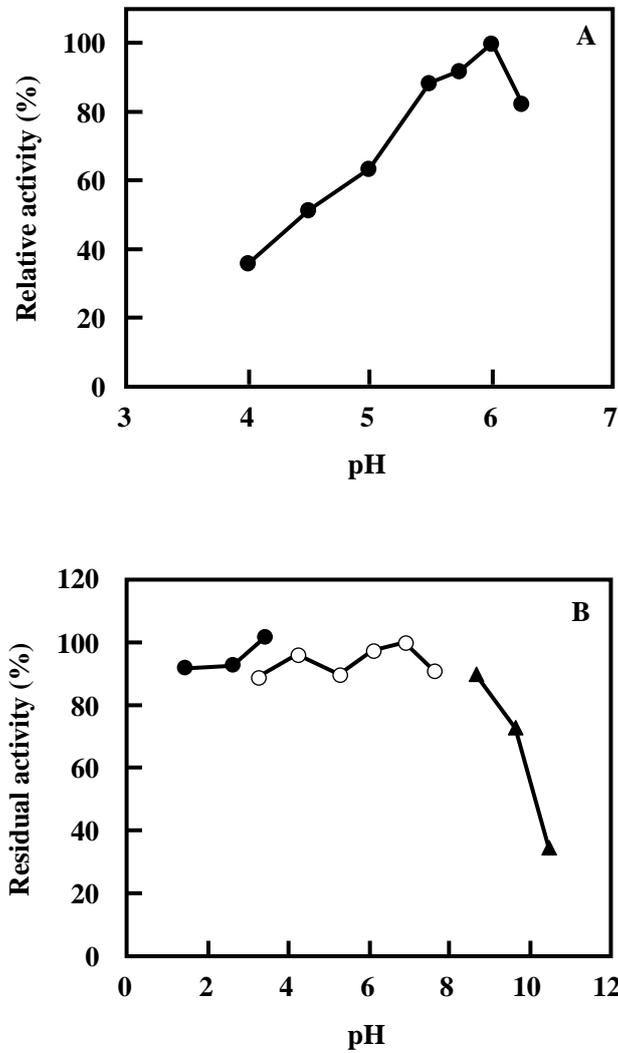


Fig. 2-6. Effects of pH on the Activity (A) and Stability (B) of Chitosanase II.

Symbols: ●, 0.1 M sodium citrate buffer (pH 1.0 to 3.0); ○, McIlvain's buffer (pH 3.0 to 8.0); ▲, Atkins and Pantin's buffer (pH 9.0 to 11.0).

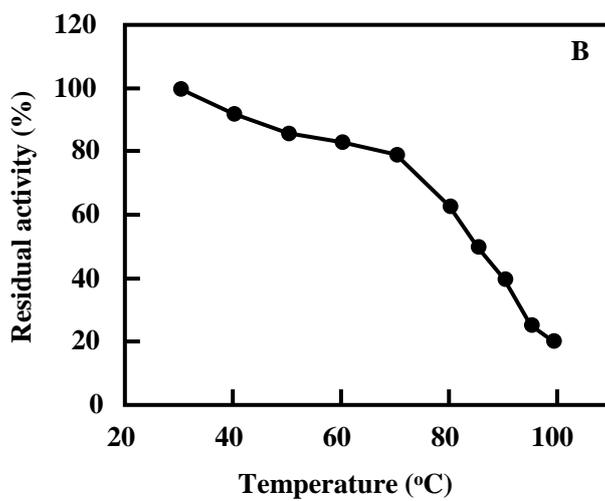
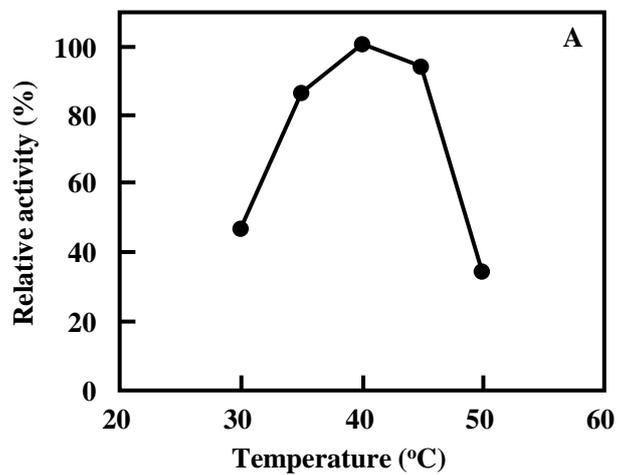


Fig. 2-7. Effects of Temperature on the Activity (A) and Stability (B) of Chitosanase II.

Table 2-7. Substrate Specificity of the Chitosanase

Substrate	Specific activity (units/mg)	Relative activity (%)
70% deacetylated chitosan	12.2	100
80% deacetylated chitosan	12.0	98.4
90% deacetylated chitosan	10.8	88.5
100% deacetylated chitosan	8.14	66.7
Colloidal chitin	0	0
CMC	0	0

第3項 AFキトサナーゼIIの切断特異性

AFキトサナーゼIIの部分*N*-アセチルキトサンに対する切断特異性を明らかにするために、AFキトサナーゼIIによるキトサン分解生成物の糖配列を決定した。キトサン分解溶液をCM-Sephadex C-25カラムに供した結果、F-1からF-7の7つの画分が得られた(Fig. 2-8)。得られた各画分は、電気透析、濃縮、凍結乾燥後、Bio-Gel P-4カラムに供した。その結果、ゲルろ過によりF-3以外は、単一ピークとして得られたがF-3は2つのピークが確認されたため、F-3-1およびF-3-2としてそれぞれ回収した。得られた画分についてTLCを行った結果、各画分は単一なスポットを示した(Fig. 2-9)。各画分についてMALDI-TOF MSを用いて質量分析を行った。F-3-2、F-5およびF-7をMALDI-TOF MSに供した結果、 $[M+Na]^+$ イオンの測定値は、363.1、524.3および685.3であり、キトビオース $[(GlcN)_2]$ 、キトトリオース $[(GlcN)_3]$ およびキトテトラオース $[(GlcN)_4]$ の $[M+Na]^+$ イオンの理論値、363.3、524.5および685.6と一致した。また、 β -GlcNaseによる各画分の分解物をTLCに供した結果、全ての画分でGlcNのみが検出された。以上の結果より、F-3-2、F-5およびF-7はそれぞれ $(GlcN)_2$ 、 $(GlcN)_3$ および $(GlcN)_4$ と同定した(Table 2-8)。また、F-1、F-2、F-4およびF-6の $[M+Na]^+$ イオンの測定値は、405.3、566.4、727.4および888.3であり、それぞれ、*N*-モノアセチルキトビオース、*N*-モノアセチルキトトリオース、*N*-モノアセチルキトテトラオースおよび*N*-モノアセチルキトペンタオースの $[M+Na]^+$ イオンの理論値である、405.4、566.5、727.7および888.8と一致した。また、F-1、F-2、F-4およびF-6は、 β -GlcNaseによりGlcNおよびGlcNAcに完全に分解されことから、F-1、F-2、F-4および

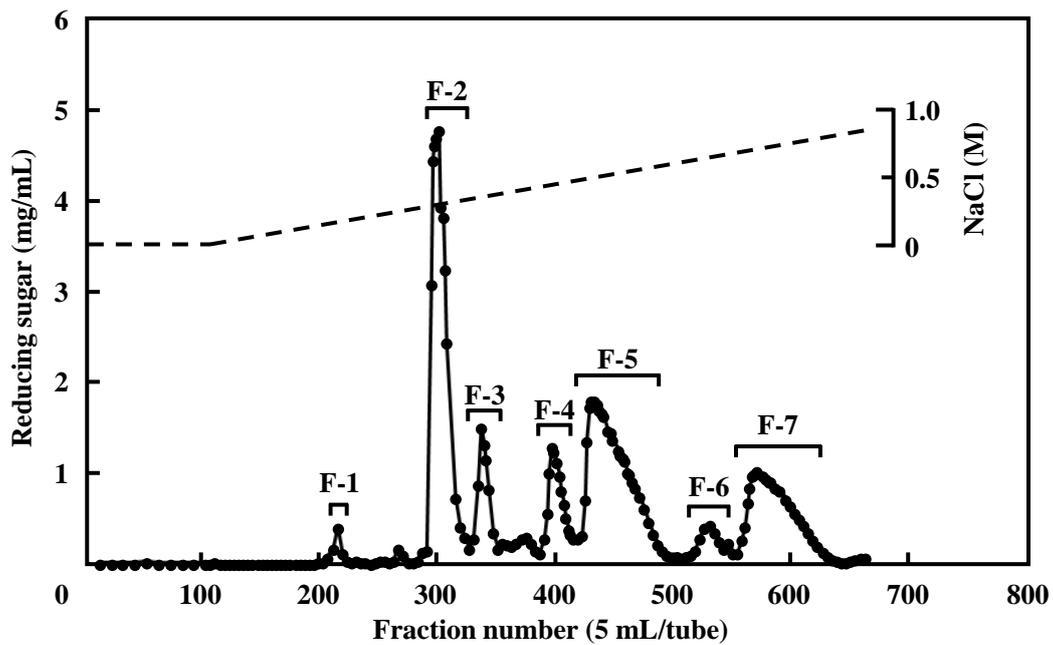


Fig. 2-8. CM-Sephadex C-25 Column Chromatography of Oligosaccharides Produced during the Hydrolysis of Partially *N*-Acetylated Chitosan by Chitosanase II.
 Symbols : ●, reducing sugar, Line: ---, NaCl.

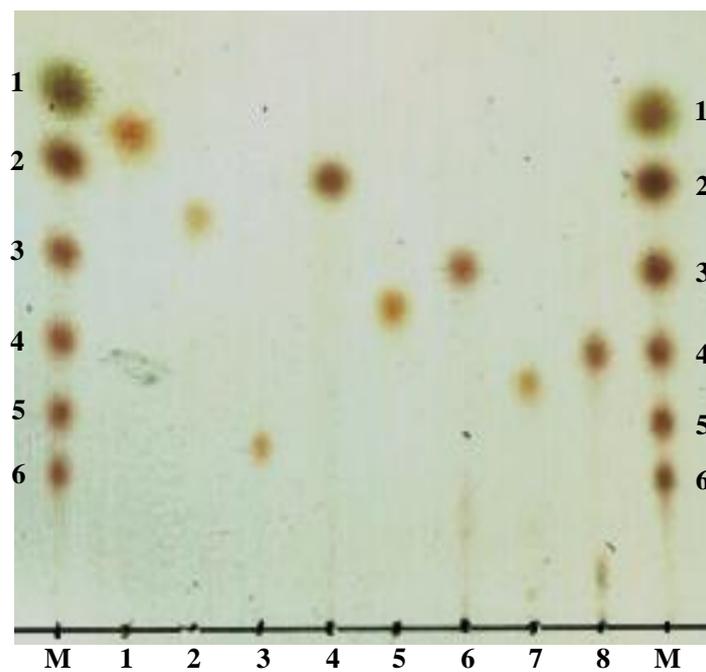


Fig. 2-9. TLC Analysis of the Products of 75% Deacetylated Chitosan Hydrolyzed by Chitosanase II.
Lane M, (GlcN)₁₋₆ STD; lane 1, F-1-1; lane 2, F-2;
lane 3, F-3-1; lane 4, F-3-2; lane 5, F-4; lane 6,
F-5; lane 7, F-6; lane 8, F-7.

Table 2-8. Oligosaccharides Produced in the Hydrolysis of Partially *N*-Acetylated Chitosan with AF Chitosanase II

Fraction	Chitoologosaccharides
F-1	●-Ø
F-2	●-●-Ø
F-3-2	●-●
F-4	●-●-●-Ø
F-5	●-●-●
F-6	●-●-●-●-Ø
F-7	●-●-●-●

● ; GlcN, ○ ; GlcNAc, ● and Ø ; Reducing end

F-6 は、還元末端に GlcNAc 残基を有することが示された。以上の結果から、F-1 は N^1 -モノアセチルキトビオース(GlcN-GlcNAc)、F-2 は N^1 -モノアセチルキトトリオース[(GlcN)₂-GlcNAc]、F-4 は N^1 -モノアセチルキトテトラオース[(GlcN)₃-GlcNAc]、F-6 は N^1 -モノアセチルキトペンタオース[(GlcN)₄-GlcNAc]と同定した。また、F-3-1 において、 β -GlcNase による分解物を HPLC に供した結果、複数のピークが確認されたため、重合度は同じであるが糖配列の異なった複数のオリゴ糖が混在していると考えられた。

AF キトサナーゼ II による部分 N -アセチルキトサン分解生成物の糖配列は、(GlcN)₂、(GlcN)₃、(GlcN)₄、GlcN-GlcNAc、(GlcN)₂-GlcNAc、(GlcN)₃-GlcNAc および(GlcN)₄-GlcNAc であり、還元末端に GlcN 残基または GlcNAc 残基を、非還元末端に GlcN 残基のみを有していた。これは、AFキトサナーゼ II が GlcN-GlcN 間および GlcNAc-GlcN 間を分解していることを示しており、本酵素の切断特異性は Subclass I に属することが明らかとなった。

第4節 考察

本章では、AF キトサナーゼ II の精製および酵素化学的性質の検討を行った。*A. fumigatus* ATCC13073 は、少なくとも3種のキトサナーゼを生産しており、その中で、最も多く生産されている AF キトサナーゼ II を CM-Sephadex C-50 による陽イオン交換クロマトグラフィーおよび Sephadex G-100 を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。SDS-PAGE および MALDI-TOF MS の結果、AF キトサナーゼ II の分子量は 23,500 であった。他の *Aspergillus* 属由来キトサナーゼの分子量は、約 23,000-29,000 と報告されており(Cheng and Li, 2000、Emo and Lee, 2003、Chen *et al.*, 2005)、本酵素の分子量は他の *Aspergillus* 属由来キトサナーゼの分子量と類似していた。また、N 末端アミノ配列を BLAST によりホモロジー検索した結果、GH-75 に属するキトサナーゼと高い相同性を示した。これまで報告されている真菌由来のキトサナーゼは全て GH-75 であることから、本酵素も GH-75 に属すると考えられる。次に酵素化学的性質について検討したところ、至適 pH は 6.0 で、他の GH-75 キトサナーゼ(Kim *et al.*, 2003、Emo and Lee, 2003、Chen *et al.*, 2005、Cheng and Li, 2000)と同様の至適 pH を示した。また、pH に対する安定性においては、pH 1.0 から pH 9.0 の範囲で 90%以上の活性を保持しており安定であった。一方、至適温度は 40 °C を示し、至適温度が 60-70 °C である他の *Aspergillus* 属由来キトサナーゼ(Kim *et al.*, 2003、Emo and Lee, 2003、Cheng and Li, 2000、Zhang *et al.*, 2001)に比べ低い値を示した。また、30-60 °C において安定だった。さらに、基質特異性を検討した結果、本酵素は、キトサン 7B (脱アセチル化度 70%)を最もよく分解し、脱アセチル化度が

上昇するにつれて活性が減少した。他の *Aspergillus* 属由来キトサナーゼ(Kim *et al.*, 1998、Cheng *et al.*, 2000、Eom *et al.*, 2003)は、100%脱アセチル化されたキトサンをよく分解するのに対し、AFキトサナーゼ II は 20-30%アセチル化したキトサンをよく分解した。同様の結果は、多くの微生物由来キトサナーゼでも報告されている(Yabuki *et al.*, 1988、Izume *et al.*, 1992、Uchida *et al.*, 1994、Zhang *et al.*, 2000、Tanabe *et al.*, 2003、Gao *et al.*, 2008)。キトサナーゼ活性に及ぼすアセチル基の影響についてはこれまであまり検討されてこなかった。しかしながら、自然界に存在するキチンおよびキトサンは、完全にアセチル化および脱アセチル化されておらず、20-30%アセチル化したキトサンをよく分解するという性質は、これらキチンおよびキトサンを微生物が分解資化するために有利に働いていると考えられる。また、キトサナーゼにはキトサン以外に CMC を分解する酵素が報告されている(Mitsutomi *et al.*, 1998、Tanabe *et al.*, 2003、Ike *et al.*, 2007、Gao *et al.*, 2008)。しかしながら、AFキトサナーゼ II は、コロイダルキチンおよび CMC に対して分解活性を示さなかったことから、キチナーゼ活性およびセルラーゼ活性を有していないことが分かった。

GH-75 に属するキトサナーゼの切断特異性に関する研究は少なく、Cheng ら(2006)の報告のみである。そこで GH-75 に属する AFキトサナーゼ II の切断特異性を検討するため、AFキトサナーゼ II による部分 *N*-アセチルキトサン分解生成物の糖配列を決定した。その結果、分解生成物の糖配列は、(GlcN)₂、(GlcN)₃、(GlcN)₄、GlcN-GlcNAc、(GlcN)₂-GlcNAc、(GlcN)₃-GlcNAc および(GlcN)₄-GlcNAc と同定された。これら分解生成物は、還元末端に GlcN 残基ま

たは GlcNAc 残基を有し、非還元末端には GlcN 残基のみを有していた。このことは、AF キトサナーゼ II が、部分 *N*-アセチルキトサン分子中の GlcN-GlcN 間および GlcNAc-GlcN 間を分解していることを示している。これは Subclass I キトサナーゼ(Fenton *et al.*, 1981、Fukamizo *et al.*, 1994、1995、Cheng *et al.*, 2006)の切断特異性と同様であることから、AF キトサナーゼ II の切断特異性は、Subclass I に属することが明らかとなった。また、Cheng ら(2006)の報告において、キトサン分解生成物として得られたヘテロキトオリゴ糖は、GlcN-GlcNAc、(GlcN)₂-GlcNAc および(GlcN)₃-GlcNAc であり、本酵素のキトサン分解生成物と非常によく似ていた。これら *N*¹-モノアセチルキトサンオリゴ糖[(GlcN)_n-GlcNAc]は、10S-24 キチナーゼ II によっても生成され、その構造から、キトサナーゼ研究における有用な基質になり得ると考えられる。

第3章 キトサナーゼによる *N*-モノアセチルキトサンオリゴ糖の分解様式

第1節 諸言

キトサナーゼは部分 *N*-アセチルキトサン分子中に含まれる GlcN-GlcN 間の β -1,4-グリコシド結合をエンド型で加水分解する。Subclass II に属するキトサナーゼ以外のキトサナーゼは、GlcNAc-GlcN 間あるいは GlcN-GlcNAc 間も分解する(Enzyme Nomenclature)。このように GlcN-GlcN 間を主に分解するキトサナーゼであるが、第2章で述べたように AF キトサナーゼ II は 100%脱アセチル化されたキトサンよりも 70%程度脱アセチル化されたキトサンをよく分解した。また、他の微生物由来のキトサナーゼにおいても完全に脱アセチル化されたキトサンよりも 20-30%程度アセチル化されたキトサンをよく分解することが報告されていることから、基質となるキトサンのアセチル基がキトサナーゼの加水分解反応に何らかの影響を与えていると思われる。キトサナーゼ活性に及ぼすアセチル基の影響を明らかにすることは、キトサナーゼの生物学的役割の解明や酵素を用いたキトオリゴ糖調製への応用に重要な知見を与えると考えられる。

一方、これまでのキトサナーゼに関する研究において、キトサナーゼ活性測定は、部分 *N*-アセチルキトサンを基質として用い、酵素分解により生成してくる還元糖量を Schales (1945)法などにより定量することで測定されている。この方法は、容易で感度も良好であるという利点をもっているが、キトサナーゼ研究者間により用いる基質が異なるため、活性を相対的に比較す

ることが困難である。基質として用いる可溶性のキトサンあるいは不溶性のコロイダルキトサンは、完全に脱アセチル化することが困難であり、部分的にアセチル化されている。そのため、それらの重合度、脱アセチル化度およびアセチル基の分布は、調製品ごとに異なっており、測定されたキトサナーゼ活性を相対的に比較できないため、キトサナーゼ研究の大きな障害になっている(Fig. 3-1)。また、キチナーゼも部分 *N*-アセチルキトサンを分解するため、部分 *N*-アセチルキトサンを基質として用いる測定法では、キチナーゼ活性とキトサナーゼ活性を厳密に区別することはできない。

本研究室において、部分 *N*-アセチルキトサンから酵素法により、還元末端にのみ **GlcNAc** 残基を有する N^1 -モノアセチルキトサンオリゴ糖[(GlcN)_n-GlcNAc、n=重合度]の製造法が開発された(光富, 2004)。すなわち、キトサンを均一系で *N*-アセチル化して得られた部分 *N*-アセチルキトサンの **GlcNAc-GlcNAc** および **GlcNAc-GlcN** 間を 10S-24 キチナーゼ II (Ueda and Arai, 1992)により特異的に加水分解する方法であり、生成した(GlcN)_n-GlcNAc は、陽イオン交換クロマトグラフィーを使用することにより、容易に単離できる。この方法により調製された(GlcN)_n-GlcNAc は、糖配列および重合度が明確であり、還元末端が **GlcNAc** でラベルされているため、切断様式の解明が容易となり、キトサナーゼ活性測定の基質として有用であると考えられる。また、N174 キトサナーゼは、(-3)(-2)(-1)(+1)(+2)(+3)からなる 6 つのサブサイト構造をもっており、(-1)(+1)間で基質を切断することが知られている(Boucher *et al.*, 1995)。他のキトサナーゼにおいても、6 糖から 3 糖を生成することから、同様のサブサイト構造をもっていると

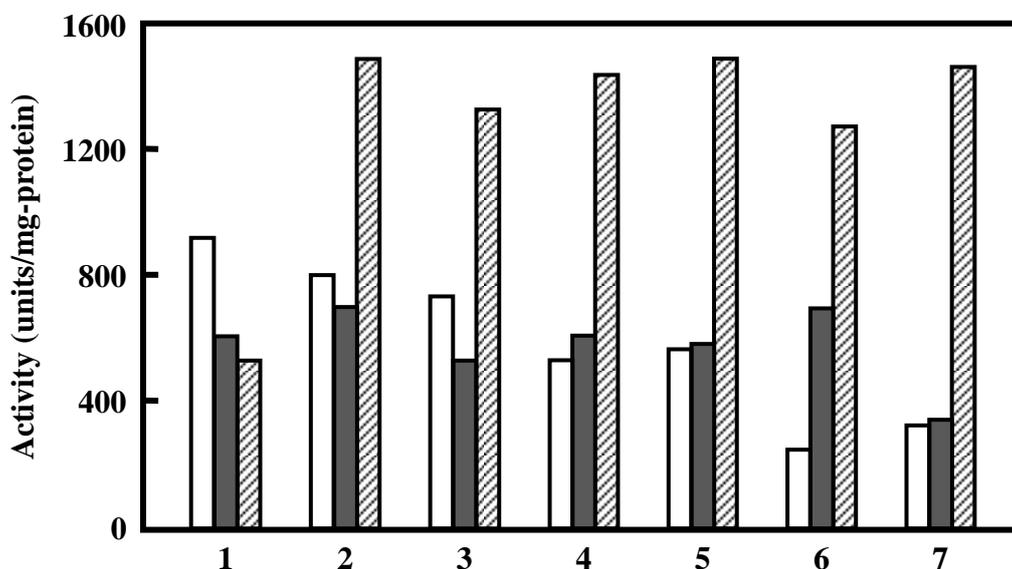


Fig. 3-1. Activity of Chitosanase toward Partially *N*-Acetylated Chitosan.
 The experimental details are described in “Materials and Methods.” 1, chitosan 7B (70% deacetylated, from shrimp, Funakoshi); 2, 75% deacetylated chitosan [Lot No. 60-10(4), from crab, Katakura Chikkarin]; 3, 75% deacetylated chitosan (Lot No. CTA10418, from crab, Katakura Chikkarin); 4, 80% deacetylated chitosan (Lot No. CTA020314, from crab, Funakoshi); 5, 92% deacetylated chitosan (Lot No. CTAW02824, from crab, Katakura Chikkarin); 6, 96% deacetylated chitosan (Lot No. CTA020314, from crab, Funakoshi); 7, chitosan 10B (100% deacetylated, from shrimp, Funakoshi). Symbols: ■, chitosanase from *A. fumigatus*; □, chitosanase from *Bacillus* sp. No.7-M; ▨, chitosanase from *Bacillus circulans* WL-12.

