

学 位 論 文 要 旨

氏 名 平野 勝紹

題 目 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)

グルコサミン(GlcN)および *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を構成糖とし、生理活性を有するキトオリゴ糖の酵素的調製にキトサナーゼは有用であり、キトサナーゼの加水分解特異性の解明はキトオリゴ糖の酵素的調製法の開発に重要な知見を与える。*Streptomyces* sp. 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、分解産物の分析から他のキトサナーゼも同様のサブサイト構造をもつと考えられる。そこで、糖配列の明確なキトヘキサオースを酵素的に調製し、ヘテロキトヘキサオースの基質としての有用性、アセチル基のキトサナーゼ活性におよぼす影響について検討した。さらにヘテロキトヘキサオースを用い、簡便なキトサナーゼの切断特異性の解析法を開発した。

(GlcN)₅-GlcNAcの基質としての有用性を検討した結果、(GlcN)₅-GlcNAcは、使用した全てのキトサナーゼにより分解され、呈色反応において基質由来の発色を低減できることからキトサナーゼ活性測定の基質として有用であった。また、(GlcN)₅-GlcNAcは還元末端がアセチル基によりラベル化されているため、切断部位および切断頻度を明らかにすることができた。*Aspergillus fumigatus* ATCC13073由来キトサナーゼIIは、GlcN-GlcN間、GlcN-GlcNAc間を切断するSubclass Iに属することを明らかにした。本酵素は(GlcN)₆よりも(GlcN)₅-GlcNAcに対し高い分解活性を示したことから、基質に存在するGlcNAc残基がキトサナーゼ活性に影響を与えていると考えられた。(+3)サイトにおよぼすアセチル基の影響を検討したところ、キトサナーゼは、(GlcN)₆よりも(GlcN)₅-GlcNAcに対し高い親和性を示した。これは、(+3)サイトがGlcNよりもGlcNAcを認識していることを示しており、多くの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これまでの報告を支持した。

一方、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Subclass I、IIおよびIIIに分類されており、Subclass Iに属するキトサナーゼはGlcN-GlcN間およびGlcNAc-GlcN間を、Subclass IIのキトサナーゼはGlcN-GlcN間のみを、Subclass IIIのキトサナーゼはGlcN-GlcN間およびGlcN-GlcNAc間を切断する。しかしながら、その解析には多くの時間と労力、MSやNMRなどの機器を必要とする。キトサナーゼのサブサイト構造および切断特異性から、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAcを基質とし、キトサナーゼによる分解生成物をTLCにより分析することにより切断特異性の解析が容易に行えると考えた。(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAcに各Subclassに属するキトサナーゼを作用させたところ、部分 *N*-アセチルキトサンの分解産物を解析して得られた特異性と同じ結果を示した。(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAcは簡便に切断特異性を解析できることが実証された。また、本方法により *Amycolatopsis* sp. CsO-2キトサナーゼおよび *Pseudomonas* sp. A-01キトサナーゼが、従来分類されてきた切断特異性とは異なった切断特異性を示すことを明らかにした。粉の様に、キトサナーゼは加水分解特異性により4つのSubclassに分類される。

学 位 論 文 要 旨

氏 名 Katsuaki Hirano

題 目 Studies on Hydrolytic Specificity of Chitosanase
(キトサナーゼの加水分解特異性に関する研究)

Chitooligosaccharides produced by the hydrolysis of partially *N*-acetylated chitosan are known to have many biological activities. Chitosanases are produced by various bacteria and fungi, and are useful in the preparation of biofunctional chitooligosaccharides. The productive binding of hexasaccharide to the chitosanase from *Streptomyces* sp. N174 was described by a symmetrical model including subsites (-3)(-2)(-1)(+1)(+2)(+3), cleavage occurring in the middle. Furthermore, the chitosanases reported to date hydrolyze (GlcN)₆ to produce (GlcN)₃ as main product and small amounts of (GlcN)₂ and (GlcN)₄. Hence, we prepared partially *N*-acetylated chitohexaose by enzymatic degradation of partially *N*-acetylated chitosan.

Chitosanase II was purified from the culture filtrate of *Aspergillus fumigatus* ATCC13073. Analysis of the degradation products generated from partially *N*-acetylated chitosan showed that chitosanase II split GlcN-GlcN and GlcNAc-GlcN bonds but not GlcNAc-GlcNAc or GlcN-GlcNAc, suggesting that it is a Subclass I chitosanase. Reaction rate analysis of (GlcN)₅-GlcNAc suggested that the (+3) site of chitosanase II recognizes the GlcNAc residue rather than the GlcN residue of its substrate. On the other hand, the *K_m* value of chitosanase II for (GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₃ was higher than that for (GlcN)₆, which differ only at subsite (-1). Although chitosanase II can cleave both the GlcN-GlcN and the GlcNAc-GlcN bond, subsite (-1) appears preferably to recognize the GlcN over the GlcNAc residue.

