

## 低環境負荷型アセチルグルコサミン製造技術の開発

研究代表者：末 信一郎（工学研究科、教授）

共同研究者：木元 久（福井県立大学生物資源学部、准教授）

概 要	キチンは、エビ・カニなどの甲殻類や昆虫の外骨格、菌類の細胞壁などの主要な構成成分である。キチンの分解産物であるアセチルグルコサミン（GlcNAc）には、変形性関節症改善効果や美肌効果などの生理活性があることが明らかにされており健康機能性食品として注目されている。微生物による低環境負荷型 GlcNAc 製造技術の開発を目的としてキチナーゼ生産菌 <i>Paenibacillus.sp</i> FPU-7 株が得られており、さらにイオンビーム照射によって変異育種を試み、約 86 万の変異株の中から分解速度が野性株と比較して約 2 倍速い高機能株の変異育種にも成功している。ここでは、変異株の生産するキチナーゼについて諸性質を明らかにするとともに GlcNAc 発酵生産について検討を行った結果、原料比 60% の高効率で GlcNAc を生産できることを明らかにした。
関連キーワード	低環境負荷型技術、キチン、キトサナーゼ、アセチルグルコサミン、イオンビーム

### 研究の背景

キチンは N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が  $\beta$ -1,4 結合で直鎖状に重合した多糖で、エビ・カニなどの甲殻類や昆虫の外骨格、菌類の細胞壁などの主要な構成成分である。その資源量は年間 1,000 億トンと推定されており、セルロースに次いで豊富に存在する生物資源である。近年、キチンの分解産物であるアセチルグルコサミン (GlcNAc) に、ヒアルロン酸の合成促進による変形性関節症改善効果や美肌効果などの生理活性が明らかとなり、健康機能性食品として注目されている。工業的には強酸により加水分解することで GlcNAc にまで低分子化しているのが現状である。しかし、酸の中和工程では大量の塩を生じるために、処理廃液の環境への負荷は高く、製造作業上の安全性も問題になっている。一方、キチンを加水分解する酵素キチナーゼを用いれば温和な条件でキチンを加水分解することが可能であるが、キ

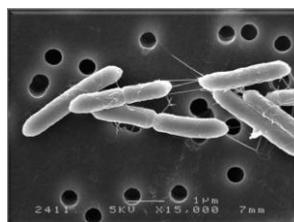


図 1 キチナーゼ生産菌 *Paenibacillus.sp* FPU-7 株

チンは不溶性の硬い結晶であることから酵素による分解速度が遅く、実用化は困難ある。

すでに共同研究者の福井県立大学生物資源学部 木元准教授らは、微生物による低環境負荷型 GlcNAc 製造技術の開発を目的としてキチナーゼ生産菌 *Paenibacillus.sp* FPU-7 株を得ている。本菌株はイオンビーム照射によって両者の代謝欠損株の育種を試み、約 86 万の変異株の中から分解速度が野性株と比較して約 2 倍速い高機能株の変異育種にも成功している。

### 研究の目的

本研究では、木元准教授との共同研究により、FPU-7 変異株株におけるキチンの分解、取り込み、代謝などの制御系や各遺伝子間の相互作用などを明らかにすることでキチン分解に関する一連の経路を解明する。また遺伝子破壊部位を全ゲノム解

析により特定し、相補実験を行い機能未知の領域を明らかにすることを目的として、エレクトロポレーションによる FPU-7 株への形質転換条件を検討する。また最終的に低環境負荷型 GlcNAc 製造技術を確立する。

## 研究の成果

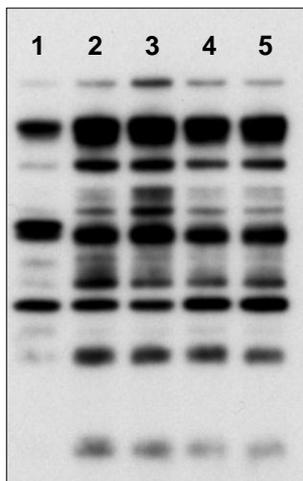


図1 ウェスタンブロットティング

抗キチナーゼ（ファミリー18に所属）抗体を用いた。

1：野生株、2-5：各変異株A～D

多く分泌していることがわかった。高いキチン分解能を持つ変異体 B 株を含めてすべての変異体はウェスタンブロット解析の結果、キチン分解能が菌体の増加量ではなくキチナーゼをコードしているタンパク質の発現量増加に起因しているものと確認された。

スクリーニングにより得られた4種類のキチン分解能向上変異株（A～D）を半合成培地（表1）を用いて培養しながらキチンの分解発酵生産を検討したところ変異体 B において原料比 60%の

酵素の発現量を比較するために抗キチナーゼ抗体を用い、全キチナーゼのウェスタンブロット解析を行った。図1に示すように野生株ではキチナーゼ由来の複数のバンドが実際に確認された。

FPU-7株生産するキチナーゼはゲノム上に10種類以上あり、優れたキチン分解能を持つ変異株はいずれも酵素を

Table1 Component of synthetic medium

Component	Composition (g/l)
Chitin	20.0
Glucose	10.0
Yeast extract	1.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.7
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.2
MgSO <sub>4</sub>	0.3

Table2 Result of fermentative production

Strain	GlcNAc yield (%)
WT	30
Mutant A	44
Mutant B	60
Mutant C	35
Mutant D	44

GlcNAc を得ることに成功した（表2）。この発酵法による GlcNAc の生産法は従来法と比較して、高い糖化効率であった。

ここまでの研究ではイオンビームを用いた変異育種において単糖である GlcNAc の代謝欠損株の取得には成功しているが 2 糖であるキトビオース代謝欠損株の取得には至っていない。今後さらにイオンビームを用いて変異育種を継続し 2 糖代謝欠損株の取得を目指す。

現在、次世代シーケンサを用いて本菌株の全ゲノム解析を行っており、解析結果からキチン代謝機構の解明を明らかにし、さらなる収率向上へとつなげていきたいと考えている。また、エレクトロポレーションによる本菌株の形質転換条件についてもすでに確立しており、今後は相補実験を併せて行っていく予定である。

## 特記事項・発表論文など

### 「本研究に関わる発表論文」

1. 大西 浩平, 木元 久, 末 信一郎  
アセチルグルコサミン生産を目指した *Paenibacillus* 属細菌の変異育種  
北陸合同バイオシンポジウム D-10  
平成 22 年 11 月 12 日
2. 大西 浩平, 木元 久, 末 信一郎  
低環境負荷型アセチルグルコサミンの生産を目指した *Paenibacillus* 属細菌の変異育種

日本農芸化学会 2011 年度大会 2C38a12

平成 23 年 3 月 26 日

### 「謝辞」

本研究を行うにあたりご協力をいただいた株式会社エルローズに記して感謝する。