考えられる。キトサナーゼが(-3)(-2)(-1)(+1)(+2)(+3)からなる6つのサブサイト構造をもつことから、 N^1 -モノアセチルキトヘキサオース[(GlcN)₅-GlcNAc]およびキトヘキサオース[(GlcN)₆]のキトサナーゼによる分解活性を比較することにより、(+3)サイトにおけるアセチル基の影響を検討することができる考えた。

本章では、(GlcN)_n-GlcNAc を基質に用いたキトサナーゼ活性測定法の開発を試みた。さらに、AFキトサナーゼ II (Subclass I, Hirano *et al.*, 2012 a)、7Mキトサナーゼ(Subclass II, Izume *et al.*, 1992)およびMH-K1キトサナーゼ(Subclass III, Yabuki *et al.*, 1988)を用いて、キトヘキサオースの切断様式、切断頻度、(+3)サイトに対するアセチル基の影響について検討した。

第 2 節 実験材料および実験方法

第 1 項 実験材料

N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)は、生化学工業株式会社より購入した。キチンオリゴ糖 [(GlcNAc)_n, n=重合度]は焼津水産化学工業株式会社より供与された。還元キトオリゴ糖 [(GlcN)_n-GlcN^{ol}, n=重合度]は、各重合度のキトオリゴ糖[(GlcN)_n, n=重合度]を水素化ホウ素ナトリウムにより還元し調製した。*N*⁴-モノアセチルキトヘキサオース[(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₃]は、第 4 章第 2 節第 11 項に従い、CM-Sephadex C-25 カラムクロマトグラフィーにより得られた F-8 画分を Bio-Gel P-4 によるゲルろ過に供し、調製した。AF キトサナーゼ II (Hirano *et al.*, 2012 a)、7M キトサナーゼ(Uchida *et al.*, 1989)およびβ-GlcNase (Uchida *et al.*, 1994)は当研究室において調製し、MH-K1 キトサナーゼ(Yabuki *et al.*, 1988)は、千葉大学大学院 安藤昭一教授より恵与された。また、10S-24 キチナーゼ II 遺伝子を含む発現プラスミド pUC-*chi II* を保持した大腸菌である *E. coli* JM109/pUC-*chi II* は、大阪府立大学大学院 上田光宏准教授より恵与された。

第 2 項 部分 *N*-アセチルキトサンの調製

(1) 調製法

5%酢酸 120 mL にキトサン(脱アセチル化度 96%) 3 g を少量ずつ攪拌しながら加え一晩かけて溶解させた。キトサン溶液にメタノール 300 mL を加えた後、よく攪拌し 20°C に保温した。

その後、無水酢酸-メタノール溶液(0.364 mL:19.636 mL) 20 mL を加え、20°C で 24 時間反応させた。反応後、キトサン溶液は、1 M NaOH-メタノール(1:1)溶液 2.4 L に少量ずつ加え、再び 20°C で 24 時間反応させた。その後、遠心分離(12,000 g、20 分)し、沈殿を回収後、72 時間蒸留水で中性になるまで透析(透析用セルロースチューブ、三光純薬株式会社)した。その後、凍結乾燥し、デシケータ内に保存した。

(2) コロイド滴定法による脱アセチル化度の測定

調製した部分 *N*-アセチルキトサンの脱アセチル化度は、コロイド滴定法(千手, 1969)により測定した。まず、1/200 N 塩化セチルピリジニウム(CPC)を用いて 1/400 N ポリビニル硫化カリウム(PVSK)の力価を測定した。指示薬として、0.1%トルイシンブルーを用いた。その結果、1/400 N PVSK の力価は、1.095 だった。次に、本項(1)で調製したキトサン 0.1 g を精秤し 5%酢酸溶液を加え 20 g にし溶解させたものを、0.5%キトサン溶液とした。0.5%キトサン溶液 1 g を精秤し、30 mL 程度の蒸留水および 0.1%トルイシンブルー2-3 滴を加え、1/400 N PVSK により滴定した。得られた滴定量から脱アセチル化度を算出したところ、調製した部分 *N*-アセチルキトサンの脱アセチル化度は 75%であった。

第3項 *Aeromonas* sp. No.10S-24 由来キチナーゼ II の調製

アンピシリンを含む Luria Broth (LB)培地 20 mL に *E. coli* JM109/pUC-*chi II* を 1 コロニー植菌し、30°C、220 rpm で一晩培養し、前培養液とした。前培養液 5 mL を 500 mL の同培地に

植菌し、その後、30°C、220 rpm で OD₆₆₀ が 0.5 になるまで培養した。OD₆₆₀ が 0.5 になったところで終濃度 1 mM となるように IPTG を添加し、30°C、220 rpm で 21 時間培養した。本培養後、遠心分離(4°C、12,000 g、20 分)し、菌体を回収した。菌体は、10 mM EDTA を含む 0.1 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.0)で 2 回洗浄した。洗浄後、菌体を同緩衝液に懸濁し、超音波破碎後、遠心分離(4°C、20,000 g、10 分)し、上清を可溶性画分として回収した。得られた可溶性画分は、10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.5)を外液として 24 時間透析した。その後、遠心分離(4°C、20,000 g、10 分)し、上清を透析内液として回収した。透析内液は、10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.5)で平衡化した CM-Sephadex C-50 (カラムサイズ:2.6×25 cm、流速:32 mL/h)に供し、同緩衝液で未吸着画分を溶出後、0.5 M NaCl を含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)により溶出した。得られた活性画分をキチナーゼ II として以後の実験に用いた。

第 4 項 部分 *N*-アセチルキトサンオリゴ糖の調製

(1) 部分 *N*-アセチルキトサンの分解

本節第 2 項で調製した部分 *N*-アセチルキトサン(脱アセチル化度 75%) 2 g を 0.1 M 酢酸溶液 200 mL に溶解し、一晚攪拌した。その後、0.1 M 酢酸ナトリウムにより pH 4.0 に調整し、0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)を加え 400 mL にした。さらに、2 % アジ化ナトリウム溶液 4 mL を添加し、0.5%キトサン溶液とした。0.5%キトサン溶液 400 mL に、キチナーゼ II (2 units)を添加し、37°C で 3 日間反応させた後、さらに 2 units のキチナーゼ II を加え、3 日間反応させた(分

解率 40.6%)。その後、10 分間の煮沸により反応を停止し、得られた反応液を遠心分離(20,000 g、15 分間)した。上清を回収後、減圧濃縮および電気透析により脱塩し、その後、pH 5.0 に調整した。

(2) CM-Sephadex C-25 による陽イオン交換クロマトグラフィー

陽イオン交換体として CM-Sephadex C-25 を用いた。上記で調製した部分 *N*-アセチルキトサン分解物を 0.02 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)により平衡化した CM-Sephadex C-25 カラム(カラムサイズ:2.6×60 cm、流速:30 mL/h)に供し、同緩衝液で未吸着画分を溶出した。その後、0-2.0 M NaCl 直線濃度勾配により吸着画分の溶出を行った。得られた画分を減圧濃縮、脱塩後、凍結乾燥した。

(3) Bio-Gel P-6 によるゲルろ過

さらに精製が必要な画分に関しては 0.15 M 酢酸アンモニウム緩衝液(pH 5.0) 2 mL に溶解後、同緩衝液で平衡化した Bio-Gel P-6 カラム(カラムサイズ:2.6×197 cm、流速:30 mL/h)によるゲルろ過に供した。得られた画分は減圧濃縮、脱塩後、凍結乾燥した。

第 5 項 還元糖の定量

還元糖の定量には、Imoto と Yagishita (1971)による Schales (1945)法の改良法を用いた。糖溶液 1 mL に Schales 試薬(0.05%フェリシアン化カリウムを含む 0.5 M 炭酸ナトリウム溶液) 2 mL および蒸留水 0.5 mL を加え、15 分間煮沸した。冷却後、420 nm における吸光度を測定した。標準物質として GlcNAc を用いた。

第 6 項 キチナーゼ活性測定法

キチナーゼの活性は、基質として 0.5%コロイダルキチンを用い、酵素分解により生成してくる還元糖量を Schales 変法(Imoto and Yagishita, 1971)により測定し、算出した。基質 0.5 mL に McIlvaine 緩衝液(pH 4.0) 1.0 mL を混合し、37°C で 5 分間プレインキュベートした後、酵素溶液 0.5 mL を添加し、37°C で 10 分間反応を行った。5 分間の煮沸により反応を停止させ、ろ過後、得られたろ液の生成還元糖量を測定した。キチナーゼ活性 1 unit の定義は、1 分間に 1 μmol の GlcNAc に相当する還元糖を生成する酵素量とした。

第 7 項 キトサナーゼ活性測定法

基質としてキトサンを用いたときのキトサナーゼ活性は、第 2 章第 2 節第 4 項に従って行った。キトオリゴ糖を基質としたときのキトサナーゼ活性は、Elson-Morgan (1933)法の改良法である Rondle-Morgan (1955)法によりアミノ糖量を測定することで算出した。すなわち、4 mM 基質溶液 100 μL に緩衝液 50 μL を加え 5 分間プレインキュベートした後、50 μL の酵素液を添加し、37°C で 20 分間反応させた。その後、アセチルアセトン試薬 100 μL を加え 20 分間煮沸した。反応液を冷却後、エタノール 600 μL および Ehrlich 試薬 100 μL を加え 65°C で 10 分間加熱した。室温に戻した後、530 nm における吸光度を測定し、アミノ糖量を求めた。キトサナーゼ活性 1 unit の定義は、1 分間に 1 μmol のキトオリゴ糖に相当するアミノ糖を遊離する酵素量とした。

第 8 項 β -GlcNase 活性測定法

β -GlcNase の活性は、第 2 章第 2 節第 11 項に従い測定した。

第 9 項 β -GlcNase によるオリゴ糖の分解

キトオリゴ糖(20 mg/mL)100 μ L に、0.04 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5) 50 μ L および β -GlcNase (0.5 units/mL) 50 μ L を加え、37°C で 20 時間反応させた後、10 分間煮沸し反応を停止した。反応生成物は、TLC により分析した。

第 10 項 キトサナーゼによるキトヘキサオースの分解

4 mM キトヘキサオース 100 μ L に 0.04 M リン酸緩衝液(pH 5.5)およびキトサナーゼ(2 units)をそれぞれ 50 μ L 加えた。40°C で 20 分間反応後、5 分間煮沸し反応を停止した。反応液は、フィルター(Millex®-LG、Millipore)によりろ過し HPLC に供した。

第 11 項 薄層クロマトグラフィー(TLC)

TLC は第 2 章第 2 節第 13 項に従い行った。

第 12 項 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

HPLC システム(PU-2089 Plus ポンプ、ChomNAV データ処理装置、830-RI 検出器および

830-UV 検出器)は、日本分光株式会社製を用い、カラムは Shodex[®] NH2P-40 3E を使用した。

移動相として 73%アセトニトリルを用い RI および UV (210 nm)によりオリゴ糖の検出を行った。

第 13 項 質量分析

MALDI-TOF MS は第 2 章第 2 節第 15 項と同様に行った。

第3節 実験結果

第1項 N^1 -モノアセチルキトサンオリゴ糖[(GlcN)₁₋₅-GlcNAc]の調製

前節第4項(1)に従い部分 N -アセチルキトサンの分解を行った。得られたキトサン分解生成物を CM-Sephadex C-25 に供した結果、15 の画分が得られ、それぞれ F-1 から F-15 として回収した(Fig. 3-2)。次に、回収した各画分を TLC に供したところ、Fig. 3-3 のような結果が得られたため、さらに精製が必要な画分については Bio-Gel P-6 カラムによるゲルろ過を行った。その結果、F-8 および F-10 に関しては単一のピークとして得られたため、この回収画分をそれぞれ F-8 および F-10 とした。F-9、F-11、F-12、F-13、F-14 および F-15 は、2 つのピークが得られたため、それぞれ、F-9-1 および F-9-2、F-11-1 および F-11-2、F-12-1 および F-12-2、F-13-1 および F-13-2、F-14-1 および F-14-2、F-15-1 および F-15-2 として回収した。質量分析およびエキソグリコシダーゼ分解を行い、オリゴ糖の糖配列を決定した。Table 3-1 に示すように、還元末端にアセチル基をもつ N^1 -モノアセチルキトオリゴ糖(重合度 2-11)、還元末端および非還元末端にアセチル基をもつ N,N -ジアセチルキトオリゴ糖(重合度 4-6)を調製することができた。F-9-1 および F-9-2 に関しては構造を決定することができなかった。

第2項 Rondle-Morgan 法を用いた各種キトオリゴ糖の呈色

キトサンを基質として、生成還元糖量を Schales 法で測定する活性測定法は、簡易な方法ではあるが、基質として用いるキトサンの重合度、脱アセチル化度、アセチル基の分布が、調製

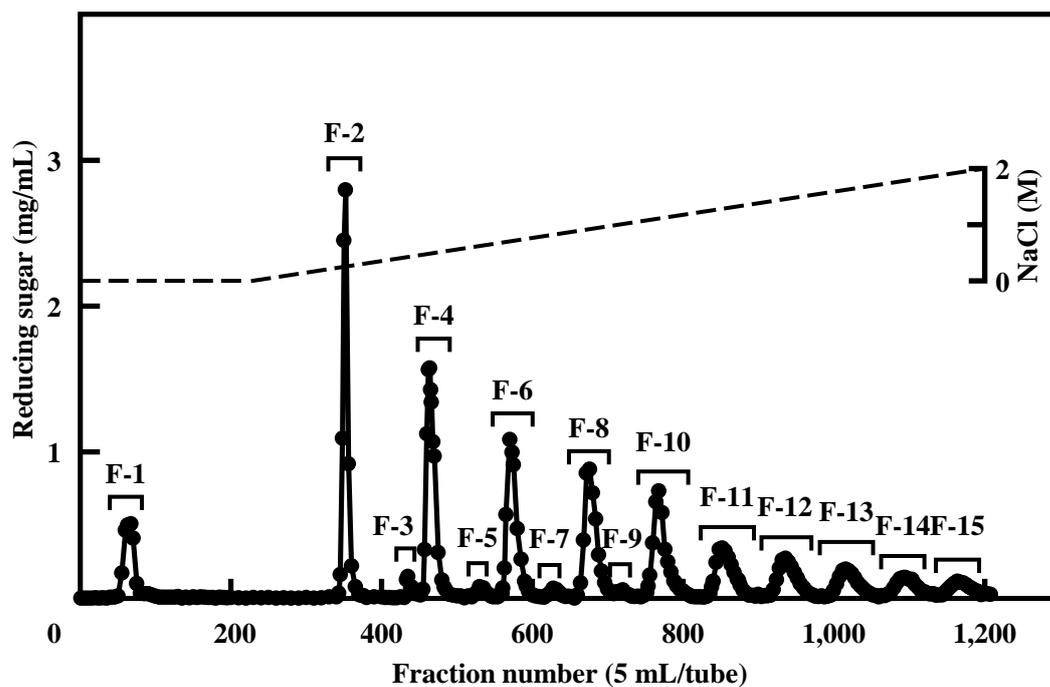


Fig. 3-2. CM-Sephadex C-25 Column Chromatography of Oligosaccharides Produced during the Hydrolysis of Partially *N*-Acetylated Chitosan by Chitinase II from *Aromonus* sp. No.10S-24.
Symbol: ●, reducing sugar; Line: ----, NaCl.

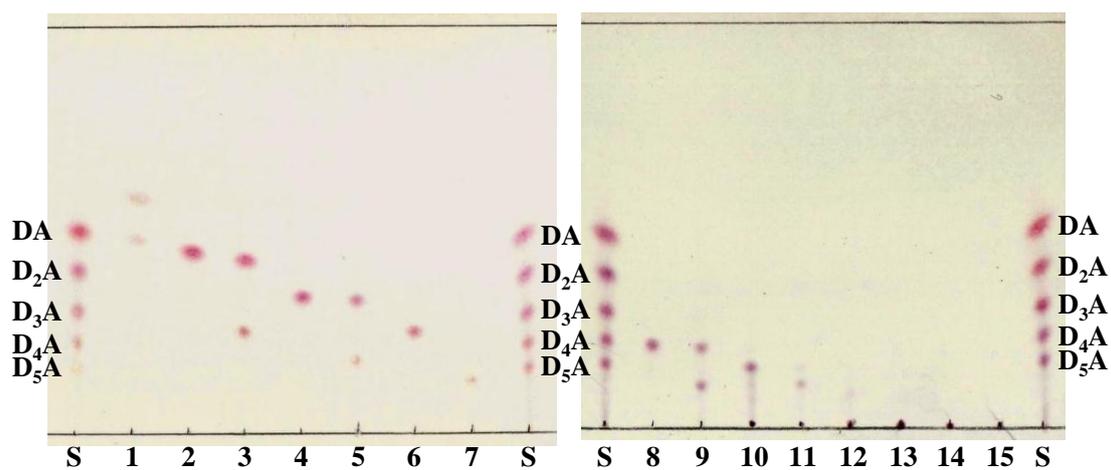


Fig. 3-3. TLC of Fractions F-1 to F-15 obtained from CM-Sephadex C-25 Column Chromatography.

The experimental details are described in “Materials and Methods.” Lane S, (GlcN)₁₋₅-GlcNAc as the standard; lanes 1 to 15 are F-1 to F-15. DA, GlcN-GlcNAc; D₂A, (GlcN)₂-GlcNAc; D₃A, (GlcN)₃-GlcNAc; D₄A, (GlcN)₄-GlcNAc; D₅A, (GlcN)₅-GlcNAc.

Table 3-1. MS Spectrometric Data for Oligosaccharides

Fraction	[M+Na] ⁺		Sugar Sequence
	Calculated	Measured	
F-1	244.2	244.1	A
F-2	405.4	405.2	DA
F-3	769.7	769.3	AD ₂ A
F-4	566.5	566.3	D ₂ A
F-5	930.9	930.4	AD ₃ A
F-6	727.7	727.4	D ₃ A
F-7	1092.0	1091.5	AD ₄ A
F-8	888.8	888.4	D ₄ A
F-10	1050.0	1049.6	D ₅ A
F-11-1	1211.1	1210.7	D ₆ A
F-12-1	1372.3	1371.8	D ₇ A
F-13-1	1533.5	1532.8	D ₈ A
F-14-1	1694.6	1693.9	D ₉ A
F-15-1	1855.7	1854.9	D ₁₀ A

D: GlcN, A: GlcNAc

品ごとに異なっており、測定されたキトサナーゼ活性を相対的に比較することは困難である。そこで、*N*¹-モノアセチルキトサンオリゴ糖がキトサナーゼ活性測定の基質として使用できるか検討するため、(GlcN)₁₋₆、(GlcN)_{1,5}-GlcNAc、(GlcNAc)₁₋₆ および(GlcN)_{1,5}-GlcN^{ol} を用い、Rondle-Morgan 法による、これらオリゴ糖に対する発色について検討した。

(1) グルコサミンオリゴ糖

(GlcN)₁₋₆ の呈色反応を行った(Fig. 3-4)。その結果、(GlcN)₁₋₆ 全てにおいて良好な検量線が得られた。また、鎖長が長くなるにつれ吸光度の減少がみられた(Fig. 3-4 A)。さらに、Fig. 3-4 B およびモル吸光係数(Table 3-2)より、構成糖の数よりもむしろ、還元末端の数に比例し発色することが分かった。また、GlcN は(GlcN)₂₋₆ よりも高いモル吸光係数を示した。このように、Rondle-Morgan 法が(GlcN)₁₋₆ に適用できることが分かった。

(2) *N*¹-モノアセチルキトオリゴ糖

還元末端を *N*-アセチル化した(GlcN)_{1,5}-GlcNAcを用いた時の検量線を、Fig. 3-5 に示した。(GlcN)_{1,5}-GlcNAc は還元末端に GlcNAc 残基を有するため、Rondle-Morgan 法により発色しないと予想されたが、Fig. 3-5 に示すように発色した。(GlcN)_{1,5}-GlcNAc のモル吸光係数を(GlcN)₁₋₆ のモル吸光係数と比較すると、それぞれの発色は、GlcN-GlcNAc は(GlcN)₂ の 1/4.82、(GlcN)₂-GlcNAc は(GlcN)₃ の 1/4.17、(GlcN)₃-GlcNAc は(GlcN)₄ の 1/5.27、(GlcN)₄-GlcNAc は(GlcN)₅ の 1/5.15、(GlcN)₅-GlcNAc は(GlcN)₆ の 1/6.46 であった(Table 3-2)。また、(GlcN)_{1,5}-GlcNAc においても2糖から6糖へと重合度が増加すると吸光度の減少が見られた。一方、モル吸光係数においては、(GlcN)₅-GlcNAc 以外のキトオリゴ糖でほとんど変化が見ら

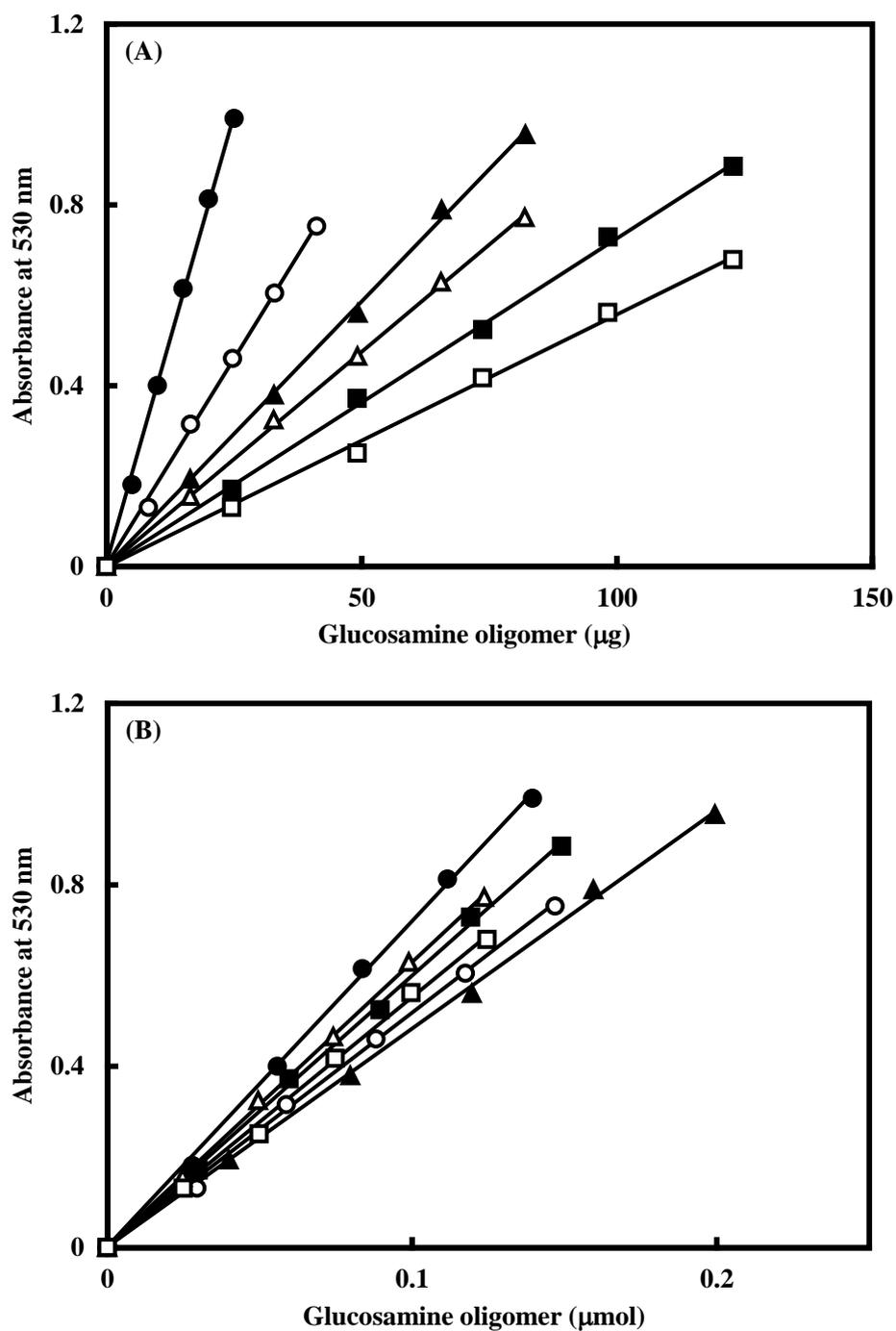


Fig. 3-4. Standard Curve for Glucosamine Oligomers.
 The experimental details are described in “Materials and Methods.” Symbols: ●, GlcN; ○, (GlcN)₂; ■, (GlcN)₃; □, (GlcN)₄; ▲, (GlcN)₅; △, (GlcN)₆.