Chitosanases are classified into three subclasses according to their specificity for the hydrolysis of the β-glycosidic linkages in partially *N*-acetylated chitosan molecules: Subclass I chitosanases split both GlcN-GlcN and GlcNAc-GlcN bonds, Subclass II chitosanases split only the GlcN-GlcN bond, and Subclass III chitosanases split both GlcN-GlcN and GlcN-GlcNAc bonds. The results for the hydrolytic specificities of chitosanases belonging to subclasses I, II, and III toward chitohexaose and *N*¹,*N*⁴-diacetylchitohexaose agreed with previous results obtained by analysis of the hydrolysis products of partially *N*-acetylated chitosan. Our new simple and rapid method using chitohexaose and *N*¹,*N*⁴-diacetylchitohexaose makes it possible to determine the hydrolytic specificity of chitosanase without separation of the oligosaccharide products obtained by enzymatic digestion of partially *N*-acetylated chitosan, and without MS or NMR spectrometry. Chitosanases from *Amycolatopsis* sp. CsO-2 and *Pseudomonas* sp. A-01 showed broad cleavage specificity. They cleaved both the GlcNAc-GlcN and the GlcN-GlcNAc bonds in addition to the GlcN-GlcN bond in the substrate. Thus, both enzymes were new chitosanases. The chitosanases were divided into four subclasses according to their specificity for hydrolysis of the β-glycosidic linkages in partially *N*-acetylated chitosan.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	平 野 勝 紹
審査委員	主査 佐賀大学 教授 光富 勝
	副査 佐賀大学 教授 藤田 修二
	副査 鹿児島大学 教授 八木 史郎
	副査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 琉球大学 教授 外山 博英
審査協力者	
題 目	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)
<p>キチン質の分解によって得られるグルコサミン(GlcN)および N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を構成糖とするキトオリゴ糖は種々の生理活性を示す。キトサナーゼの加水分解特異性の解明は機能性キトオリゴ糖の酵素的調製法の開発やキトサナーゼの生物学的役割を明らかにするために重要である。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いる。そこで本研究では、糖配列の明確なヘテロキトヘキサオースを調製し、ヘテロキトヘキサオースの基質としての有用性、アセチル基のキトサナーゼ活性におよぼす影響について検討した。さらに、ヘテロキトヘキサオースを用いた簡便なキトサナーゼ切断特異性の解析法を開発し、本方法により新規な切断特異性を有するキトサナーゼを発見した。得られた研究成果の概要は次の通りである。</p> <p>1) (GlcN)₅-GlcNAc の基質としての有用性を検討した結果、(GlcN)₅-GlcNAc は、使用した全てのキトサナーゼにより分解され、呈色反応において基質由来の発色を低減できることからキトサナーゼ活性測定の基質として有用であった。また、(GlcN)₅-GlcNAc は還元末端がアセチル基によりラベルされているため、切断部位および切断頻度を明らか</p>	

にすることができた。

2) *Aspergillus fumigatus* ATCC13073 が生産するキトサナーゼ II を精製し、本酵素がキトサン分子中の GlcN-GlcN 間および GlcN-GlcNAc 間を切断するサブクラス I キトサナーゼであることを明らかにした。本酵素は (GlcN)₆ よりも (GlcN)₅-GlcNAc に対し高い分解活性を示したことから、基質に存在する GlcNAc 残基がキトサナーゼ活性に影響を与えていると考えられた。(+) サイトにおよぼすアセチル基の影響を検討したところ、キトサナーゼは、(GlcN)₆ よりも (GlcN)₅-GlcNAc に対し高い親和性を示した。多くの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ことが報告されているが、(+) サイトが GlcN よりも GlcNAc に対して親和性を示すことが一つの要因であることが本研究によって示された。

3) (GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc を調製し、それを基質として各サブクラスに属するキトサナーゼについて切断特異性を調べた結果、サブクラスを決定するのに有効であることが示された。これまでキトサナーゼは、部分的に *N*-アセチル化されたキトサンの切断特異性 (GlcN-GlcN および GlcNAc-GlcN 間 ; GlcN-GlcN および GlcN-GlcNAc 間 ; GlcN-GlcN 間のみを切断) により 3 つのサブクラスに分類されてきた。本研究により *Amycolatopsis* sp. CsO-2 キトサナーゼおよび *Pseudomonas* sp. A-01 キトサナーゼが、従来分類されてきた切断特異性とは異なった切断特異性 (GlcNAc-GlcN, GlcN-GlcNAc および GlcN-GlcN 間を切断) を示すことを明らかにし、キトサナーゼを切断特異性により 4 つのサブクラスに分類することを提案した。