Table 3-2. Molar Extinction Coefficient of Chitooligosaccharides

Chitooligosaccharide	Molar Extinction Coefficient
GlcN	7102.3
(GlcN) ₂	5125.3
(GlcN) ₃	4789.2
(GlcN) ₄	6241.5
(GlcN) ₅	5936.0
(GlcN) ₆	5448.8
GlcNAc	1295.5
(GlcNAc) ₂	695.0
(GlcNAc) ₃	651.1
(GlcNAc) ₄	524.4
(GlcNAc) ₅	588.1
(GlcNAc) ₆	595.4
GlcN-GlcNAc	1393.6
(GlcN) ₂ -GlcNAc	1526.3
(GlcN) ₃ -GlcNAc	1310.6
(GlcN) ₄ -GlcNAc	1230.5
(GlcN) ₅ -GlcNAc	871.0

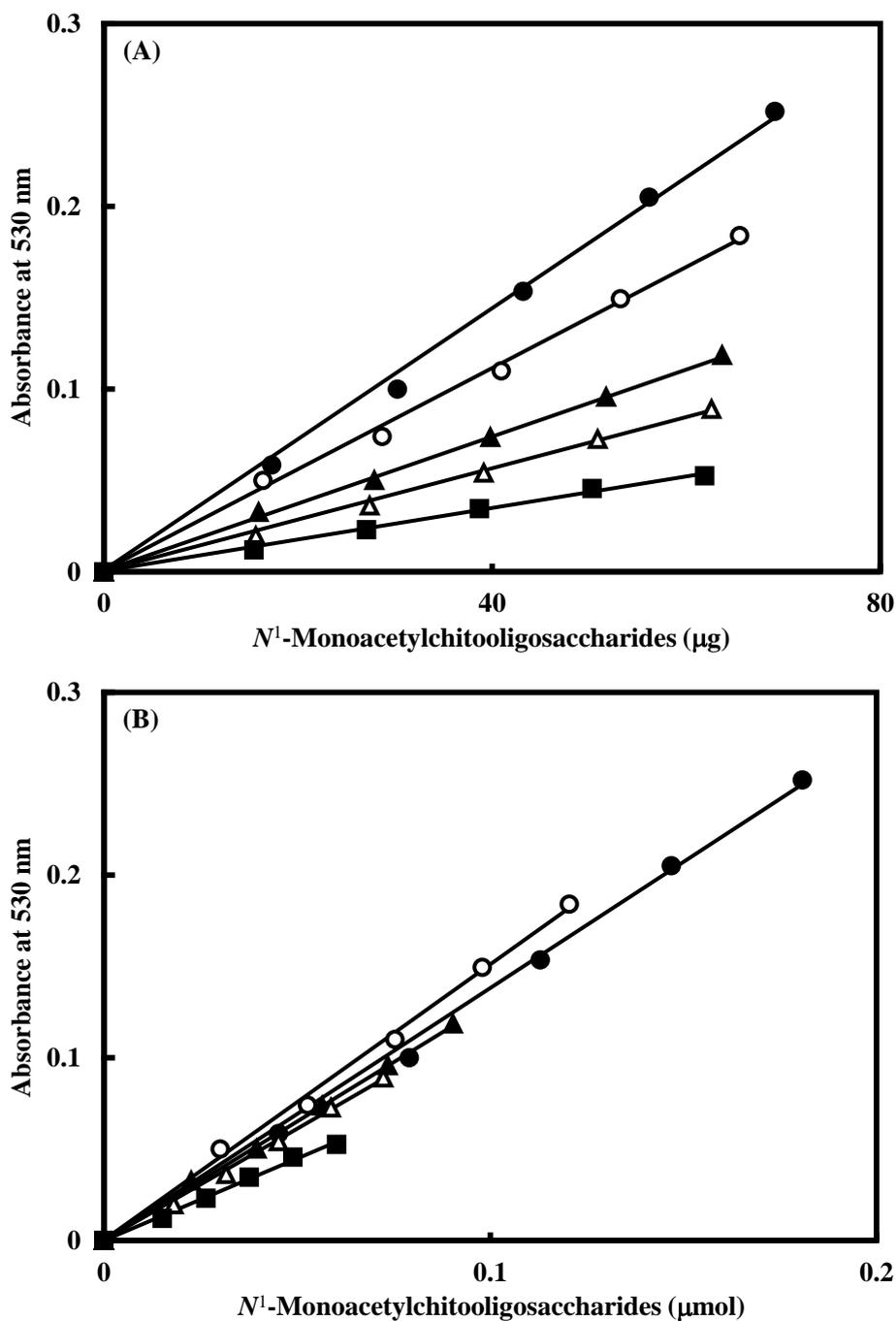


Fig. 3-5. Standard Curve for N^1 -Monoacetylchitooligosaccharide.
 The experimental details are described in “Materials and Methods.” Symbols: ●, GlcN-GlcNAc; ○, (GlcN)₂-GlcNAc; ▲, (GlcN)₃-GlcNAc; ■, (GlcN)₄-GlcNAc; □, (GlcN)₅-GlcNAc.

れなかった(Fig. 3-5 B、Table 3-2)。このことから、 $(\text{GlcN})_n\text{-GlcNAc}$ の発色は還元末端側の *N*-アセチルグルコサミン残基に由来するものと示唆された。

(3) *N*-アセチルグルコサミンオリゴ糖

N-アセチルグルコサミンオリゴ糖について呈色反応を行い、検量線を求めた結果、 $(\text{GlcNAc})_{1-6}$ は全て発色した(Fig. 3-6)。また、 $(\text{GlcNAc})_{1-6}$ と $(\text{GlcN})_{1-6}$ のモル吸光係数を比較したところ、 GlcNAc は GlcN の 1/5.96、 $(\text{GlcNAc})_2$ は $(\text{GlcN})_2$ の 1/8.44、 $(\text{GlcNAc})_3$ は $(\text{GlcN})_3$ の 1/9.02、 $(\text{GlcNAc})_4$ は $(\text{GlcN})_4$ の 1/11.45、 $(\text{GlcNAc})_5$ は $(\text{GlcN})_5$ の 1/11.99、 $(\text{GlcNAc})_6$ は $(\text{GlcN})_6$ の 1/8.82 の発色が見られた(Table 3-2)。また、グルコサミンオリゴ糖と同様に、重合度の大きさに比例し発色の低下が見られた。一方、モル吸光係数は、 GlcNAc が $(\text{GlcNAc})_{2-6}$ の約 2 倍の値を示したが、 $(\text{GlcNAc})_{2-6}$ においては、ほとんど変化が見られなかった。

(4) 還元キトオリゴ糖

還元キトオリゴ糖を Rondole-Morgan 法により呈色した結果、全て発色しなかった。これは、還元末端の C-1 位に存在する遊離のカルボニル基が呈色に重要であることを示している。

第 3 項 キトサナーゼによるキトオリゴ糖の分解

前項において、各キトオリゴ糖について良好な検量線が得られた。また、還元キトオリゴ糖に関しては、発色が見られなかったため、キトサナーゼ活性測定の基質として有用である可能性が示唆された。そこで、各種キトオリゴ糖を用い、AF キトサナーゼ II、7M キトサナーゼおよび MH-K1 キトサナーゼの活性を測定した。

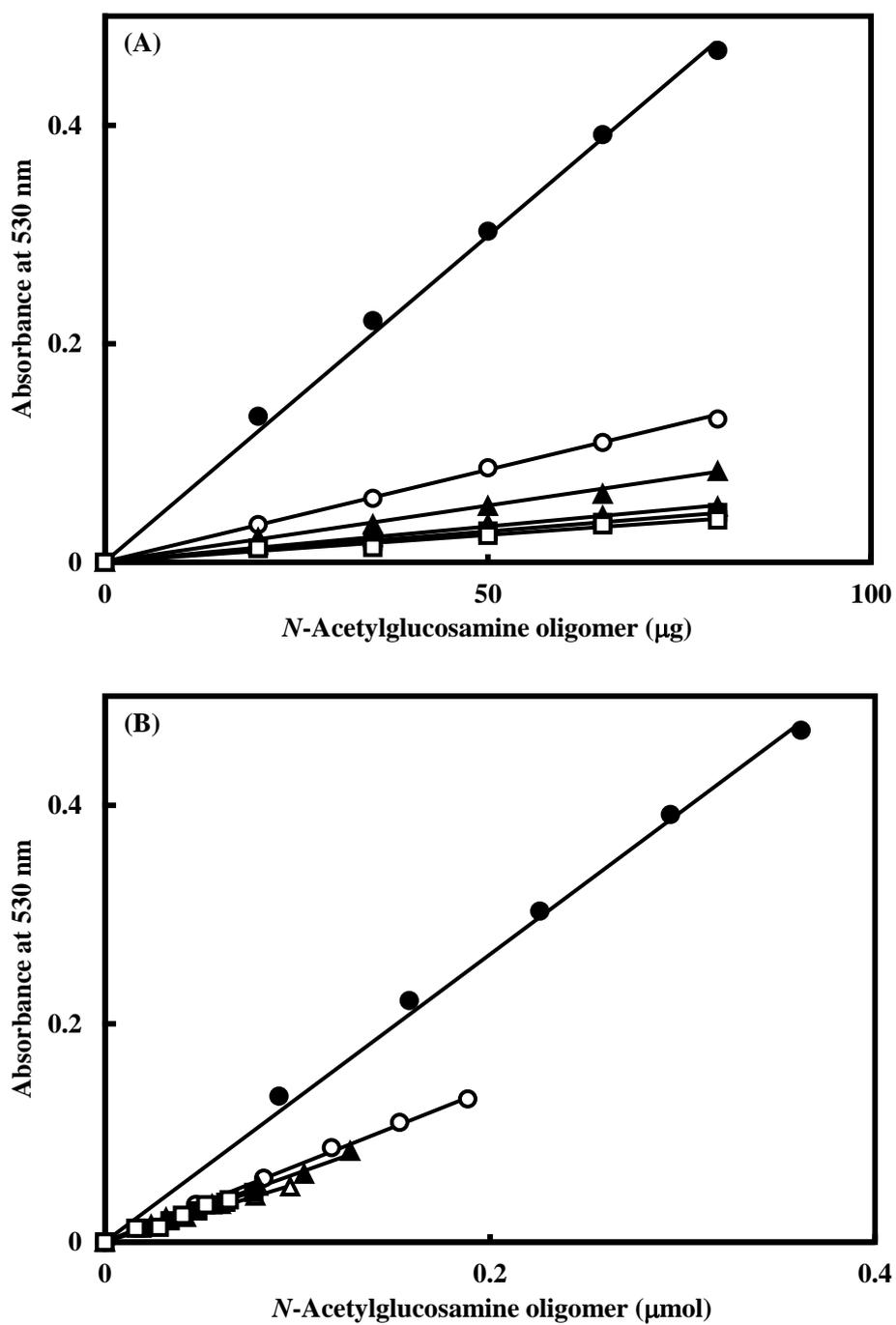


Fig. 3-6. Standard Curve for *N*-Acetylglucosamine Oligomers.

The experimental details are described in “Materials and Methods.”

Symbols: ●, GlcNAc; ○, (GlcNAc)₂; ■, (GlcNAc)₃; □, (GlcNAc)₄; ▲, (GlcNAc)₅; △, (GlcNAc)₆.

(1) AF キトサナーゼ II のキトオリゴ糖に対する作用

AF キトサナーゼ II により(GlcN)₂₋₆ を分解した結果、(GlcN)₂₋₄ は分解されず、(GlcN)₅ を (GlcN)₂ および(GlcN)₃ に、(GlcN)₆ を主に (GlcN)₃ に分解した(Fig. 3-7 A)。また、本酵素は、(GlcN)₁₋₃-GlcNAc を分解せず(Fig. 3-7 B)、(GlcN)₄-GlcNAc を、(GlcN)₃ および GlcN-GlcNAc あるいは(GlcN)₂ および(GlcN)₂-GlcNAc に分解した。(GlcN)₅-GlcNAc は、主に(GlcN)₃ と (GlcN)₂-GlcNAc に分解され、少量ではあるが(GlcN)₂ と(GlcN)₃-GlcNAc に分解された。この結果から、本酵素は、重合度 4 以上の基質を分解することが分かった。そこで、(GlcN)₄₋₆、(GlcN)₃₋₅-GlcNAc および(GlcN)₃₋₅-GlcN^{ol}を基質とし、AF キトサナーゼ II の活性を求めたところ、(GlcN)₅-GlcNAc を基質としたとき最も強い活性を示した(Table 3-3)。また、(GlcN)₄₋₆ および (GlcN)₃₋₅-GlcNAc は、重合度が増加するにしたがって活性が増加した。一方、(GlcN)₃-GlcN^{ol}、(GlcN)₄-GlcN^{ol} および(GlcN)₅-GlcN^{ol} に対しては、分解活性を示さなかった。(GlcN)₅-GlcNAc において最も強い活性を示したことは、(+3)サイトにアセチル基が何らかの影響をおよぼしていることを示唆している。そこで、アセチル基の影響について検討するため、(GlcN)₆ および (GlcN)₅-GlcNAc を基質として用い、基質濃度と反応速度の関係を Lineweaver-Burk の方法に従い作図し(Fig. 3-8)、それぞれの基質に対する速度パラメータを求めた(Table 3-4)。その結果、(GlcN)₅-GlcNAc および(GlcN)₆ を基質としたときの K_m 値はそれぞれ、 0.65 ± 0.1 mM および 1.20 ± 0.3 mM となった。これは、(GlcN)₅-GlcNAc のアセチル基により酵素-基質の親和性が約 2 倍上昇したことを示しており、キトサナーゼの(+3)サイトがアセチル基を認識していることを

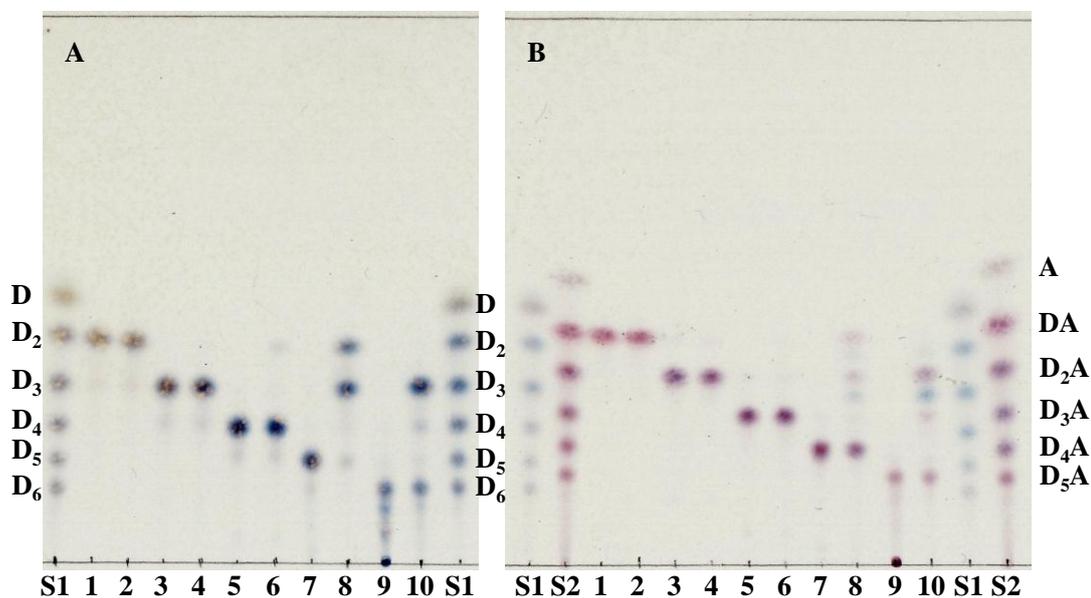


Fig. 3-7. TLC of the Hydrolysis Products of (GlcN)_n (A) and (GlcN)_n-GlcNAc (B) by Chitosanase II.

The experimental details are described in “Materials and Methods.” A, Lane S1, (GlcN)₁₋₆ as the standard; lanes 1, 3, 5, 7, and 9, unhydrolyzed substrates as controls, (GlcN)₂, (GlcN)₃, (GlcN)₄, (GlcN)₅, and (GlcN)₆, respectively; lanes 2, 4, 6, 8, and 10, enzymatic hydrolyzates of (GlcN)₂ to (GlcN)₆ respectively. B, Lane S1, (GlcN)₁₋₆ as standard; lane S2, GlcNAc and (GlcN)₁₋₅-GlcNAc as standard; lanes 1, 3, 5, 7, and 9, unhydrolyzed substrates as controls, GlcN-GlcNAc, (GlcN)₂-GlcNAc, (GlcN)₃-GlcNAc, (GlcN)₄-GlcNAc, and (GlcN)₅-GlcNAc, respectively; lanes 2, 4, 6, 8, and 10, enzymatic hydrolyzates of GlcN-GlcNAc to (GlcN)₅-GlcNAc respectively.

Table 3-3. Hydrolysis of Chitooligosaccharides with AF Chitosanase II

	Specific activity (units/mg)	Relative activity (%)
(GlcN) ₄	0	0
(GlcN) ₅	0.21	8.47
(GlcN) ₆	1.53	61.7
(GlcN) ₃ -GlcNAc	0	0
(GlcN) ₄ -GlcNAc	0.05	2.02
(GlcN) ₅ -GlcNAc	2.48	100
(GlcN) ₃ -GlcN ^{ol}	0	0
(GlcN) ₄ -GlcN ^{ol}	0	0
(GlcN) ₅ -GlcN ^{ol}	0	0

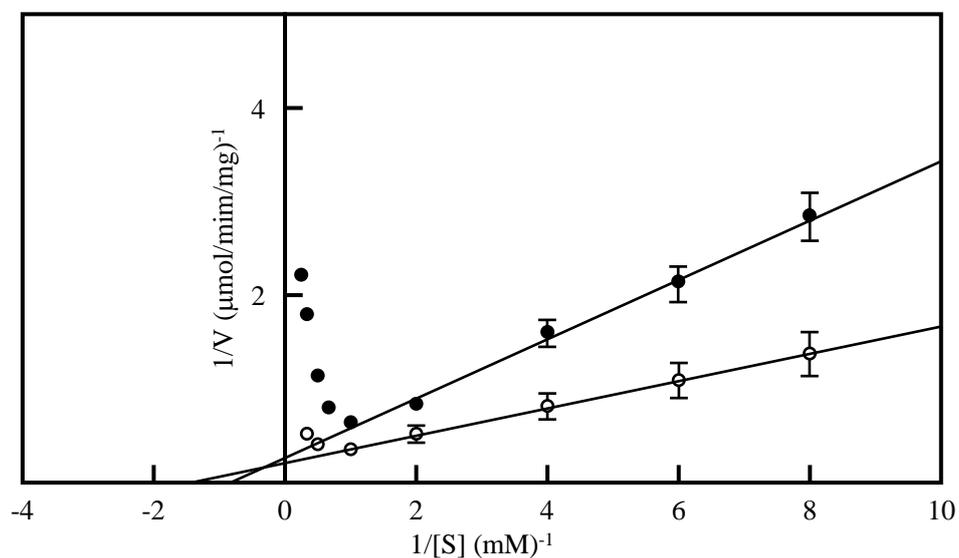


Fig. 3-8. Lineweaver-Burk Plots for the Hydrolysis of Hexasaccharides by Chitosanase II from *A. fumigatus*.
 The experiment is described in the text. Symbols: ●, (GlcN)₆; ○, (GlcN)₅-GlcNAc.

Table 3-4. Kinetic Parameters of AF Chitosanase II for Hydrolysis of Chitohexaose

	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\text{mM}$)
(GlcN) ₆	1.20 ± 0.3	3.74 ± 0.5	3.12 ± 1.0
(GlcN) ₅ -GlcNAc	0.65 ± 0.1	4.52 ± 0.5	6.96 ± 1.0

示唆している。また、(GlcN)₆を基質としたときの V_{\max}/K_m 値は $3.12 \pm 1.0 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\text{mM}$ であり、(GlcN)₅-GlcNAc を基質としたときは $6.96 \pm 1.0 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\text{mM}$ となり、触媒効率が上昇した。これらのことから、AF キトサナーゼによる(GlcN)₅-GlcNAc の分解活性が、(GlcN)₆ に比べ約 1.6 倍の値を示した原因は、(+3)サイトのアセチル基認識による親和性の上昇が起因となり触媒効率が増加したためと考えられる。このように、(+3)サイトのアセチル基の認識が AF キトサナーゼ活性に影響を与えていることが示唆された。

(2) 7M キトサナーゼのキトオリゴ糖に対する作用

7M キトサナーゼは、GlcN 残基が 5 つ以上連なったときに GlcN-GlcN 間を切断することが報告されている(Izume *et al.*, 1992)。そこで、重合度 4-6 のキトオリゴ糖を用い活性を測定した結果、重合度 5 以上のキトオリゴ糖を全て分解し、どのキトオリゴ糖に対しても 5 糖より 6 糖で高い活性を示した。また、(GlcN)₅-GlcNAc に対して最も強い活性を示した(Table 3-5)。7M キトサナーゼも AF キトサナーゼ II と同様に(GlcN)₅-GlcNAc に対して最も高い活性を示したことから、アセチル基が酵素活性に影響を与えていると考えられたため、(GlcN)₅-GlcNAc および (GlcN)₆ に対する速度パラメータを求めた(Fig. 3-9、Table 3-6)。その結果、7M キトサナーゼの K_m 値は (GlcN)₆ を基質としたとき $0.58 \pm 0.1 \text{ mM}$ 、(GlcN)₅-GlcNAc を基質としたとき $0.41 \pm 0.1 \text{ mM}$ となり、(GlcN)₅-GlcNAc は(GlcN)₆ と比較し約 1.4 倍の親和性を示した。また、 V_{\max} 値は (GlcN)₅-GlcNAc および(GlcN)₆ を基質としたとき、それぞれ $34.5 \pm 2.5 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ および $34.1 \pm 2.0 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ とほぼ変わらない値であった。 V_{\max}/K_m 値は、(GlcN)₅-GlcNAc において

Table 3-5. Hydrolysis of Chitoooligosaccharides with 7M Chitosanase

	Specific activity (units/mg)	Relative activity (%)
(GlcN) ₄	0	0
(GlcN) ₅	2.64	25.0
(GlcN) ₆	7.67	72.6
(GlcN) ₃ -GlcNAc	0	0
(GlcN) ₄ -GlcNAc	1.11	10.5
(GlcN) ₅ -GlcNAc	10.56	100
(GlcN) ₃ -GlcN ^{ol}	0	0
(GlcN) ₄ -GlcN ^{ol}	0.79	7.48
(GlcN) ₅ -GlcN ^{ol}	7.55	71.5

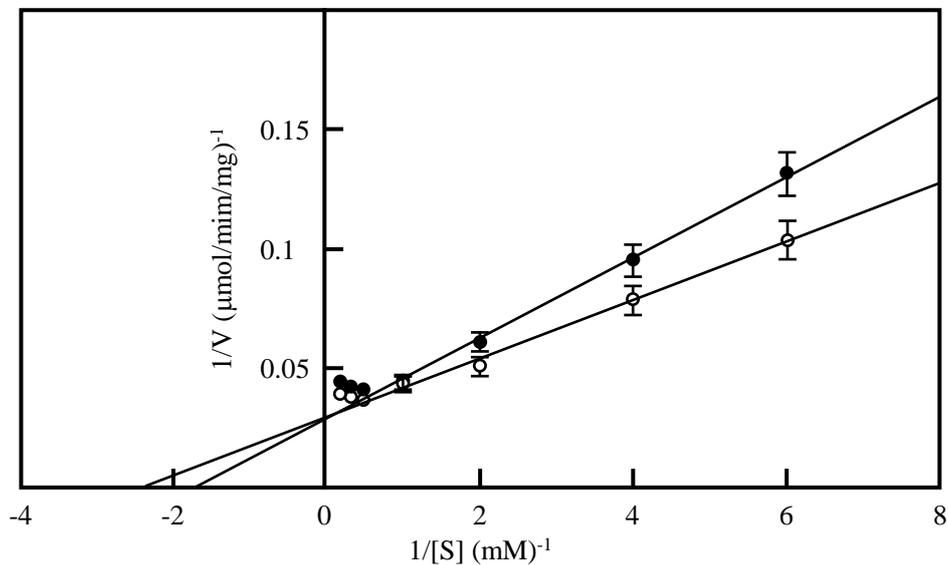


Fig. 3-9. Lineweaver-Burk Plots for the Hydrolysis of Hexasaccharides by Chitosanase from *Bacillus* sp. No.7-M.
 The experiment is described in the text. Symbols: ●, (GlcN)₆; ○, (GlcN)₅-GlcNAc.

Table 3-6. Kinetic Parameters of 7M Chitosanase for Hydrolysis of Chitohexaose

	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\text{mM}$)
(GlcN) ₆	0.58 ± 0.1	34.5 ± 2.5	59.5 ± 5.5
(GlcN) ₅ -GlcNAc	0.41 ± 0.1	34.1 ± 2.0	83.2 ± 3.5

83.2±3.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\text{mM}$ となり、(GlcN)₆を基質としたときに比べ約 1.4 倍になった。この結果から、7M キトサナーゼにおいても(+3)サイトのアセチル基認識による親和性の上昇が触媒効率の上昇に関与していると示唆された。

(3) MH-K1 キトサナーゼのキトオリゴ糖に対する作用

MH-K1 キトサナーゼは、重合度 4 以上のグルコサミンオリゴ糖を分解することが示されている(Yabuki *et al.*, 1988)。そこで、重合度 4-6 糖のキトオリゴ糖を基質とし活性を測定した。その結果、(GlcN)₃-GlcNAc 以外の基質で分解が見られた(Table 3-7)。また、MH-K1 キトサナーゼも重合度に比例して活性が増加し、(GlcN)₅-GlcN^{ol} に対して最も強い活性を示した。さらに、MH-K1 キトサナーゼにおいても、(GlcN)₅-GlcNAc を基質としたとき、(GlcN)₆に比べ約 1.8 倍の活性を示し、アセチル基認識による触媒活性の増加が示唆された。Lineweaver-Burk プロットにより速度パラメータを求めた結果(Fig. 3-10)、(GlcN)₅-GlcNAc および(GlcN)₆を基質としたとき、それぞれ 0.29±0.08 mM および 1.12±0.3 mM の K_m 値を示し、アセチル基認識により親和性が約 3.9 倍に上昇した (Table 3-8)。一方、 V_{max} 値は(GlcN)₅-GlcNAc および(GlcN)₆において変わらない値だったことから、触媒効率の上昇は、他のキトサナーゼと同様に還元末端に存在する GlcNAc による酵素-基質の親和性の上昇が要因であると考えられた。

第 4 項 AF キトサナーゼ II の(-1)サイトにおけるアセチル基認識

前項において、AFキトサナーゼ II、7MキトサナーゼおよびMH-K1キトサナーゼの(+3)サイ

Table 3-7. Hydrolysis of Chitooligosaccharides with MH-K1 Chitosanase

	Specific activity (units/mg)	Relative activity (%)
(GlcN) ₄	7.36	10.8
(GlcN) ₅	23.1	33.8
(GlcN) ₆	33.1	48.5
(GlcN) ₃ -GlcNAc	0	0
(GlcN) ₄ -GlcNAc	49.4	72.3
(GlcN) ₅ -GlcNAc	58.3	85.4
(GlcN) ₃ -GlcN ^{ol}	7.7	11.3
(GlcN) ₄ -GlcN ^{ol}	10.2	14.9
(GlcN) ₅ -GlcN ^{ol}	68.3	100

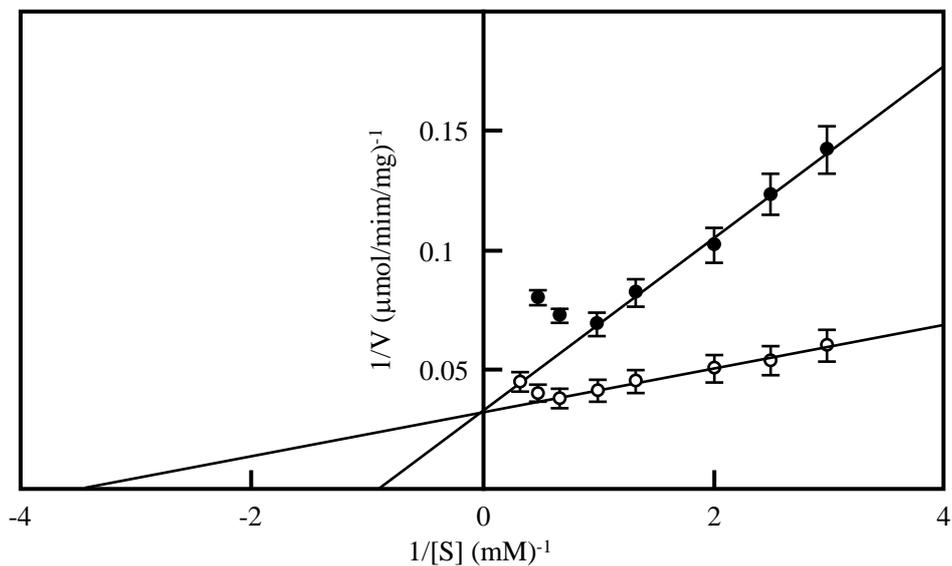


Fig. 3-10. Lineweaver-Burk Plots for the Hydrolysis of Hexasaccharides by Chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1.
 The experiment is described in the text. Symbols: ●, (GlcN)₆; ○, (GlcN)₅-GlcNAc.

Table 3-8. Kinetic Parameters of MH-K1 Chitosanase for Hydrolysis of Chitohexaose

	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\text{mM}$)
(GlcN) ₆	1.12 ± 0.3	15.3 ± 2.5	13.7 ± 4.0
(GlcN) ₅ -GlcNAc	0.29 ± 0.08	15.6 ± 5.0	53.8 ± 10.0

トの GlcNAc 残基に対する親和性が、GlcN 残基に対する親和性よりも高いことにより、触媒効率が上昇することが示された。このことが、現在報告されている多くのキトサナーゼが 20-30% 程度アセチル化されたキトサンをよく分解する要因であると考えられる。AF キトサナーゼ II は Subclass I キトサナーゼであり、キトサン分子中の GlcN-GlcN 間および GlcNAc-GlcN 間を切断することから、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₃ を基質に用い、AF キトサナーゼ II の(-1)サイトにおけるアセチル基の影響について検討した。(GlcN)₆ および(GlcN)₅-GlcNAc と同様に、Lineweaver-Burk プロットからそれぞれの基質に対する速度パラメータを求めた(Fig. 3-11、Table 3-9)。(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₃ を基質としたときの K_m 値および V_{max} 値は、それぞれ 7.99 ± 1.5 mM および 3.1 ± 0.7 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ となった。AF キトサナーゼ II は Subclass I の切断特異性を示すことから、(-1)サイトでアセチル基を認識していると考えられたが、今回の結果から、(-1)サイトは GlcNAc 残基よりもむしろ、GlcN 残基に対し高い親和性を示した。本酵素において、アセチル基の影響による部分 *N*-アセチルキトサンの分解活性の上昇は、活性中心よりもそれ以外のサブサイトが関与していることを示した。

第 5 項 各種キトサナーゼによる(GlcN)₅-GlcNAc の分解様式

(GlcN)₅-GlcNAc は、還元末端がラベルされており、切断箇所を容易に判断できるだけでなく、210 nm における吸光度を測定することにより分解生成物を感度よく検出をすることができる。そこで、(GlcN)₅-GlcNAc を用い、その分解生成物を HPLC に供し分離定量することにより、基

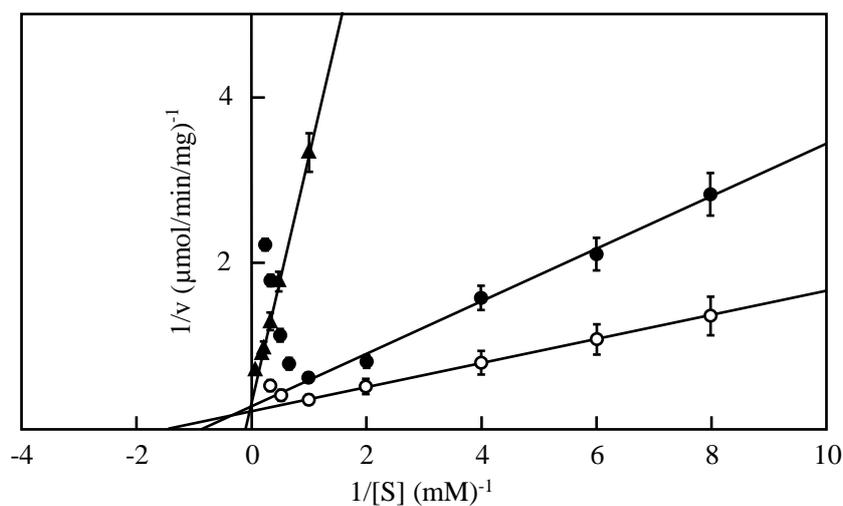


Fig. 3-11. Lineweaver-Burk Plots for the Hydrolysis of (GlcN)₆, (GlcN)₅-GlcNAc, and (GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₃ by AF Chitosanase II. The experiment is described in the text. Symbols: ●, (GlcN)₆; ○, (GlcN)₅-GlcNAc; ▲, (GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₃.

Table 3-9. Kinetic Parameters of Chitosanase II for the Hydrolysis of Hexasaccharides

	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\text{mM}$)
(GlcN) ₆	1.20 ± 0.3	3.74 ± 0.5	3.12 ± 1.0
(GlcN) ₅ -GlcNAc	0.65 ± 0.1	4.52 ± 0.5	6.96 ± 1.0
(GlcN) ₂ -GlcNAc-(GlcN) ₃	7.99 ± 1.5	3.10 ± 0.7	0.39 ± 1.0

質の切断箇所と切断頻度について検討した。

(1) AF キトサナーゼ II によるキトヘキサオースの分解

AF キトサナーゼ II を(GlcN)₆ および(GlcN)₅-GlcNAc に作用させ、その分解生成物を HPLC により分析した。その結果、(GlcN)₆ を基質としたとき非還元末端から 3 番目および、2 番目あるいは 4 番目の結合を、それぞれ、93% および 7% の頻度で切断した(Fig. 3-12 A、C)。一方、(GlcN)₅-GlcNAc を基質としたとき、非還元末端から 2 番目、3 番目および 4 番目の結合を、それぞれ、19.8%、78.1% および 2.1% の頻度で切断した(Fig. 3-12 A、C)。

(2) 7M キトサナーゼによるキトヘキサオースの分解

7M キトサナーゼの(GlcN)₆ に対する切断頻度は、非還元末端から 3 番目および、2 番目あるいは 4 番目が、それぞれ、64.6% および 35.4% であった(Fig. 3-13 A、C)。(GlcN)₅-GlcNAc では、非還元末端から 2 番目、3 番目および 4 番目の結合を、それぞれ、9.1%、86.2% および 4.7% の頻度で切断した(Fig. 3-13 B、C)。

(3) MH-K1 キトサナーゼによるキトヘキサオースの分解

MH-K1 キトサナーゼは、(GlcN)₆ の非還元末端から 3 番目および、2 番目あるいは 4 番目を、それぞれ、37.4% および 62.6% の頻度で切断した (Fig. 3-14 A、C)。また、(GlcN)₅-GlcNAc の非還元末端から 2 番目、3 番目および 4 番目の結合を、それぞれ、86.9%、10.9% および 2.2% の頻度で切断した(Fig. 3-14 B、C)。

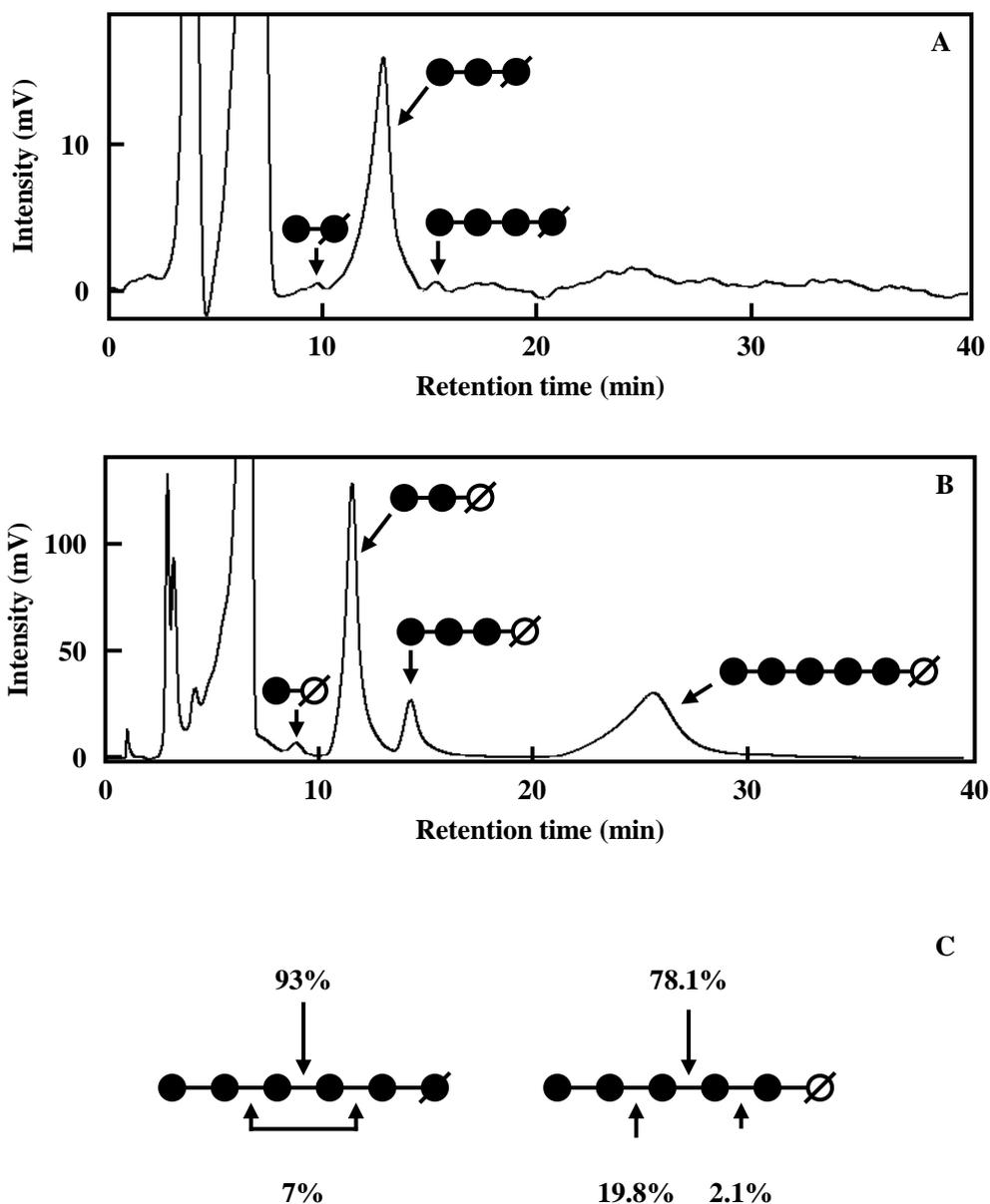


Fig. 3-12. HPLC pattern of the Hydrolysates of Chitohexaose (A) and Mono-N-acetylchitohexaose (B) by AF Chitosanase II and Their Frequency of Hydrolysis (C).

A, degradation products were detected by RI detector. B, degradation products were detected by UV detector (210 nm). Symbol: ●, GlcN; ○, GlcNAc; ● and ∅, reducing end of oligosaccharide.

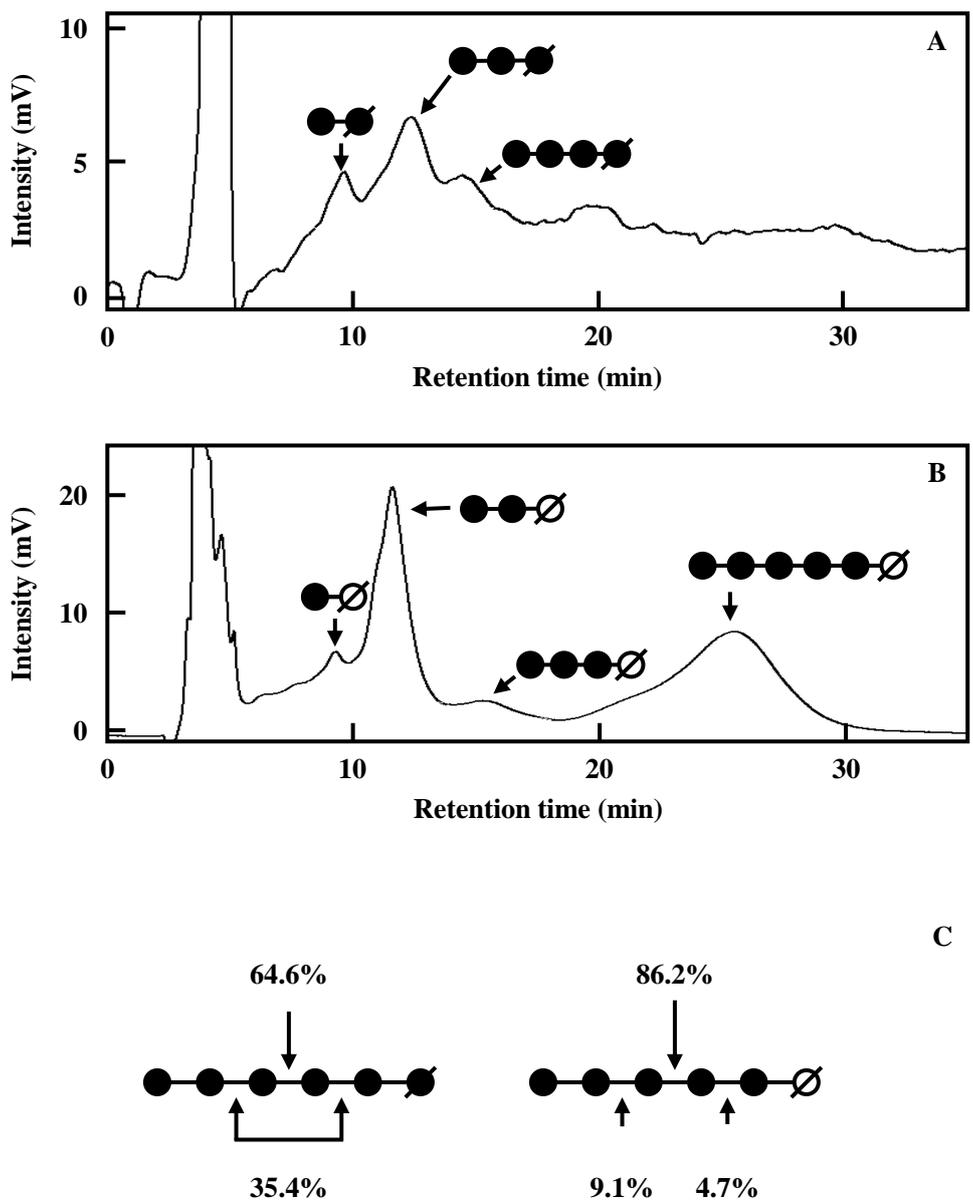


Fig. 3-13. HPLC pattern of the Hydrolysates of Chitohexaose (A) and Mono-N-acetylchitohexaose (B) by 7M Chitosanase and Their Frequency of Hydrolysis (C). A, degradation products were detected by RI detector. B, degradation products were detected by UV detector (210 nm). Symbols are as in Fig. 3-12.

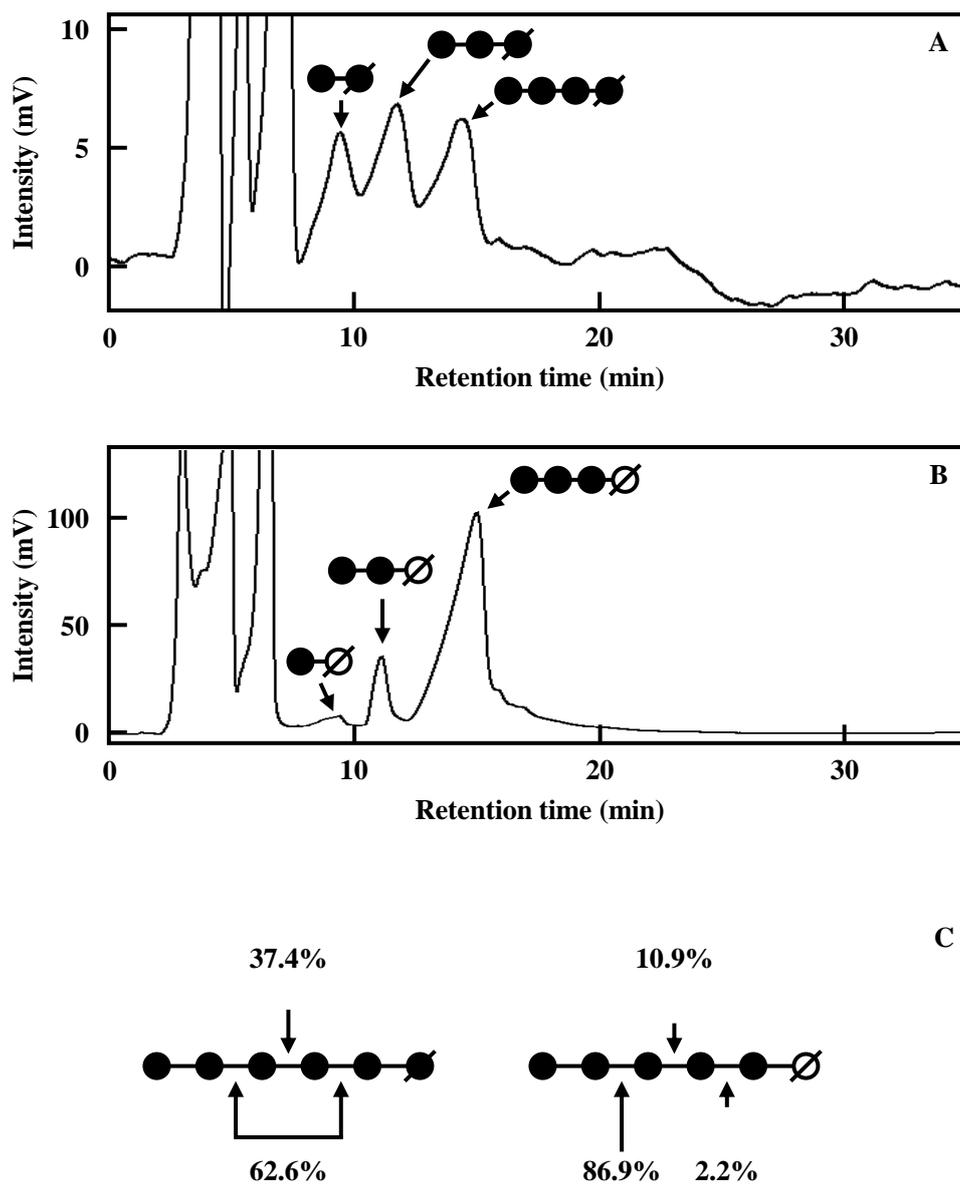


Fig. 3-14. HPLC pattern of the Hydrolysates of Chitohexaose (A) and Mono-N-acetylchitohexaose (B) by MH-K1 Chitosanase and Their Frequency of Hydrolysis (C).
 A, degradation products were detected by RI detector. B, degradation products were detected by UV detector (210 nm). Symbols are as in Fig. 3-12.

第4節 考察

10S-24 キチナーゼ II を 25%アセチル化部分 *N*-アセチルキトサンに作用させ、重合度 2-11 の $(\text{GlcN})_n\text{-GlcNAc}$ を得ることができた。 $(\text{GlcN})_{1-6}$ 、 $(\text{GlcNAc})_{1-6}$ 、 $(\text{GlcN})_{1-5}\text{-GlcNAc}$ および $(\text{GlcN})_{1-5}\text{-GlcN}^{\text{ol}}$ を、アミノ糖の定量法である Randle-Morgan 法により定量した結果、還元キトオリゴ糖以外のキトオリゴ糖で発色が見られた。本法は、C-1 位が遊離のカルボニル基、C-2 位に遊離のアミノ基をもつ糖の測定法であるとされており(Fig. 3-15)、グルコサミンの定量法として用いられている(福井, 1990)。そのため、C-2 位に遊離のアミノ基をもたない *N*-アセチルグルコサミンは呈色しないと考えられていたが、 $(\text{GlcN})_{1-5}\text{-GlcNAc}$ が $(\text{GlcN})_{1-6}$ の 1/5 程度、 $(\text{GlcNAc})_{1-6}$ が $(\text{GlcN})_{1-6}$ の 1/10 程度発色した。しかし、 $(\text{GlcN})_{1-5}\text{-GlcNAc}$ は $(\text{GlcN})_{1-6}$ に比べ、基質由来の発色を抑えることができることから、キトサナーゼ活性測定基質として有用であると考えられる。

$(\text{GlcN})_{4-6}$ 、 $(\text{GlcN})_{3-5}\text{-GlcNAc}$ および $(\text{GlcN})_{3-5}\text{-GlcN}^{\text{ol}}$ を基質に用い、AF キトサナーゼ II、7M キトサナーゼおよび MH-K1 キトサナーゼの活性を測定したところ、 $(\text{GlcN})_{4-6}$ および $(\text{GlcN})_{3-5}\text{-GlcNAc}$ は、今回用いた全てのキトサナーゼについて分解が確認され、キトサナーゼの活性測定基質として有用であることが示された。一方、Gao ら(2009)は、還元末端が還元された $(\text{GlcN})_{3-5}\text{-GlcN}^{\text{ol}}$ が切断箇所の解析に応用できる有用な基質であると報告している。また、本基質は Randle-Morgan 法で発色せず、酵素活性測定に有用な基質であると考えられた。しかしながら、 $(\text{GlcN})_{3-5}\text{-GlcN}^{\text{ol}}$ は、AF キトサナーゼ II により分解されなかったことから、全てのキト

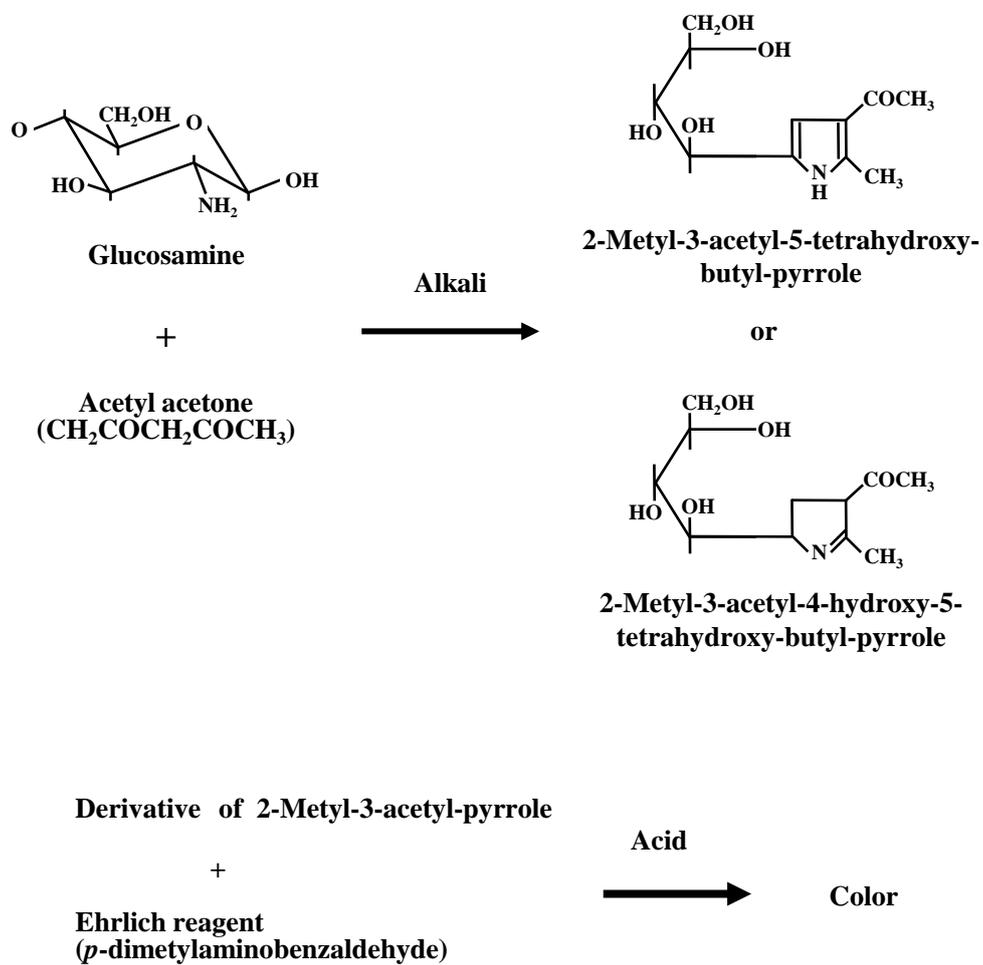


Fig. 3-15. Basic Reaction of Elson-Morgan Method.