以上のように、本研究は糖配列が明確なヘテロキトヘキサオースがキトサナーゼの加水分解特異性の解析に極めて有用であることを明らかにするとともに、キトサナーゼの基質特異性に関して新たな知見を提供するものである。したがって、本論文は、学位論文として十分に価値あるものと判断した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	平野 勝 紹
審査委員	主査 佐賀大学 教授 光富 勝
	副査 佐賀大学 教授 藤田 修二
	副査 鹿児島大学 教授 八木 史郎
	副査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 琉球大学 教授 外山 博英
審査協力者	
実施年月日	平成25年1月17日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成25年1月17日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏名

平野 勝紹

[質問1] *Aspergillus fumigatus*をグルコサミン(GlcN)含有培地で培養することで誘導をかけているのか？

[回答1] 構成酵素として生産されているが、GlcNを加えることで生産の増強が見られる。

[質問2] 比活性が上がらず収率はよいという結果から、培地中に得られるタンパク質のほとんどがキトサナーゼであると考えられるのか？

[回答2] そのように考えている。

[質問3] GlcNによる生産抑制はないのか？

[回答3] 本酵素においては見られなかった。

[質問4] キトサナーゼのサブサイト構造は、どのような構造か？

[回答4] (-3)から(+1)サイトは酸性アミノ酸が位置し、GlcNを認識しやすい構造になっている。

[質問5] アセチル基の認識について、(-1)(+1)間にポイントがあると思われるがどう考えているか？

[回答5] サブクラスIについて(-1)サイトのアセチル基認識について検討したところ、(-1)サイトではアセチル基を認識していないと考えられる。一方、(+3)サイト近傍は、アセチル基の認識に何らかの役割を果たしていると考えている。

[質問6] 阻害剤を結合させた状態で、立体構造を検討できないのか？

[回答6] 現在、キトサナーゼ阻害剤が発見されていないため、検討することは困難である。

[質問7] SDS-PAGEと活性染色のバンドが合わないように見えるがなぜか？

[回答7] 活性染色用泳動ゲルにはキトサンが含まれるため、SDS-PAGEに比べバンドがシフトする。

[質問8] 構造解析された酵素は、6つのサブサイトであるが、他のキトサナーゼについてはどうか？

[回答8] MH-K1キトサナーゼについて言えば、オリゴ糖分解物の分析結果から、(-3)(-2)(-1)(+1)(+2)(+3)という構造よりも、(-2)(-1)(+1)(+2)(+3)(+4)というサブサイト構造であると考えられるが、実際にサブサイト構造を決定していないので、今後検討する必要がある。

[質問 9] サブクラスIVキトサナーゼについて速度論的解析は行ったのか？

[回答 9] 行っていない。

[質問 10] オリゴ糖の機能性に関し、アセチル基の数で違いは見られるか？

[回答 10] 違いはあると考えているが、これまで報告されている生理活性については糖配列の明確なオリゴ糖を用いて実験が行われていないため、どのようなオリゴ糖にどのような生理活性があるかは不明な点が多い。

[質問 11] 利用の面から考えると、今回調製したオリゴ糖の生理活性が気になるが、どのような効果が見られるか？

[回答 11] 今回酵素法により調製したオリゴ糖は、収量が少なかったため、生理活性については検討していない。

[質問 12] キトオリゴ糖調製時のキトサン溶液にアジ化ナトリウムを入れた理由はなにか？

[回答 12] 防腐剤として使用した。

[質問 13] ジアセチルキトヘキサオースの収率は満足するものか？

[回答 13] 本調製法により得られる量としては平均的であるが、加水分解特異性の解明によりさらに収率を上げたいと考えている。

[質問 14] キチナーゼがキトサンを分解する場合、その切断点は*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)間だけなのか？

[回答 14] 今回用いたキチナーゼは、脱アセチル化度が高いキトサンに対しても高い分解活性を示し、GlcNAc-GlcNAc間およびGlcNAc-GlcN間を切断する。

[質問 15] 菌類のキチナーゼおよびキトサナーゼの生産の目的はどのようなことが考えられるか？

[回答 15] 主としてキチン質の資化のために生産している。

[質問 16] キチンやキトサンの原料はカニ殻が多いのか？

[回答 16] カニやエビの殻から調製されたものが市販されているが、カニ殻が多い。