サナーゼで使用することは困難であると考えられた。

今回用いた全てのキトサナーゼは、(GlcN)₆ に比べ(GlcN)₅-GlcNAc に対して高い活性を示した。キトサナーゼのサブサイト構造は、*Streptomyces* sp. N174 由来キトサナーゼで明らかにされており、(-3)(-2)(-1)(+1)(+2)(+3)からなる 6 個のサブサイトが基質と結合し、(-1)(+1)間で基質を切断することが報告されている(Boucher *et al.*, 1995)。また、他のキトサナーゼも N174 キトサナーゼと同様に(GlcN)₆ から主に(GlcN)₃ を生成することから同様のサブサイト構造をもつと考えられる。このサブサイト構造を基に考えると、(GlcN)₅-GlcNAc に対する活性を上昇させた要因と考えられる GlcNAc 残基は、(+3)サイトとの親和性に影響を与えていると考えられる。そこで、速度論的解析を行い、アセチル基のキトサナーゼ活性に及ぼす影響について検討した。その結果、今回用いた 3 種のキトサナーゼ全てにおいて V_{max} 値に大きな変化はなかったが、 K_m 値の減少が見られ、還元末端にアセチル基を有する(GlcN)₅-GlcNAc を基質としたとき親和性が上昇していた。このことから、(+3)サイトは、GlcN よりもむしろ GlcNAc を認識することが明らかとなった。これは、キトサナーゼが、完全に脱アセチル化されたキトサンよりも 20-30%アセチル化されたキトサンをよく分解するという多くの報告を支持する結果であり、(+3)サイトがアセチル基に対し強い親和性を示すことにより自然界に存在するキトサンの分解効率を高めていると考えられる。一方、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₃ を基質とし、AF キトサナーゼ II の(-1)サイトにおけるアセチル基の影響について検討したところ、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₃ に対する K_m 値は、(GlcN)₆ を基質としたときに比べ約 6.7 倍になり、親和性の大きな低下が見られた。GlcN-GlcN

間および GlcNAc-GlcN 間を切断する Subclass I の切断特異性を示すキトサナーゼは、(-1)サイトによりアセチル基を認識することで部分 *N*-アセチルキトサンの分解効率を高めるていると考えられていた(Jo *et al.*, 2003)。しかしながら、(-1)サイトにおけるアセチル基の存在は分解効率を低下させ、(-1)サイトが GlcNAc 残基ではなく GlcN 残基に対し親和性を示すことが明らかとなった。

*N*¹-モノアセチルキトヘキサオースを用いてキトサナーゼの切断様式を解析した結果、7M キトサナーゼは、(GlcN)₅-GlcNAc を基質とした場合、(GlcN)₆ を基質としたときに比べ、非還元末端から3番目の結合の分解頻度が約20%上昇した。これは、(+3)サイトがアセチル基を認識することに起因していると考えられる。一方、AFキトサナーゼ II および MH-K1 キトサナーゼでは、(GlcN)₆ を基質としたときに比べ、(GlcN)₅-GlcNAc を基質とした場合、非還元末端から2番目の結合を切断する割合が上昇した。これは、触媒反応には直接関係しないものの、アセチル基を認識するアミノ酸が、(+3)サイトのさらに外側に存在していることを示唆している。仮に、(+4)サイトがあるとした場合、この(+4)サイトが強くアセチル基を認識するため、(GlcN)₆ を基質としたときに比べ親和性の向上が見られたと考えられる。また、これら、(+3)および(+4)サイトがアセチル基に対する親和性を示すことが、キトサナーゼが完全に脱アセチル化されたキトサンよりも、むしろ、20-30%程度アセチル化されたキトサンをよく分解する要因と考えられる。

第4章 N^1, N^4 -ジアセチルキトヘキサオース[(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc]を用いたキトサナーゼの切断特異性の決定

第1節 諸言

これまでキトサナーゼは、部分 *N*-アセチルキトサンの切断特異性により3つの Subclass に分類されてきた。Subclass I キトサナーゼは、部分 *N*-アセチルキトサン分子中の GlcN-GlcN 間および GlcNAc-GlcN 間を、Subclass II キトサナーゼは GlcN-GlcN 間のみを、Subclass III キトサナーゼは GlcN-GlcN 間および GlcN-GlcNAc 間を切断する(Fukamizo *et al.*, 1994)。部分 *N*-アセチルキトサンの切断特異性に関する研究は、キトサナーゼによる分解生成物を陽イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過により分離精製し、得られた画分の糖配列を MALDI-TOF MS およびエキソグリコシダーゼ分解(Mitsutomi *et al.*, 1992)により、あるいは、MS および NMR (Fukamizo *et al.*, 1994)分析により決定する方法や、キトサン分解生成物を質量分析法(Bahrke *et al.*, 2002)で解析し、糖配列を決定することにより行われてきた。しかしながら、これらの切断特異性の決定法は多大な労力と時間、MS や NMR などの分析機器が必要となる。

現在、最もよく研究されているキトサナーゼである *Streptomyces* sp. N174 由来キトサナーゼ (Boucher *et al.*, 1992)は、(-3)(-2)(-1)(+1)(+2)(+3)からなる6つのサブサイト構造をもつことが知られており(Boucher *et al.*, 1995)、N174 キトサナーゼは(GlcN)₆から主に(GlcN)₃を生成する。

他のキトサナーゼにおいても(GlcN)₆から同様の加水分解産物を生成することから、他のキトサナーゼも同様のサブサイト構造をもっていると考えられる。このサブサイト構造およびこれまで報告されているキトサナーゼの切断特異性に着目し、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc の糖配列を有する N¹,N⁴-ジアセチルキトヘキサオースを基質とすることにより、従来法とは異なり短時間で容易にキトサナーゼの切断特異性を解析することが可能になると考えた。

一方、土壌から単離された *Bacillus amyloliquefacience* UTK 由来キトサナーゼ(UTK キトサナーゼ)は、Subclass I の切断特異性を示し、部分 N-アセチルキトサンの分解生成物として、(GlcN)₂-GlcNAc、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂ および(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc など特徴的な配列をもつヘテロキトオリゴ糖を生成することが報告されている(Seki *et al.*, 2000)。そこで、本章では、UTK キトサナーゼを用いて、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc を調製し、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc を用いた簡便かつ迅速な切断特異性の解析法を開発した。また、切断特異性が明らかとなっていない CsO-2 キトサナーゼ(Okajima *et al.*, 1994)および A-01 キトサナーゼ(Ando *et al.*, 2008)の切断特異性を本方法により解析したところ、両酵素が新規な切断特異性をもつ酵素であることを見出したので報告する。

第 2 節 実験材料および実験方法

第 1 項 実験材料

p-ニトロフェノールは、片山化学工業株式会社より購入した。*p*-ニトロフェニル- β -D-*N*-アセチルグルコサミニド(*p*NP-GlcNAc)は、焼津水産株式会社より供与された。AF キトサナーゼ II (Hirano *et al.*, 2012 a)、7M キトサナーゼ(Uchida *et al.*, 1989)、UTK キトサナーゼ (Seki *et al.*, 2000)および β -GlcNase (内田ら, 1994)は、当研究室において調製した。 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ(β -GlcNAcase)は、*Pycnoporus cinnabarinus* IFO6139 より調製した(Ohtakara *et al.*, 1981)。MH-K1 キトサナーゼ(Yabuki *et al.*, 1988)、CsO-2 キトサナーゼ(Okajima *et al.*, 1994)および A-01 キトサナーゼ(Ando *et al.*, 2008)は、千葉大学大学院 安藤昭一教授より恵与された。

第 2 項 還元糖の定量

還元糖の定量は、第 3 章第 2 節第 5 項に従い行った。また、標準物質として GlcN および GlcNAc を用いた。

第 3 項 キトサナーゼ活性測定法

キトサナーゼ活性測定は、第 2 章第 2 節第 4 項に従い行った。

第 4 項 キトオリゴ糖の*N*-アセチル化

オリゴ糖 1.0 mg を 0.04 M 炭酸ナトリウム 120 μ L に溶解した後、メタノール 99 μ L、無水酢酸 1.2 μ L を加え、4°C で 20 時間反応させた。その後、エバポレーターによる濃縮、50%メタノール溶液への溶解を繰り返し、酢酸臭がなくなったところで脱イオン水を加え電気透析した。その後、凍結乾燥し、HPLC 分析により重合度を測定した。

第 5 項 β -GlcNase 活性測定法

β -GlcNase 活性は、第 2 章第 2 節第 11 項に従い測定した。

第 6 項 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性測定法

β -GlcNAcase 活性は、*p*NP-GlcNAc を基質として用いた。4 mM *p*NP-GlcNAc 0.2 mL に 0.1 M クエン酸ナトリウム-塩酸緩衝液(pH 2.2) 0.2 mL を加え、37°C で 5 分間インキュベートした後、 β -GlcNAcase 0.1 mL を添加し、37°C で 10 分間反応させた。その後、0.1 M 炭酸ナトリウム溶液 2.0 mL により反応を停止し、420 nm における吸光度を測定した。標準物質として *p*-ニトロフェノールを用い、1 分間に 1 μ mol の *p*-ニトロフェノールを生成する酵素量を 1 unit とした。

第7項 エキソグリコシダーゼによるオリゴ糖の分解

オリゴ糖溶液(20 mg/mL) 100 μ L に、0.04 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5) 50 μ L および β -GlcNase (0.5 units/mL) 50 μ L を加え、37°C で 20 時間反応させた後、10 分間煮沸し反応を停止した。反応液 100 μ L に 0.04 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5) 50 μ L および β -GlcNAcase (0.5 units/mL) 50 μ L を加え、再び 37°C で 20 時間反応させ、その後、10 分間の煮沸により反応を停止した。得られた反応液は、TLC、HPLC および MALDI-TOF MS により分析した。

第8項 薄層クロマトグラフィー(TLC)

TLC は第2章第2節第13項と同様に行った。

第9項 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

示差屈折計(830-RI)は、日本分光株式会社製を、インテグレーターとして、D-2500 chromat-integrater (Hitachi)を用いた。カラムは Waters 製の Carbohydrate Column および Radial-Pak μ Bondapak NH₂ カラムを使用した。また、移動層には 65%アセトニトリルを用いた。

第10項 質量分析

キトサナーゼによる(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc 分解生成物の分析には、Antoflex III (Bruker Daltonics)を、CsO-2 キトサナーゼによるキトサン分解生成物の分析には、4800 plus

MALDI TOF/TOF™ analyzer (AB SCIEX)を使用し、MALDI-TOF MS により分析した。マトリックスとして 2,5-ヒドロキシ安息香酸を用いた。

第 11 項 (GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc の調製

(1) キトサンの分解

0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.7)に溶解した 0.6%キトサン溶液 600 mL に、2%アジ化ナトリウム 6 mL、UTK キトサナーゼ(35 units) 5 mL を加え、30°C、24 時間反応後、再び UTK キトサナーゼ(35 units) 5 mL を加え、30°C、24 時間反応させた。反応後、5 分間煮沸し、反応を停止させ、エバポレーターを用いて 40 mL に濃縮し、遠心分離(20,000 g、15 分)、電気透析を行った。その後、1.0 M 酢酸を用いて pH 4.5 に調整した。

(2) キトサン分解物の精製

キトサン分解物は、0.02 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.5)により平衡化した CM-Sephadex C-25 カラム(2.6×80 cm、30 m/h)に供した。その後、0-2.0 M NaCl 直線濃度勾配により吸着画分を溶出させた。得られた画分は、電気透析、濃縮、凍結乾燥をした後、0.15 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.2)により平衡化した Bio-Gel P-4 によるゲルろ過(2.6×180 cm)に供し、さらに精製した。

第 12 項 *Amycolatopsis* sp. CsO-2 由来キトサナーゼ(CsO-2 キトサナーゼ)によるキトサン分

解物の精製

0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.3)に溶解した 0.6%キトサン 500 mL に、2%アジ化ナトリウム 5 mL および CsO-2 キトサナーゼ(100 units/mL) 0.5 mL を加え、37°C で反応させた。48 時間後、5 分間の煮沸により反応を停止し、ロータリーエバポレーターで濃縮後、遠心分離(10,000 g、15 分)し、電気透析により脱塩した。その後、0.1 M 酢酸により pH を 4.6 に調整したキトサン分解生成物を、0.02 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.6)により平衡化した CM-Sephadex C-25 カラム(2.6×45 cm、30 m/h)に供した。同緩衝液で洗浄後、0-2.0 M NaCl 直線濃度勾配により吸着画分を溶出した。得られた画分は、電気透析、濃縮、凍結乾燥をした後、0.1 M ギ酸緩衝液(pH 4.2)により平衡化した Bio-Gel P-6 によるゲルろ過(2.6×165 cm)に供し、さらに精製した。

第3節 実験結果

第1項 (GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc の調製

前節第11項に従い部分 *N*-アセチルキトサンの分解を行った。得られたキトサン分解物を CM-Sephadex C-25 に供した結果、9つの画分が得られ、それぞれを F-1 から F-9 として回収した(Fig. 4-1)。(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc は F-5 画分に含まれているので、さらに F-5 について、Bio-Gel P-4 カラムによるゲルろ過を行った。その結果、F-5 画分から3つのピークが得られたため、それぞれ、F-5-1、F-5-2 および F-5-3 として回収した(Fig. 4-2)。得られた各画分を *N*-アセチル化した後、HPLC に供し標準物質である(GlcNAc)₁₋₆ と比較した結果、F-5-1 の重合度は6、F-5-2 の重合度は3であった。F-5-1 の糖配列を明らかにするために、エキソグリコシダーゼによる酵素分解および MALDI-TOF MS を行った(Fig. 4-3)。その結果、F-5-1 は、β-GlcNase により GlcN と未知物質 A に分解された。さらにβ-GlcNase 分解物をβ-GlcNAcase により分解したところ、GlcNAc および未知物質 B に分解された。β-GlcNAcase 分解溶液を再度β-GlcNase により分解したところ、GlcN および GlcNAc に完全に分解された。未知物質 A および B を MALDI-TOF MS により分析した結果、A の実測値は[M+Na]⁺=769.2、B の実測値は[M+Na]⁺=566.0 であり、それぞれ、ジアセチルキトテトラオース([M+Na]⁺=769.702)およびモノアセチルキトリオース([M+Na]⁺= 566.509)の理論値と一致した。このことから、A は、*N*¹,*N*⁴-ジアセチルキトテトラオースであり、そのβ-GlcNAcase 分解物である B は、*N*¹-モノアセチルキトリオースであると考えられ、F-5-1 は、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc であることが明らかとな

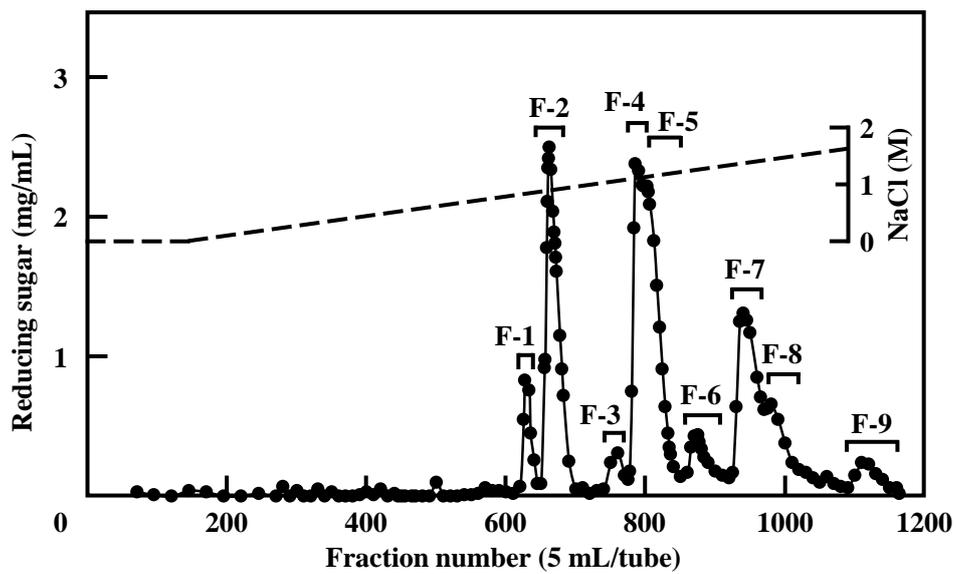


Fig. 4-1. CM-Sephadex C-25 Column Chromatography of Oligosaccharides Produced during the Hydrolysis of Partially *N*-Acetylated Chitosan by Chitosanase from *Buillus amyloliquefaciens* UTK.
 Symbol: ●, reducing sugar; Line: ---, NaCl.

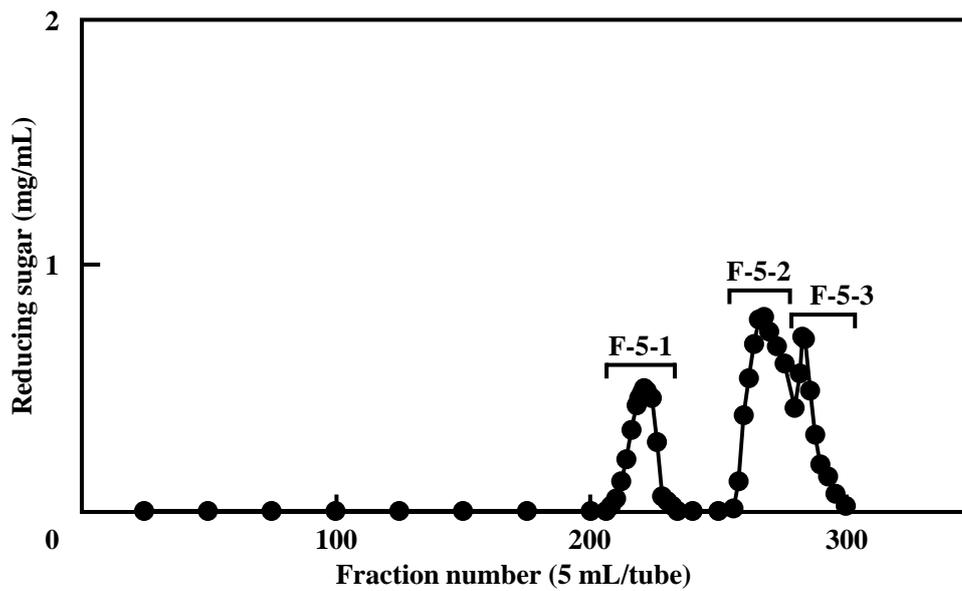


Fig. 4-2. Gel Filtration of F-5 Fraction Obtained by CM-Sephadex C-25 Column Chromatography on Bio-Gel P-4.
Symbol: ●, reducing sugar.

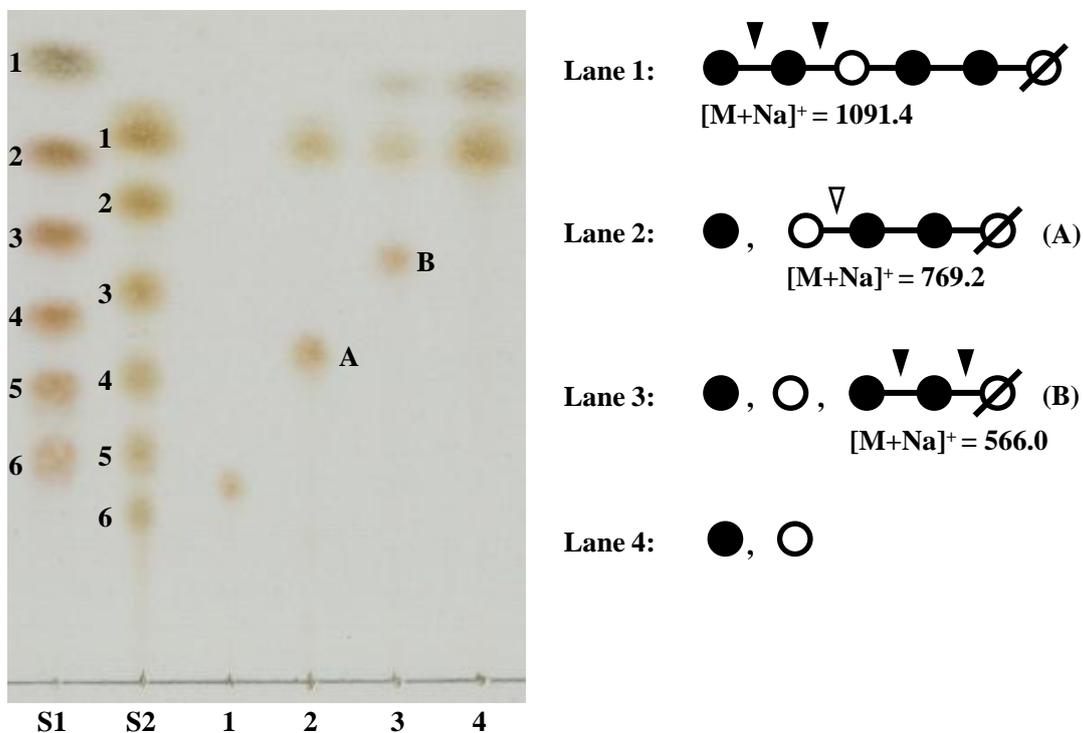


Fig. 4-3. TLC Analysis of the Hydrolysis Products of F-5-1 by Successive Action of β -GlcNase and β -GlcNAcase.

A reaction mixture consisting of 100 mL of F-5-1 (20 mg/mL), 50 mL of 0.04 M phosphate buffer (pH 5.5), and 50 mL of β -GlcNase (0.5 units/mL) or β -GlcNAcase (0.5 units/mL) was incubated for 20 h at 37°C. The reaction was stopped by boiling for 3 min. Exo-splitting of oligosaccharides by successive action of β -GlcNase and β -GlcNAcase was done by adding the remaining enzyme after the reaction with the first was stopped. Lane S1, (GlcNAc)₁₋₆ as standard; lane S2, (GlcN)₁₋₆ as standard; lane 1, F-5-1; lane 2, lane 1 + β -GlcNase; lane 3, lane 2 + β -GlcNAcase; lane 4, lane 3 + β -GlcNase. Symbols: ●, GlcN; ○, GlcNAc; Ø, Reducing end of oligosaccharide; ▼, cleavage point (β -GlcNase); ▽, cleavage point (β -GlcNAcase).

った。最終的に、 N^1,N^4 -ジアセチルキトヘキサオースの収量は、47.4 mg で、回収率は 1.32% であった。

第 2 項 キトサナーゼによる $(\text{GlcN})_2\text{-GlcNAc-(GlcN})_2\text{-GlcNAc}$ の分解

前述のとおり、キトサナーゼは (-3)(-2)(-1)(+1)(+2)(+3) からなる 6 つのサブサイト構造をもち、(-1)(+1) 間で基質を切断する。Subclass I キトサナーゼは、キトサン分子中の GlcN-GlcN 間および GlcNAc-GlcN 間を、Subclass II キトサナーゼは GlcN-GlcN 間のみを、Subclass III キトサナーゼは GlcN-GlcN 間および GlcN-GlcNAc 間を切断する。このような切断特異性をもつキトサナーゼを N^1,N^4 -ジアセチルキトヘキサオースに作用させることで、その分解生成物として、Subclass I キトサナーゼは、 $(\text{GlcN})_2\text{-GlcNAc}$ を、Subclass III のキトサナーゼは $(\text{GlcN})_2$ および $\text{GlcNAc-(GlcN})_2\text{-GlcNAc}$ を生成すると考えられる。そこで、 N^1,N^4 -ジアセチルキトヘキサオース分解生成物の TLC 分析を行うことによる切断特異性の解析を試みた。

(1) AF キトサナーゼ II の $(\text{GlcN})_2\text{-GlcNAc-(GlcN})_2\text{-GlcNAc}$ に対する作用

AF キトサナーゼ II は、Subclass I に属するキトサナーゼであり、その諸性質については第 2 章で述べた。AF キトサナーゼ II を $(\text{GlcN})_6$ に作用させた結果、その分解物として $(\text{GlcN})_3$ と微量の $(\text{GlcN})_2$ および $(\text{GlcN})_4$ が生成し、 $(\text{GlcN})_2\text{-GlcNAc-(GlcN})_2\text{-GlcNAc}$ を基質としたとき、 $(\text{GlcN})_2\text{-GlcNAc}$ が生成した (Fig. 4-4)。この結果は、それぞれの基質の還元末端から 3 番目の結合である GlcN-GlcN 間および GlcNAc-GlcN 間を切断していることを示しており、部分 N -ア

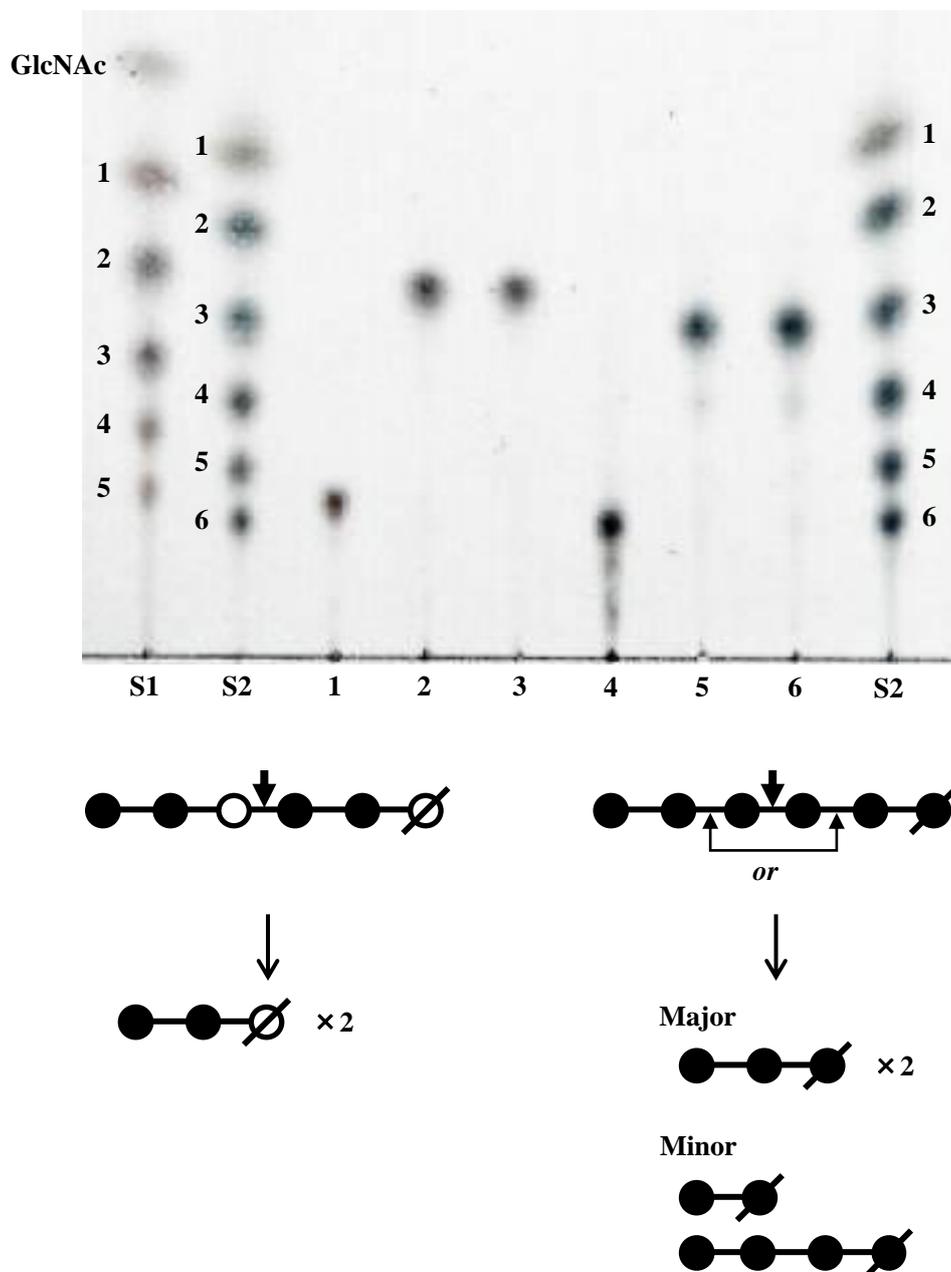


Fig. 4-4. TLC Analysis of the Products of Chitohexaose Hydrolyzed by AF Chitosanase II.

The experimental details are described in “Materials and Methods.” Lane S1, GlcNAc and (GlcN)₁₋₅-GlcNAc as standard; lane S2, (GlcN)₁₋₆ as standard; lanes 1, 2, and 3, hydrolysis products of (GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc after incubation for 0 min, 10 min, and 20 min respectively; lanes 4, 5, and 6, hydrolysis products of (GlcN)₆ after incubation for 0 min, 10 min, and 20 min respectively. Symbols: ●, GlcN; ○, GlcNAc; ● and ∅, reducing end of oligosaccharide; ↓, cleavage point.

セチルキトサンを基質として決定した切断特異性(第2章第3節第3項)と一致した。

(2) 7M キトサナーゼの(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc に対する作用

7M キトサナーゼは、部分 *N*-アセチルキトサンの GlcN-GlcN 間のみを切断し、Subclass II の切断特異性を示す。7M キトサナーゼは、(GlcN)₆ から主に(GlcN)₃ を生成したが、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc は分解しなかった(Fig. 4-5)。この結果は、7M キトサナーゼが GlcN-GlcN 間のみを切断することを示しており、部分 *N*-アセチルキトサンを用いた切断特異性決定の結果(Izume *et al.*, 1992)と同じであった。

(3) MH-K1 キトサナーゼの(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc に対する作用

MH-K1 キトサナーゼは、GlcN-GlcN 間および GlcN-GlcNAc 間を切断する Subclass III に属している。MH-K1 キトサナーゼは、(GlcN)₆ を(GlcN)₂、(GlcN)₃ および(GlcN)₄ に、また、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc を(GlcN)₂ および未知物質 C に分解した(Fig. 4-6)。未知物質 C を MALDI-TOF MS により分析した結果、[M+Na]⁺イオンが、*m/z* 769.2 に検出された。このことから、未知物質 C は、GlcN および GlcNAc をそれぞれ 2 分子もつ物質であることが明らかとなった。これらの結果から、未知物質 C は、GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc であると同定した。このように、MH-K1 キトサナーゼは、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc 分子中の GlcN-GlcNAc 間を切断することが明らかとなった。この結果は、部分 *N*-アセチルキトサン分解生成物の同定から決定された切断特異性(Mitsutomi *et al.*, 1996)と一致した。

以上の結果から、*N*¹,*N*⁴-ジアセチルキトヘキサオースは、迅速、容易に切断特異性を解析する基質として有用であることが示された。

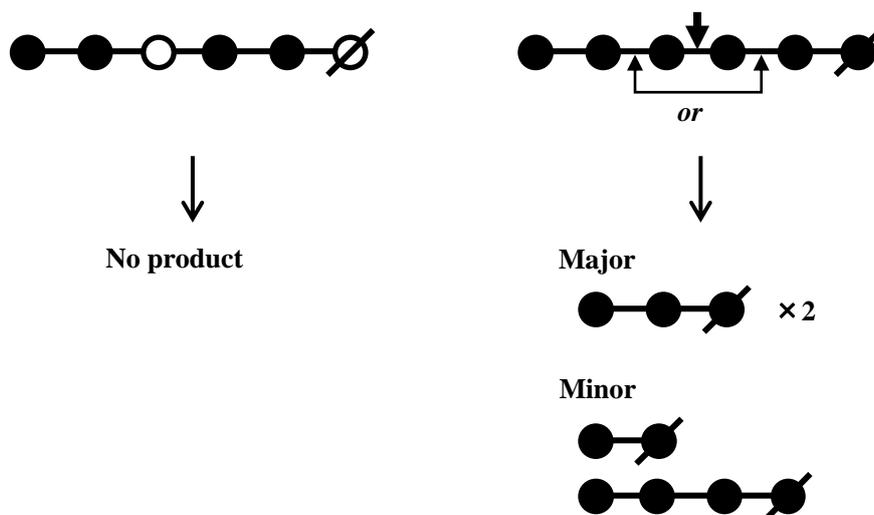
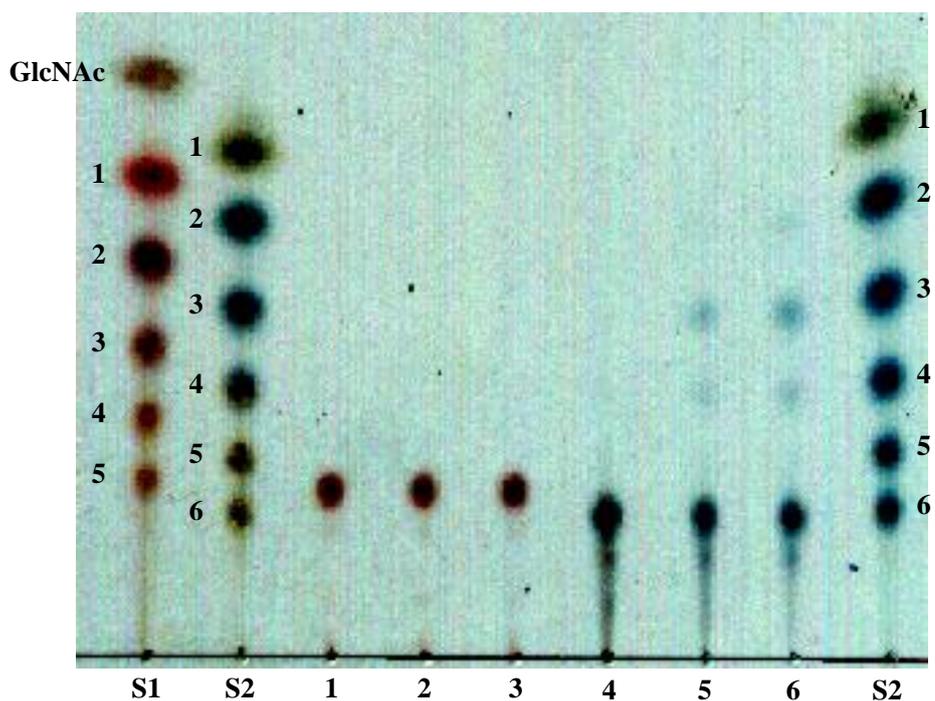


Fig. 4-5. TLC Analysis of the Products of Chitohexaose Hydrolyzed by 7M Chitosanase.

The experimental details are described in “Materials and Methods.” Lane S1, GlcNAc and (GlcN)₁₋₅-GlcNAc as standard; lane S2, (GlcN)₁₋₆ as standard; lanes 1, 2, and 3, hydrolysis products of (GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc after incubation for 0 min, 10 min, and 20 min respectively; lanes 4, 5, and 6, hydrolysis products of (GlcN)₆ after incubation for 0 min, 10 min, and 20 min respectively. Symbols are as in Fig. 4-4.

第3項 CsO-2 キトサナーゼおよび *Pseudomonas* A-01 由来キトサナーゼの(GlcN)₂-

GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc に対する作用

Amycolatopsis sp. CsO-2 (岡嶋ら, 1994)および *Pseudomonas* sp. A-01 (Ando *et al.*, 2008)は、いずれも土壌より単離され、強いキトサン分解能を有する細菌である。CsO-2 キトサナーゼおよび A-01 キトサナーゼは、N174 キトサナーゼと高い相同性を持ち GlcN-GlcN 間を切断することが報告されているが、詳細な切断特異性については明らかになっていない。そこで、基質に *N*¹,*N*⁴-ジアセチルキトヘキサオースを用い切断特異性を検討した。

(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc に CsO-2 キトサナーゼを作用させたところ、(GlcN)₂、(GlcN)₂-GlcNAc および未知物質 D を生成した(Fig. 4-7)。A-01 キトサナーゼも同様に、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc から、(GlcN)₂、(GlcN)₂-GlcNAc および未知物質 E を生成した(Fig. 4-8)。未知物質 D および E を MALDI-TOF MS により分析した結果、[M+Na]⁺イオンが、*m/z* 769.2 に検出された。これは、GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc の[M+Na]⁺イオンの理論値である 769.7 と一致したことから、未知物質 D および E が GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc であると同定した。この結果から、CsO-2 および A-01 キトサナーゼは、*N*¹,*N*⁴-ジアセチルキトヘキサオース分子中の GlcNAc-GlcN 間および GlcN-GlcNAc 間を切断することが示された。

第4項 CsO-2 キトサナーゼの部分 *N*-アセチルキトサンに対する切断特異性

前項の結果から、CsO-2 および A-01 キトサナーゼは、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc 分

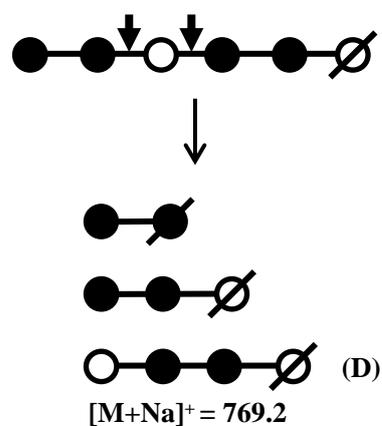
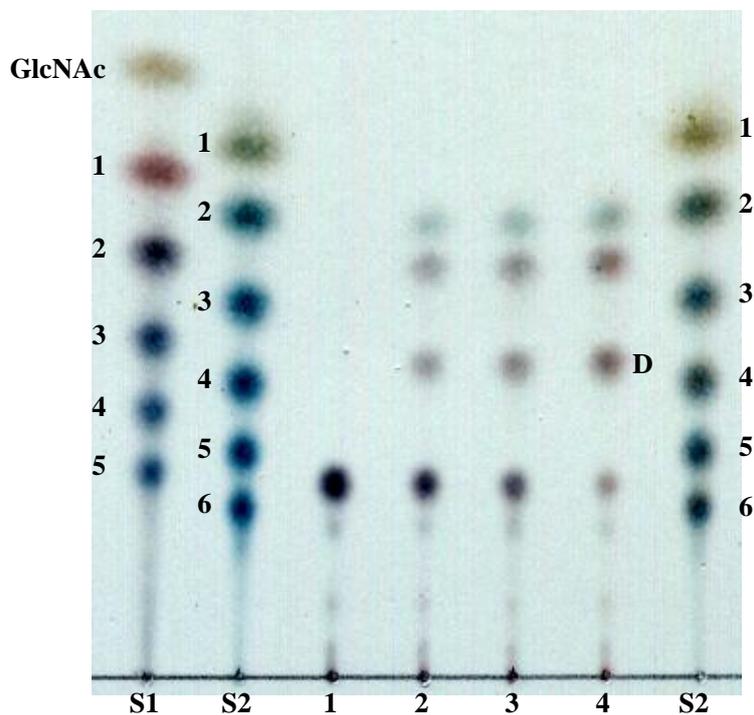


Fig. 4-7. TLC Analysis of the Products of N^1, N^4 -Diacetylchitohexaose Hydrolyzed by CsO-2 Chitosanase.

The experimental details are described in “Materials and Methods.” Lane S1, GlcNAc and (GlcN)₁₋₅-GlcNAc as standard; lane S2, (GlcN)₁₋₆ as standard; lanes 1, 2, 3, and 4, hydrolysis products of (GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc after incubation for 0 min, 10 min, 20 min, and 40 min respectively. Symbols are as in Fig. 4-4.

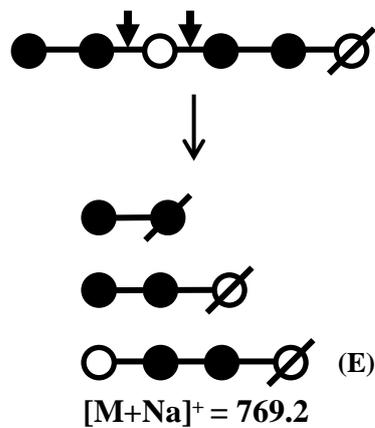
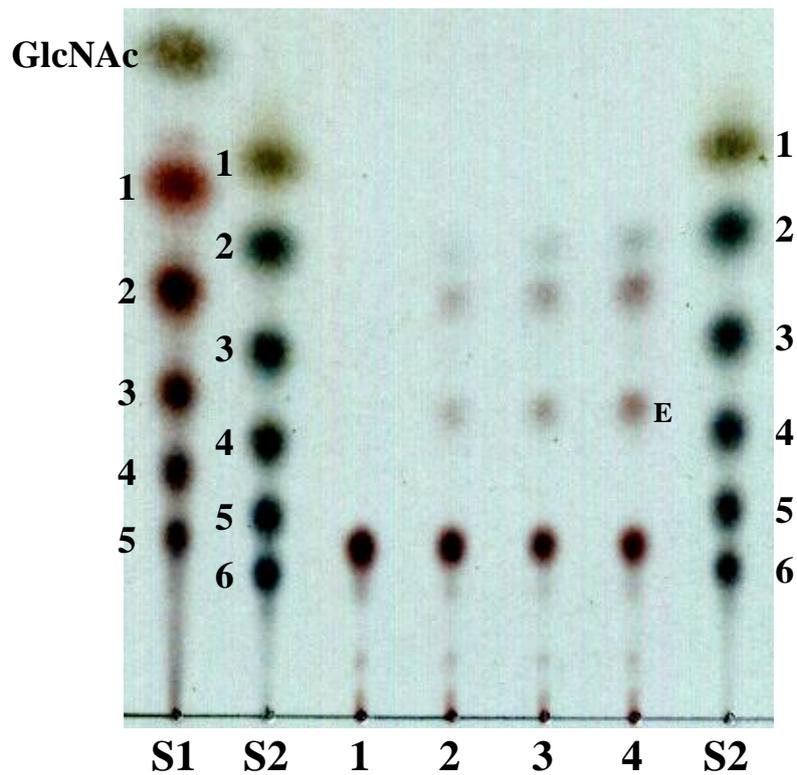


Fig. 4-8. TLC Analysis of the Products of N^1,N^4 -Diacetylchitohexaose Hydrolyzed by A-01 Chitosanase.

The experimental details are described in “Materials and Methods.” Lane S1, GlcNAc and $(\text{GlcN})_{1-5}$ -GlcNAc as standard; lane S2, $(\text{GlcN})_{1-6}$ as standard; lanes 1, 2, 3, and 4, hydrolysis products of $(\text{GlcN})_2$ -GlcNAc- $(\text{GlcN})_2$ -GlcNAc after incubation for 0 min, 10 min, 20 min, and 40 min respectively. Symbols are as in Fig. 4-4.

子中の GlcNAc-GlcN 間および GlcN-GlcNAc 間を切断し、現在までに報告されていない切断特異性を示した。そこで、CsO-2 キトサナーゼにより、部分 *N*-アセチルキトサンを分解し、分解生成物の構造を決定することで切断特異性を検討した。

(1) CsO-2 キトサナーゼによるキトサン分解物の調製

前節第 12 項に従い、CsO-2 キトサナーゼによる部分 *N*-アセチルキトサンの分解を行った。得られたキトサン分解物を CM-Sephadex C-25 に供した結果、6 つの画分が得られ、それぞれ P-1 から P-6 として回収した(Fig. 4-9)。次に、回収した各画分を Bio-Gel P-6 カラムによるゲルろ過に供した結果、P-1 のみ 2 つのピーク、P-1-1 および P-1-2 に分離し(Fig. 4-10)、P-1 以外の画分はゲルろ過的に単一だった。得られた Bio-Gel P-6 回収画分を MALDI-TOF MS および エキソグリコシダーゼ分解により糖配列決定した。

(2) P-1-1 画分の糖配列

P-1-1 を MALDI-TOF MS により分析した結果、 $[M+Na]^+$ イオンの m/z は 405.1 であった。これは、モノアセチルキトビオースの $[M+Na]^+$ イオンの理論値、405.354 と一致した。次に、 β -GlcNase により P-1-1 を分解した結果、GlcN および GlcNAc が生成した(Fig. 4-11)。一方、P-1-1 に β -GlcNAcase を作用させたところ、分解されなかった。このことから、P-1-1 は、GlcN-GlcNAc の配列をもつ、*N*¹-モノアセチルキトビオースと同定した。

(3) P-3 画分の糖配列

P-3 を β -GlcNase および β -GlcNAcase により連続的に分解した結果、P-3-1、P-3-2、P-3-3 および P-3-4 が得られた(Fig. 4-12)。各サンプルについて質量分析を行った結果、P-3、P-3-1、

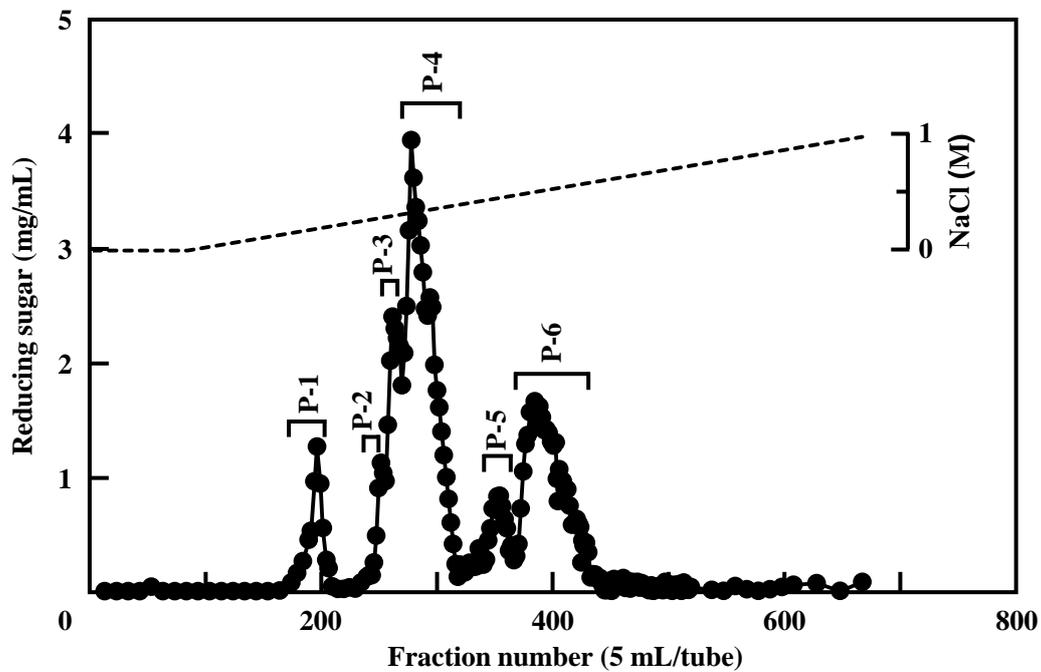


Fig. 4-9. CM-Sephadex C-25 Column Chromatography of Oligosaccharides Produced during the Hydrolysis of Partially *N*-Acetylated Chitosan by Chitosanase from *Amycolatopsis* sp. CsO-2. Symbols are as in Fig. 4-1.

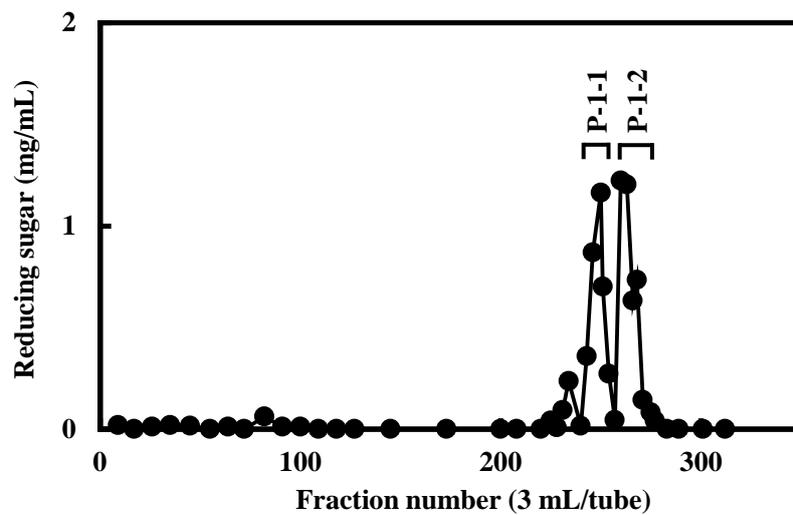


Fig. 4-10. Gel Filtration of Fraction P-1 on Bio-Gel P-6.
 Symbols are as in Fig. 4-1.

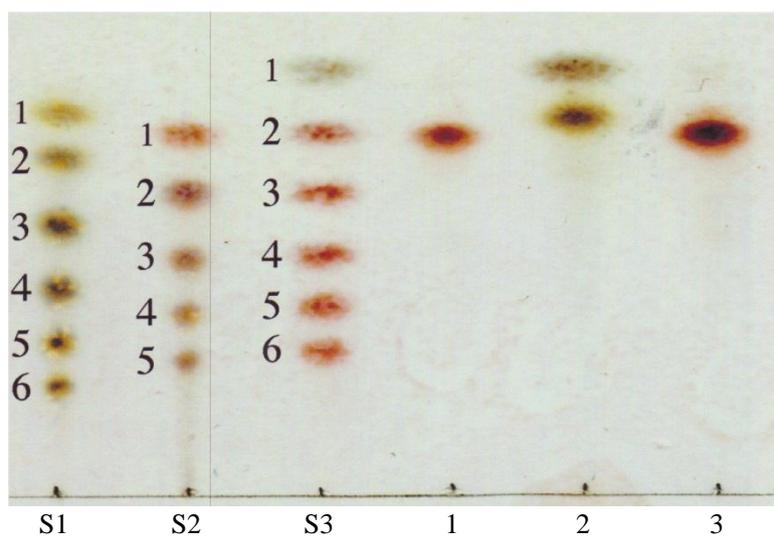


Fig. 4-11. TLC Analysis of the Products of P-1-1 Hydrolyzed by β -GlcNase and β -GlcNAcase.

The experimental details are described in “Materials and Methods.” Lane S1, $(\text{GlcN})_{1-6}$ as standard; lane S2, $(\text{GlcN})_{1-5}\text{-GlcNAc}$ as standard; lane S3, $(\text{GlcNAc})_{1-6}$ as standard; lane 1, P-1-1; lane 2, P-1-1 + β -GlcNase; lane 3, P-1-1 + β -GlcNAcase.

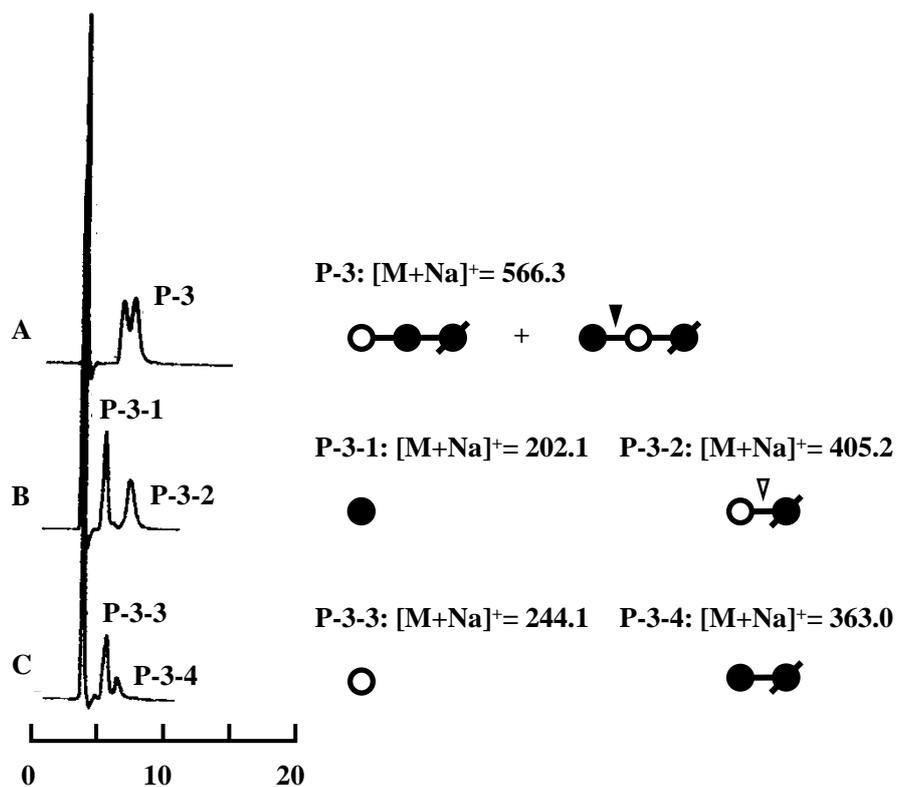


Fig. 4-12. HPLC of the Hydrolysates of P-3 by Successive Action of β-GlcNase and β-GlcNAcase.

The experiment is described in the text. A, P-3; B, A + β-GlcNase; C, B + β-GlcNAcase. Symbols: ●, GlcN; ○, GlcNAc; ●, reducing end of oligosaccharide; ▼, cleavage point (β-GlcNase); ▽, cleavage point (β-GlcNAcase).

P-3-2、P-3-3 および P-3-4 は、それぞれ[M+Na]⁺イオンが、*m/z* 566.3、202.1、405.2、244.1 および 363.0 に検出され、モノアセチルキトリオース、GlcN、モノアセチルキビオース、GlcNAc、および(GlcN)₂ の[M+Na]⁺イオンの理論値、565.509、202.161、405.354、244.198、および 363.317 と一致した。また、P-3-2 は、β-GlcNase 分解および MS の結果から、N²-モノアセチルキビオース(GlcNAc-GlcN)であると考えられる。以上の結果から、P-3 は、N²-モノアセチルキトリオース(GlcN-GlcNAc-GlcN)および N³-モノアセチルキトリオース[GlcNAc-(GlcN)₂]が混在しているものと考えられる。

(4) P-4 画分の糖配列

β-GlcNase による分解を行った結果、P-4 は、完全に分解された(Fig. 4-13 B)。また、P-4 を質量分析した結果、[M+Na]⁺イオンが、*m/z* 363.1 に検出され、(GlcN)₂ の理論値([M+Na]⁺= 363.317)と一致した。このことから、P-4 は、(GlcN)₂ であることがわかった。

(5) P-5 画分の糖配列

P-5 を MALDI-TOF MS に供した結果、[M+Na]⁺イオンが、*m/z* 727.4 で検出された。また、β-GlcNase により GlcN と P-5-1 ([M+Na]⁺= 566.3) および P-5-2 ([M+Na]⁺= 727.4) に分解された(Fig. 4-14 A)。さらにβ-GlcNAcase による分解を行ったところ、GlcN および GlcNAc の他に、P-5-3 ([M+Na]⁺= 363.1) および P-5-4 ([M+Na]⁺= 524.1) の生成が確認された(Fig. 4-14 B)。P-5-1、P-5-2、P-5-3 および P-5-4 は、それぞれ、モノアセチルキトリオース、モノアセチルキテトラオース、(GlcN)₂ および (GlcN)₃ の[M+Na]⁺イオンの理論値、566.509、727.665、363.317 および 524.473 と一致した。MS およびエキソグリコシダーゼ分解の結果より、P-5-1 お

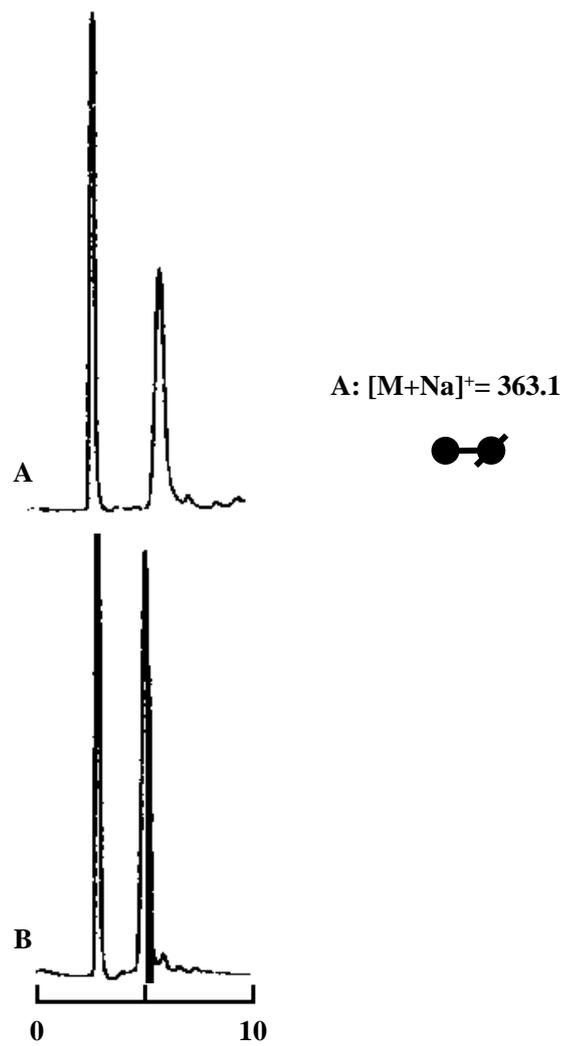


Fig. 4-13. HPLC of the Hydrolysates of P-4 by β -GlcNase. The experiment is described in the text. A, P-4; B, A + β -GlcNase. Symbols are as in Fig. 4-12.

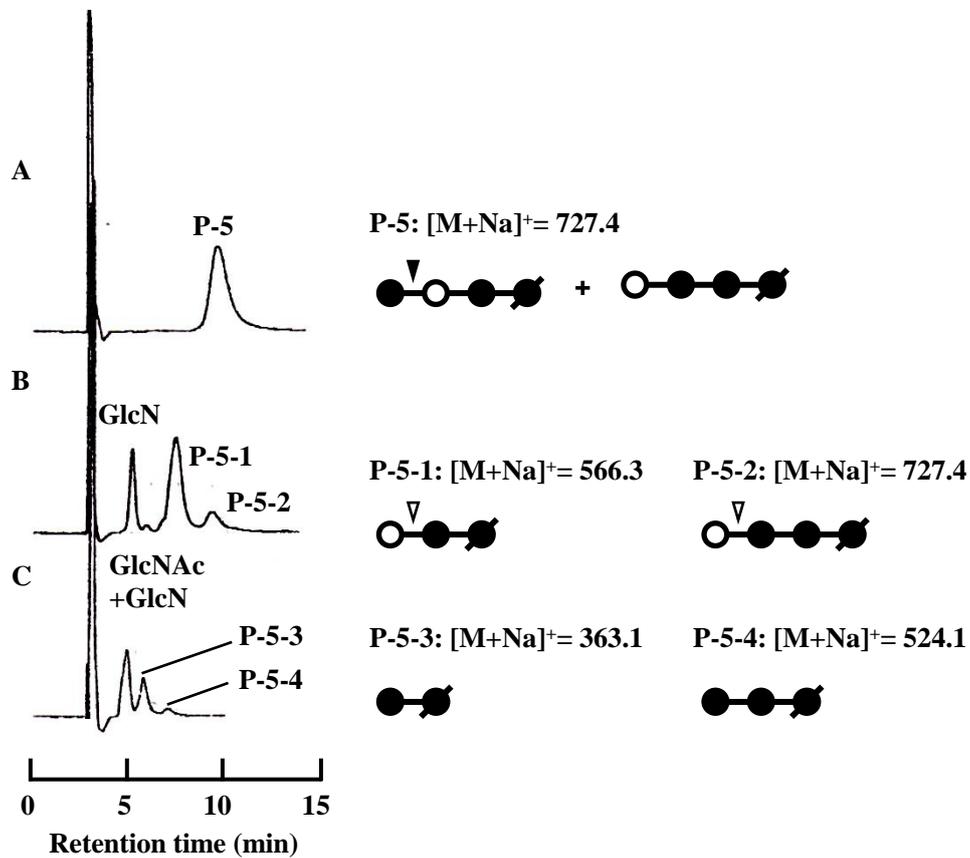


Fig. 4-14. HPLC of the Hydrolysates of P-5 by Successive Action of β -GlcNase and β -GlcNAcase.

The experiment is described in the text. S1, (GlcN)₁₋₆ as standard; A, P-4; B, A + β -GlcNase. Symbols are as in Fig. 4-12.

よび P-5-2 はそれぞれ、 N^3 -モノアセチルキトリオース[GlcNAc-(GlcN)₂]および N^3 -モノアセチルキテトラオース[GlcN-GlcNAc-(GlcN)₂]であることから、P-5 は、 N^3 -モノアセチルキテトラオース[GlcN-GlcNAc-(GlcN)₂]および N^4 -モノアセチルキテトラオース[GlcNAc-(GlcN)₃]の混合物であった。

(6) P-6 画分の糖配列

β -GlcNase による分解を行った結果、P-6 は、完全に分解された(Fig. 4-15)。また、P-6 の [M+Na]⁺イオンが、 m/z 524.2 に検出され、(GlcN)₃の[M+Na]⁺イオンの理論値 524.473 と一致したことから、P-6 は、(GlcN)₃であることがわかった。

以上の結果より、P-1-1 は GlcN-GlcNAc、P-3 は GlcN-GlcNAc-GlcN および GlcNAc-(GlcN)₂、P-4 は(GlcN)₂、P-5 は GlcN-GlcNAc-(GlcN)₂ および GlcNAc-(GlcN)₃、P-6 は(GlcN)₃ と同定された(Table 4-1)。CsO-2 キトサナーゼによる部分 *N*-アセチルキトサンの分解生成物として、還元末端および非還元末端に GlcN 残基を有するキトオリゴ糖、還元末端に GlcN 残基および非還元末端に GlcNAc 残基をもつヘテロキトオリゴ糖、還元末端に GlcNAc 残基および非還元末端に GlcN 残基をもつヘテロキトオリゴ糖が生成された。また、CsO-2 キトサナーゼは、*N*-アセチルグルコサミンオリゴ糖を切断しないことから、本酵素は、部分 *N*-アセチルキトサン分子中の GlcN-GlcN 間、GlcN-GlcNAc 間および GlcNAc-GlcN 間を特異的に加水分解することが明らかとなった。

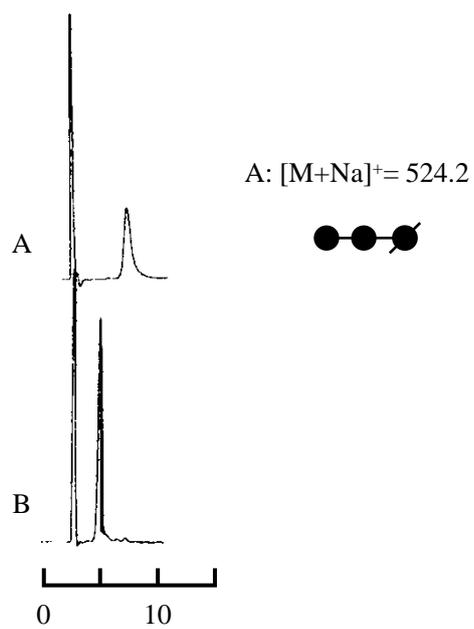


Fig. 4-15. HPLC of the Hydrolysates of P-6 by β -GlcNase. The experiment is described in the text. A, P-4; B, A + β -GlcNase. Symbols are as in Fig. 4-4.

Table 4-1. Oligosaccharides Produced in the Hydrolysis of Partially *N*-Acetylated Chitosan with CsO-2 Chitosanase

Fraction	Chitoologosaccharides
P-1-1	●-Ø
P-3	●-○-●-Ø ○-●-Ø
P-4	●-Ø
P-5	●-○-●-Ø ○-●-●-Ø
P-6	●-●-Ø

● ; GlcN, ○ ; GlcNAc, ● and Ø ; Reducing end

第4節 考察

キトサナーゼのサブサイト構造モデルおよび部分 *N*-アセチルキトサンに対する切断特異性から、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc を基質に用い、分解生成物を TLC で確認することにより、迅速かつ容易に切断特異性を解析できると考えた。そこでまず、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc を酵素的に調製することを試みた。UTK キトサナーゼによる部分 *N*-アセチルキトサン分解生成物を CM-Sephadex C-25 カラムクロマトグラフィーおよび Bio-Gel P-4 カラムクロマトグラフィーに供し、分離精製することにより、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc を調製することができた。

次に、Subclass がすでに報告されているキトサナーゼを用い、*N*¹,*N*⁴-ジアセチルキトヘキサオースの切断特異性解析の基質としての有用性について検討した。その結果、Subclass I である AF キトサナーゼ II は(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc から(GlcN)₂-GlcNAc を生成し、*N*¹,*N*⁴-ジアセチルキトヘキサオース分子中の GlcNAc-GlcN 間を切断した。また、Subclass II に属する 7M キトサナーゼは、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc を分解しなかった。さらに、Subclass III の MH-K1 キトサナーゼは、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc を(GlcN)₂ および GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc に分解したことから、*N*¹,*N*⁴-ジアセチルキトヘキサオース分子中の GlcN-GlcNAc 間を切断することが明らかとなった。これらの結果は、部分 *N*-アセチルキトサンを基質に用いて決定した切断特異性と一致し、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc が切断特異性決定の基質として有用であることが示された。また、本方法によりキトサナーゼの切断特異

性を迅速に解析することが可能となった。

切断特異性が明らかになっていなかった CsO-2 キトサナーゼおよび A-01 キトサナーゼについて、本方法を用い切断特異性の解析を行った。CsO-2 および A-01 キトサナーゼを(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc に作用させたところ、両酵素とも(GlcN)₂、(GlcN)₂-GlcNAc および GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc を生成した。これは、N¹,N⁴-ジアセチルキトヘキサオース分子中の GlcNAc-GlcN 間および GlcN-GlcNAc 間を切断したことを示しており、Subclass I、II および III いずれの切断特異性とも異なった結果となった。そこで、CsO-2 キトサナーゼを用い、従来法に従い、部分 N-アセチルキトサンに対する切断特異性を検討したところ、分解生成物として (GlcN)₂、(GlcN)₃ に加え GlcN-GlcNAc、GlcN-GlcN-GlcNAc、GlcN-GlcNAc-GlcN、GlcN-GlcNAc-GlcN-GlcN および GlcNAc-GlcN-GlcN-GlcN を生成した。また、CsO-2 キトサナーゼは N-アセチルキトオリゴ糖の GlcNAc-GlcNAc 間を分解しない。これらの結果より、CsO-2 キトサナーゼは、部分 N-アセチルキトサン分子中の GlcN-GlcN 間、GlcNAc-GlcN 間および GlcN-GlcNAc 間を切断するということが明らかとなり、N¹,N⁴-ジアセチルキトヘキサオースによる切断特異性解析の結果と一致した。現在、キトサナーゼは、部分 N-アセチルキトサンに対する切断特異性から3つの Subclass に分類されている。しかし、本実験の結果により、キトサナーゼはその切断特異性から、GlcN-GlcN 間および GlcNAc-GlcN 間を切断する Subclass I、GlcN-GlcN 間のみを切断する Subclass II、GlcN-GlcN 間および GlcN-GlcNAc 間を切断する Subclass III に加え、GlcN-GlcN 間、GlcN-GlcNAc 間および GlcNAc-GlcN 間を切断する Subclass IV を

含めた 4 つの Subclass に分類されることが明らかとなった(Table 4-2、Hirano *et al.*, 2012 b)。また、CsO-2 キトサナーゼおよび A-01 キトサナーゼのもつ強いキトサン分解能は、 β -1,4 グリコシド結合のどちらか一方に GlcN があれば基質を切断できる幅広い切断特異性によるものと考えられる。

Table 4-2. Classification of Cleavage specificity of Chitosanase

Cleavage specificity	Chitosanase
Subclass I  	<i>Aspergillus fumigatus</i> Y2K <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC13073 <i>Streptomyces</i> sp. N174 <i>Bacillus pumilus</i> BN262 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> UTK
Subclass II 	<i>Bacillus</i> sp. No. 7-M
Subclass III  	<i>Streptomyces griseus</i> HUT6037 <i>Bacillus circulans</i> WL-12 <i>Bacillus circulans</i> MH-K1
Subclass IV   	<i>Amycolatopsis</i> sp. CsO-2 <i>Pseudomonas</i> sp. A-01

● ; GlcN, ○ ; GlcNAc, ▼ ; Cleavage point

第5章 総括

キチン質は、生物界に広く分布し、セルロースに次いで生成量が多いと言われているが、資源として利用されているのは数%であり、その大部分は未利用のままである。しかしながら、近年、キチンおよびキトサンの分解産物であるキチンオリゴ糖およびキトサンオリゴ糖に抗腫瘍活性、免疫賦活活性、エリクター活性および細菌の増殖抑制など様々な生理活性が見いだされており、これらキトオリゴ糖を効率よく調製する方法が求められている。これらオリゴ糖の酵素的調製法を開発するために、キチン質分解酵素であるキチナーゼやキトサナーゼの研究が盛んに行われている。本研究は、キチン質分解酵素を用いることにより糖配列および重合度の明確なヘテロキトオリゴ糖を調製し、未だ詳細な研究が行われていないアセチル基のキトサナーゼ活性におよぼす影響の解明およびキトサナーゼ切断特異性を明らかにすることを目的とした。本論文は、ヘテロキトオリゴ糖を用いたキトサナーゼ活性測定法および切断特異性決定法の開発、アセチル基のキトサナーゼ活性におよぼす影響、さらには新規な切断特異性をもつキトサナーゼの存在を明らかにした研究成果をまとめたものである。

Aspergillus fumigatus は、数種のキチナーゼおよびキトサナーゼ、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ、エキソ- β -グルコサミニダーゼを菌体外に分泌する。また、本菌は、キトサン分解能が高く、高重合度キトオリゴ糖の製造に非常に有効であると考えられる(Kim *et al.*, 1998、Cheng *et al.*, 2000、Eom *et al.*, 2003、Cheng *et al.*, 2006)。そこで、第2章において *A. fumigatus* ATCC13073 が生産する主要なキトサナーゼである分子量 23,500 のキトサナーゼ、

AF キトサナーゼ II の精製法を確立し、酵素化学的性質を明らかにした。AF キトサナーゼ II は、CM-Sephadex C-50 による陽イオン交換クロマトグラフィーおよび Sephadex G-100 を用いたゲルろ過によって電気泳動的に均一に精製された。AF キトサナーゼ II の N 末端アミノ配列について BLAST を用いたホモロジー検索により、糸状菌由来のキトサナーゼが分類されている糖質加水分解酵素ファミリーである、GH-75 に属するキトサナーゼと高い相同性を示した。AF キトサナーゼ II の至適 pH は 6.0 で、他の GH-75 キトサナーゼの至適 pH と類似していた。一方、至適温度は、60-70 °C である他の *Aspergillus* 属由来キトサナーゼよりも低く、40°C であった。他の *Aspergillus* 属由来キトサナーゼ(Kim *et al.*, 1998、Cheng *et al.*, 2000、Eom *et al.*, 2003)が部分的にアセチル化されたキトサンよりも 100%脱アセチル化されたキトサンをよく分解するのに対し、本酵素は、70%脱アセチル化されたキトサンを最もよく分解し、脱アセチル化度が上昇するにつれ活性は減少した。また、AF キトサナーゼ II によるキトサン分解生成物の構造を分析したところ、本酵素の切断特異性は、GlcN-GlcN 間および GlcNAc-GlcN 間を切断する Subclass I に分類されることが明らかとなった。自然界に存在するキトサンは完全に脱アセチル化されておらず、20-30%程度アセチル化されている。本酵素がもつ脱アセチル化度 70%のキトサンを最もよく分解するという特徴は、本菌が自然界に存在するキトサンを効率よく資化するために有利であると考えられる。

このように、未利用バイオマスであるキチン質の分解を効率よく行うキトサナーゼが発見され、生理活性を有するキトオリゴ糖の調製への応用が期待される一方で、キトサナーゼ間における

活性の比較は困難である。一般的に、キトサナーゼ活性は、部分 *N*-アセチルキトサンを基質として用い、酵素分解により生成してくる還元糖量を Schales (1945)法などにより定量することにより測定されている。この方法は、容易で感度も良好であるという利点を持っているが、基質となる可溶性のキトサンあるいは不溶性のコロイダルキトサンは、重合度、脱アセチル化度およびアセチル基の分布が調製品ごとに異なっており、測定されたキトサナーゼ活性を相対的に比較できない。また、キチナーゼも部分 *N*-アセチルキトサンを分解するため、キチナーゼ活性とキトサナーゼ活性を厳密に区別することはできない。そこで、第 3 章では、10S-24 キチナーゼ II を用いて部分 *N*-アセチルキトサンを分解し、(GlcN)₅-GlcNAc を調製し、本ヘテロキトオリゴ糖のキトサナーゼ活性測定における基質としての有用性について検討した。本酵素を用いることにより、調製される *N*¹-モノアセチルキトサンオリゴ糖は、還元末端に GlcNAc 残基を有することから、C-1 位が遊離のカルボニル基、C-2 位に遊離のアミノ基をもつ糖の測定法である Randle-Morgan 法において基質由来の発色を抑えることができると考えられた(Fig. 3-15)。また、*N*¹-モノアセチルキトサンオリゴ糖は糖配列および重合度が明確なため、調製毎に重合度、アセチル化度および糖配列が異なるキトサンを用いたこれまでの活性測定法とは異なり、キトサナーゼ間の活性の比較が行える利点も挙げられる。まず、(GlcN)₁₋₆、(GlcN)₁₋₅-GlcNAc、(GlcNAc)₁₋₆ および(GlcN)₁₋₅-GlcN^{ol} の Randle-Morgan 法による呈色について検討した。アミノ糖の定量法である本法では、還元末端に GlcNAc 残基を有する(GlcN)₁₋₅-GlcNAc および(GlcNAc)₁₋₆ は呈色しないと予想されたが(福井, 1969)、(GlcNAc)₁₋₆ および(GlcN)₁₋₅-GlcNAc

は、それぞれ(GlcN)₁₋₆に比べ 1/10 および 1/5 程度であるが発色した。これらのモル吸光係数は重合度に関係なくほぼ一定であったことから、還元末端の数に比例し呈色されていると考えられる。また、還元末端が還元された(GlcN)₁₋₅-GlcN^{ol}は呈色しなかった。(GlcN)₁₋₅-GlcNAc は基質由来の発色が抑えられ、(GlcN)₁₋₅-GlcN^{ol} は呈色しなかったことから、両オリゴ糖は活性測定用の基質として有用であると考えられた。これらオリゴ糖を基質として用い、AF キトサナーゼ II、7M キトサナーゼおよび MH-K1 キトサナーゼについて活性測定を行った。その結果、(GlcN)₅-GlcN^{ol}は、AFキトサナーゼ IIでは全く分解されず、全てのキトサナーゼに対する基質にはならなかった。一方、(GlcN)₅-GlcNAc は、今回用いた全ての酵素で分解され、本ヘテロキトオリゴ糖はキトサナーゼ活性測定用基質として有用であることが示された。また、全ての酵素において、(GlcN)₆よりも(GlcN)₅-GlcNAc の分解活性が高く、このことから切断サイト以外のサブサイトに結合する基質のアセチル基がキトサナーゼ活性に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。

N174 キトサナーゼは、(-3)(-2)(-1)(+1)(+2)(+3)という 6 つのサブサイト構造をもっており、(-1)(+1)間で基質を切断することが報告されている。また、他のキトサナーゼも N174キトサナーゼと同じ分解産物を生成することから同様のサブサイト構造をもつことが示唆されている。そこで、(GlcN)₅-GlcNAc のもつアセチル基が酵素活性におよぼす影響、すなわち、(+3)サイトにおけるアセチル基の影響について、AF キトサナーゼ II、7M キトサナーゼおよび MH-K1 キトサナーゼを用い、速度論的解析を行うことにより検討した。AF キトサナーゼ II において、

(GlcN)₅-GlcNAc に対する K_m 値は(GlcN)₆ に対する K_m 値に比べ約 0.5 倍になり、親和性が増すことにより、分解効率が上昇することが示された。また、7M キトサナーゼにおいては 1.4 倍の、MH-K1 キトサナーゼにおいては約 4 倍の親和性の上昇が見られた。これらの結果は、今回用いた全てのキトサナーゼが(+3)サイトにおいて GlcN 残基よりも GlcNAc 残基を認識していることを示している。一方、Subclass I および III のように部分 N-アセチルキトサン分子中の GlcN-GlcN 間だけでなく GlcNAc-GlcN 間および GlcN-GlcNAc 間を切断するキトサナーゼは、(-1)および(+1)サイトで GlcNAc を認識し分解効率を上昇させていると考えられている。そこで、AFキトサナーゼ II を用い、N⁴-モノアセチルキトヘキサオースに対する速度パラメータを求めた。(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₃ を基質としたときの(-1)サイトにおける K_m 値は、(GlcN)₆ を基質としたときに比べ約 6.7 倍になり、AFキトサナーゼの(-1)サイトは、GlcNAc 残基よりも GlcN 残基をより認識しすることが明らかとなった。

また、これまでのキトサナーゼ研究では切断様式の解明にはグルコサミンオリゴ糖が用いられており、多くのエンド型キトサナーゼは 6 糖の分解産物として 3 糖だけではなく、少量の 2 および 4 糖を生成するため、切断箇所の特定制や切断頻度を求めることは困難であった。今回調製した(GlcN)₅-GlcNAc を基質とした場合、GlcNAc 残基が 210 nm の波長に対し吸光を示すことから、少量の基質で感度良く分析を行うことができ、また、還元末端がアセチル基でラベル化されているため切断箇所の特定制も容易に行える。そこで、上記 3 種のキトサナーゼによる(GlcN)₆ および(GlcN)₅-GlcNAc 分解生成物を HPLC により分析した結果、7M キトサナーゼは、

(GlcN)₅-GlcNAc を基質とした場合、(GlcN)₆を基質としたときに比べ、非還元末端から 3 番目の結合の分解頻度が 20%程度上昇した。これは、(+3)サイトがアセチル基を認識することにより酵素-基質の結合がより強固になったためであると考えられる。一方、AF キトサナーゼ II および MH-K1 キトサナーゼは、(GlcN)₆を基質としたときに比べ、(GlcN)₅-GlcNAc を基質とした場合、非還元末端から 2 番目の結合を切断する割合が上昇した。これは、アセチル基を認識するアミノ酸が、(+3)サイトのさらに外側に存在していることを示唆しており、(+3)サイト近傍により強くアセチル基を認識するため、(GlcN)₅-GlcNAc に対し親和性が上昇したと考えられる。また、これら、(+3)サイトおよびその近傍におけるアセチル基の認識による親和性の上昇は、キトサナーゼが完全に脱アセチル化されたキトサンよりも、むしろ、20-30%程度アセチル化されたキトサンをよく分解するという、これまで報告されてきたデータを裏付けるものとなった。

さらに、第 4 章では、*N*¹,*N*⁴-ジアセチルキトヘキサオースを用いた切断特異性の解析法について検討した。キトサナーゼは、部分 *N*-アセチルキトサンに対する切断特異性から 3 つの Subclass に分類されきたことは既に述べた。これまで行われてきた切断特異性の解析法では、キトサナーゼによるキトサン分解生成物を陽イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過により分離精製し、得られた画分の糖配列を MALDI-TOF MS およびエキソグリコシダーゼ分解 (Mitsutomi *et al.*, 1992)、あるいは、MS および NMR (Fukamizo *et al.*, 1994)により決定する方法や、キトサン分解生成物を質量分析法(Bahrke *et al.*, 2002)により解析し、糖配列を決定することにより行われてきた。しかしながら、糖配列を決定するためには、多くの時間と労力、MS や

NMR などの分析機器を必要とする。キトサナーゼのサブサイト構造およびその切断特異性から、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc の糖配列をもつヘテロキトヘキサオースは切断特異性解析用の基質として有用であると考えた。そこで、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc 分解生成物の TLC 分析により切断特異性を解析する方法を開発した。AF キトサナーゼ II (Subclass I) を(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc に作用させたところ、(GlcN)₂-GlcN を生成した。また、7M キトサナーゼ(Subclass II)では分解せず、MH-K1 キトサナーゼ(Subclass III)では、(GlcN)₂ および GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc を生成した。これらの結果は、部分 *N*-アセチルキトサンを用いて決定された切断特異性と一致し、*N*¹,*N*⁴-ジアセチルキトヘキサオースを用いることにより、迅速かつ容易に切断特異性を決定できることが示された。さらに、切断特異性が明らかでない CsO-2 および A-01 キトサナーゼについて、本解析法を用いて切断特異性を検討したところ、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc から、(GlcN)₂、(GlcN)₂-GlcN および GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc が生成された。この結果は、両酵素が GlcN-GlcNAc 間および GlcNAc-GlcN 間を切断することを示しており、従来の Subclass 分類に当てはまらない切断特異性を示した。そこで、CsO-2 キトサナーゼを部分 *N*-アセチルキトサンに作用させ、生成したオリゴ糖を分析したところ、還元末端および非還元末端に GlcN 残基を有するキトオリゴ糖として(GlcN)₂、(GlcN)₃、GlcN-GlcNAc-GlcN および GlcN-GlcNAc-(GlcN)₂が、還元末端に GlcN 残基および非還元末端に GlcNAc 残基をもつヘテロキトオリゴ糖として GlcNAc-(GlcN)₃が、還元末端に GlcNAc 残基および非還元末端に GlcN 残基をもつヘテロキトオリゴ糖として GlcN-GlcNAc および

(GlcN)₂-GlcNAc が確認された。また、CsO-2 キトサナーゼは、キチンオリゴ糖を切断しないことから、GlcN-GlcN 間、GlcN-GlcNAc 間および GlcNAc-GlcN 間を特異的に加水分解することが示された。このことから、キトサナーゼの切断特異性は、GlcN-GlcN 間および GlcNAc-GlcN 間を切断する Subclass I、GlcN-GlcN 間のみを切断する Subclass II、GlcN-GlcN 間および GlcN-GlcNAc 間を切断する Subclass III に加え、GlcN-GlcN 間、GlcN-GlcNAc 間および GlcNAc-GlcN 間を切断する Subclass IV を含めた 4 つの Subclass に分類されることが明らかとなった。また、N¹,N⁴-ジアセチルキトヘキサオースを用いた切断特異性の解析法は、Subclass I、II、III および IV のいずれも分類することが可能であり、本方法が、キトサナーゼの切断特異性の解析を簡易、迅速に行う優れた方法であることが示された。

以上述べたように、糖配列が明確なヘテロキトオリゴ糖は、キトサナーゼ研究において有用な基質であることが示された。キトサナーゼの詳細な酵素反応解析には、種々の糖配列を有するヘテロキトオリゴ糖の調製法の開発が望まれる。また、今回明らかになったキトサナーゼのサブサイトに対するアセチル基の影響および新規の切断特異性は、機能性キトオリゴ糖の酵素的調製への応用に重要な知見を与えるものと考えられる。キトサナーゼの研究がさらに進み、糖鎖工学的応用が行われれば、多種多様な配列および重合度をもったキトオリゴ糖の調製が可能となり、医薬品、化粧品、食品、農林業および工業など様々な分野での応用が期待できると考えられる。豊富な未利用バイオマスであるキチンおよびキトサンの利用に際し、キトサナーゼ研究は非常に重要であり、本研究がその一助を担えることを期待する。

参考文献

- Adachi W, Sakihama Y, Shimizu S, Sunami T, Fukazawa T, Suzuki M, Yatsunami R, Nakamura S, and Takénaka A, Crystal structure of family GH-8 chitosanase with subclass II specificity from *Bacillus* sp. K17, *Journal of Molecular Biology*, **343**, 785–795 (2004).
- Ando A, Saito A, Arai S, Usuda S, Furuno M, Kaneko N, Shida O, and Nagata Y, Molecular characterization of a novel family-46 chitosanase from *Pseudomonas* sp. A-01, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **72**, 2074-2081 (2008).
- Bahrke S, Einarsson JM, Gislason J, Haebel S, Letzel MC, Peter-Katalinić J, and Peter MG, Sequence analysis of chitooligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization postsorce decay mass spectrometry, *Biomacromolecules*, **3**, 696-704 (2002).
- Bartnicki-Garcia S., Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi, *Annual Review of Microbiology*, **22**, 87-108 (1968).
- Boucher I, Dupuy A, Vidal P, Neugebauer WA, and Brzezinski R, Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **38**, 188-193 (1992).
- Boucher I, Fukamizo T, Honda Y, Willick GE, Neugebauer WA, and Brzezinski R, Site-directed mutagenesis of evolutionary conserved carboxylic amino acids in the chitosanase from *Streptomyces* sp. N174 reveals two residues essential for catalysis, *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 31077-31082 (1995).
- Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254 (1976).
- Chen X, Xia W, and Yu X, Purification and characterization of two types of chitosanase from *Aspergillus* sp. CJ22-326, *Food Research International*, **38**, 315-322 (2005).
- Cheng CY and Li YK, An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **32**, 197-203 (2000).

- Cheng CY, Chang CH, Wu YJ, and Li YK, Exploration of glycosyl hydrolase family 75, a chitosanase from *Aspergillus fumigatus*, *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 3137–3144 (2006).
- Elson LA and Morgan WTJ, A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine, *Biochemical Journal*, **27**, 1824-1828(1933).
- Eom TK and Lee KM, Characteristic of chitosanase from *Aspergillus fumigatus* KB-1, *Archives of Pharmacal Research*, **26**, 1036-1041 (2003).
- Escott GM, Hearn VM, and Adams DJ, Inducible chitinolytic system of *Aspergillus fumigatus*, *Microbiology*, **144**, 1575-1581 (1998).
- Fenton DM and Eveleigh DE, Purification and mode of action of a chitosanase from *Penicillium islandicum*, *Journal of General Microbiology*, 126, 151-165 (1981).
- Fukamizo T, Honda Y, and Goto S, Reaction mechanism of chitosanase from *Streptomyces* sp. N174, *Journal of Biochemistry*, **311**, 377-383 (1995).
- Fukamizo T, Ohkawa T, Ikeda Y, and Goto S, Specificity of chitosanase from *Bacillus pumilus*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1205, 183-188 (1994).
- 深沢徹也, 遠藤みき子, 中村 総, 土壌から分離した細菌 *Bacillus* sp. strain K17 が分泌するキトサナーゼの精製と性質, *キチン・キトサン研究*, **7**, 154–155 (2001).
- 福井作蔵, “還元糖の定量法 第2版”, pp.119-141, 学会出版センター (1990).
- Gao XA, Ju WT, Jung WT, and Park RD, Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus cereus* D-11, *Carbohydrate Polymers*, **72**, 513-520 (2008).
- Gao XA, Jung WJ, Kuk JH, and Park RD, Reaction pattern of *Bacillus cereus* D-11 chitosanase on chitooligosaccharide alcohols, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **19**, 358-361 (2009).
- Henrissat B, A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochemical Journal*, **280**, 309-316 (1991).
- Henrissat B, New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochemical Journal*, **293**, 781-788 (1993).

- Henrissat B, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, *Biochemical Journal*, **316**, 695-696 (1996).
- Hirano K, Arayaveerasid S, Seki K, Adams DJ, and Mitsutomi M, Characterization of a chitosanase from *Aspergillus fumigatus* ATCC13073, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **76**, 1523-1528 (2012 a).
- Hirano K, Watanabe M, Seki K, Ando A, Saito A, and Mitsutomi M, Classification of chitosanases by hydrolytic specificity toward N^1 , N^4 -diacetylchitohexaose, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **76**, 1932-1937 (2012 b).
- 平野茂博, “キチン・キトサン開発技術”, pp.1-6, シーエムシー出版 (2004).
- Hirano S, Iwata M, Yamanaka K, Toda T, and Inui H, Enhancement of serum lysozyme activity by injecting a mixture of chitosan oligosaccharides intravenously in rabbits, *Agricultural and Biological Chemistry*, **55**, 2623-2625 (1991).
- Hirano S, Hayashi M, Nishida T, and Yamamoto T, Chitinase activity of some seeds during their germination process and its induction by treating with chitosan and derivatives, *Proceeding from the 4th International Conference on Chitin and Chitosan*. Elsevier Applied Science, UK, pp. 743-774 (1989).
- Ike M, Ko Y, Yokoyama K, Sumitani J, Kawaguchi T, Ogasawara W, Okada H, and Morikawa Y, Cellobiohydrolase I (Cel7A) from *Trichoderma reesei* has chitosanase activity, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **47**, 159-163 (2007).
- Imoto T and Yagishita K, A simple activity measurement of lysozyme, *Agricultural and Biological Chemistry*, **35**, 1154-1156 (1971).
- Izume M, Nagae S, Kawagishi H, Mitsutomi M, and Ohtakara A, Action pattern of *Bacillus* sp. No.7-M chitosanase on partially *N*-acetylated chitosan, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **56**, 448-453 (1992).
- Jeon YJ and Kim SK, Production of chitoooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity, *Carbohydrate Polymers*, **44**, 71-76 (2000).

- Jeuniaux C, Recherches Sur Les Chitinases I. – Dosage Nephelometrique et Production de Cheieinase par des Streptomycetes, *Archives internationales de physiologie et de biochimie*, **66**, 408-427 (1958).
- Jo YY, Jo KJ, Jin YL, Kim KY, Shim JH, Kim YW, and Park RD, Characterization and kinetics of 45 kDa chitosanase from *Bacillus* sp. P16, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **67**, 1875-1882 (2003).
- 金城正和, 奥山健二, “キチン・キトサン開発技術”, p.7-32, シーエムシー出版 (2004).
- Karas M, Bachman D, Bahr U, and Hillenkamp F, Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **78**, 53-68 (1987).
- Kendra DF and Hadwiger LA, Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*, *Experimental Mycology*, **8**, 276-281 (1984).
- Kim SK, Rajapakse N, and Shahidi F, “Marine Nutraceuticals and Functional Foods”, eds. Barrow C and Shahidi F, CRC Press, pp.183-194 (2008).
- Kim SY, Shon DH, and Lee KH, Purification and characterization of two types of chitosanase from *Aspergillus fumigatus* KH-94, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **8**, 568-574 (1998).
- Kobayashi T, Koide O, Deguchi S, and Horikoshi K, Characterization of chitosanase of a deep biosphere *Bacillus* strain, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **75**, 669-673 (2011).
- Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- Marcotte EM, Monzingo AF, Ernst SR, Brzezinski R, Robertus JD, X-ray structure of an anti-fungal chitosanase from *Streptomyces* N174, *Nature Structural & Molecular Biology*, **3**, 155-162 (1996).
- Matsuda Y, Iida Y, Shinogi T, Kakutani K, Nonomura T, and Toyoda H, In vitro suppression of mycelial growth of *Fusarium oxysporum* by extracellular chitosanase of *Sphingobacterium*

- multivorum* and cloning of the chitosanase gene *csnSM1*, *Journal of General Plant Pathology*, **67**, 318-324 (2001).
- Mitsutomi M, Ohtakara A, Fukamizo T, and Goto S, Action pattern of *Aeromonas hydrophila* chitinase on partially *N*-acetylated chitosan, *Agricultural and Biological Chemistry*, **54**, 871-887 (1990).
- Mitsutomi M and Ohtakara A, Difference between microbial chitinase and chitosanase in the mode of action on partially *N*-acetylated chitosan, "Advances in Chitin and Chitosan," eds. Brine CJ, Sanford RA, and Zikakis JP, Elsevier, London, pp. 304-313 (1992).
- Mitsutomi M, Hata T, and Kuwahara T, Purification and characterization of novel chitinases from *Streptomyces griseus* HUT 6037, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **80**, 153-158 (1995 a).
- Mitsutomi M, Kidoh H, Tomita H, and Watanabe T, The Action of *Bacillus circulans* WL-12 chitinases on partially *N*-acetylated chitosan, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **95**, 529-531 (1995 b).
- Mitsutomi M, Ueda M, Arai M, Ando A, and Watanabe T, Action patterns of microbial chitinases and chitosanases on partially *N*-acetylated chitosan, "Chitin Enzymology," ed. Muzzarelli RAA, pp. 273-284, Atec Edizioni, Ancona (1996).
- Mitsutomi M, Uchiyama A, Yamagami T and Waranabe T, Mode of action of family 19 chitinases, "Advances in Chitin Science", vol. 2, eds. A. Domard, G. A. F. Roberts and K. M. Vårum, p. 250-255, Jacques Andre, Lyon (1997).
- Mitsutomi M, Isono M, Uchiyama A, Nikaidou N, Ikegami T, and Watanabe T, Chitosanase activity of the enzyme previously reported as β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus circulans* WL-12, *Bioscience, Biotechnoogy, and Biocheistry*, **62**, 2107-2114 (1998).
- 光富 勝, 還元末端基に *N*-アセチル基を持つモノ *N*-アセチルキトサンオリゴ糖, キチン・キトサンの開発と応用, シーエムシー出版, pp. 77-85 (2004).
- Ohtakara A, Yoshida M, Murakami M, and Izumi T, Purification and characterization of β -*N*-acetylhexosaminidase from *Pycnoporus cinnabarinus*, *Agricultural and Biological Chemistry*, **45**, 239-247 (1981).

- Ohtakara A, Matsunaga H, and Mitsutomi M, Action pattern of *Streptomyces griseus* chitinase on partially *N*-acetylated chitosan, *Agricultural and Biological Chemistry*, **54**, 3191-3199 (1990).
- Okajima S, Ando A, Shinoyama H, and Fujii T, Purification and characterization of an extracellular chitosanase produced by *Amycolatopsis* sp. CsO-2, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **77**, 617-620 (1994).
- 岡嶋正治, 安藤昭一, 篠山浩文, 藤井貴明, 三上 襄, *Amycolatopsis* sp. CsO-2 によるフレーク状キトサン培地において生産されるキトサナーゼ, *生物工学会誌*, **72**, 1-8 (1994).
- Park JK, Shimono K, Ochiai N, Shigeru K, Kurita M, Ohta Y, Tanaka K, Matsuda H, and Kawamukai M, Purification, characterization, and gene analysis of a chitosanase (ChoA) from *Matsuebacter chitosanotabidus* 3001, *Journal of Bacteriology*, **181**, 6642-6649 (1999).
- Qin C, Du Y, Xiao L, Li, and Gao X, Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity, *International Journal of Biological Macromolecules*, **31**, 111-117 (2002).
- Rondle CJM and Morgan WTJ, The determination of glucosamine and galactosamine, *Biochemical Journal*, **61**, 586-589 (1955).
- Rupley JA, The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme, *Biochimica et Biophysica Acta*, **83**, 245-255 (1964).
- Saito J, Kita A, Higuchi Y, Nagata Y, Ando A, and Miki K, Crystal structure of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1 at 1.6-Å resolution and its substrate recognition mechanism, *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 30818-30825 (1999).
- Schales O and Schales S, A simple method for the determination of glucose in blood, *Archives of Biochemistry*, **8**, 285-292 (1945).
- Seki K, Tateishi K, and Uchida Y, Action pattern of chitosanase from *Bucillus amyloliquefaciens* UTK on partially *N*-acetylated chitosan, *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Saga University*, **85**, 109-116 (2000).

千手諒一, “コロイド滴定法”, 南江堂 (1969).

Shimosaka M, Kumehara M, Zhang XY, Nogawa M, and Okazaki M, Cloning and characterization of a chitosanase gene from the plant pathogenic fungus *Fusarium solani*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **82**, 426–431(1996).

Shimosaka M, Nogawa M, Ohno Y, and Okazaki M, Chitosanase from the plant pathogenic fungus, *Fusarium sokani* f. sp. phaseoli-purification and some properties, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **57**, 231-235 (1993).

Suzuki K, Mikami T, Okawa Y, Tokoro A, Suzuki S, and Suzuki M, Antitumor effect of hexa-*N*-acetylchitohexaose and chitohexaose, *Carbohydrate Research*, **151**, 403-408 (1986).

Tanabe T, Morinaga K, Fukamizo T, and Mitsutomi M., Novel chitosanase from *Streptomyces griseus* HUT 6037 with transglycosylation activity, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **67**, 354-364 (2003).

内田 泰, 武田英典, 大熊淳司, 関 清彦, *Penicillium* sp.の生産するエキソ-β-グルコサミニダーゼの精製と性質及びその応用, *キチン・キトサン研究*, **2**, 138-139 (1995).

Uchida Y, Izume M, and Ohtakara A, Purification and enzymatic properties of chitosanase from *Bucillus* sp. No.7-M, *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Saga University*, **66**, 105-116 (1989).

Uchida Y, Tateishi K, Yamaguchi K, and Takeda H, Purification and characterization of chitosanase produced by *Bucillus licheniformis* UTK, *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Saga University*, **77**, 53-63 (1994).

Ueda M and Arai M, Purification and some properties of chitinase from *Aromonas* sp. No.10S-24, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **56**, 460-464 (1992).

Vogel HJ, Distribution of Lysine Pathways among Fungi: Evolutionary Implications, *American Naturalist*, **98**, 435-446 (1964).

Yabuki M, Uchiyama A, Suzuki K, Ando A, and Fujii T, Purification and properties of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1, *Journal of General and Applied Microbiology*, **34**, 255-270 (1988).

Zhang XY, Dai AL, Kuroiwa K, Kodaira R, Nogawa M, Shimosaka M, and Okazaki M, Cloning and characterization of a chitosanase gene from the koji mold *Aspergillus oryzae* strain IAM 2660, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **65**, 977-81(2001).

Zivanovic S, Basurto CC, Chi S, Davidson PM, and Weiss J, Molecular weight of chitosan influences antimicrobial activity in oil-in-water emulsions, *Journal of Food Protection*, **67**, 952-959 (2004).

謝辞

本研究を遂行し、本論文を執筆するに当たり、全構成にわたって終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました佐賀大学農学部 光富 勝教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本論文を取りまとめるに当たり詳細に御指導を賜り、御校閲の労をおとり頂きました、佐賀大学農学部 関 清彦講師に深く感謝申し上げます。

本論文を取りまとめるに当たり御審査下さいました佐賀大学 藤田修二教授、鹿児島大学 八木史郎教授、杉元康志教授、琉球大学 外山博英教授に深く感謝申し上げます。

本研究を行うに当たり、MH-K1 キトサナーゼ、CsO-2 キトサナーゼおよび A-01 キトサナーゼを御恵与頂き、また、有益な御助言、御討論頂きました、千葉大学大学院 安藤昭一教授並びに、静岡理工科大学 齋藤明広准教授に感謝の意を表します。

本研究を遂行するに当たり、*A. fumigatus* ATCC13073 株を御恵与頂きました Leeds 大学 David J. Adams 博士、JM109/pUC-*chi II* を御恵与頂いた大阪府立大学大学院 上田光宏准教授に感謝いたします。

本研究は、佐賀大学農学部食品化学研究室において遂行されたものであり、共同研究者で

ある Sitthinan Arayaveerasid 氏、渡辺真通氏に感謝いたします。また、実験その他において多くの御協力および励ましを頂いた岩崎純也氏を始めとする佐賀大学農学部食品化学研究室の諸氏に御礼申し上げます。

最後に、勉学に対し快く理解し、これまで物心両面のみならず、いつも暖かく見守ってくれた平野宗宏並びに平野富貴子に心から深く感謝の意を表します。