キチンの効率的な分解に向けて

生態環境科学専攻　環境分子生物学講座　佐藤　禅　（D2）
（指導教官　荒木　義雄）

背景および目的　キチンは *N*-アセチルグルコサミンのポリマーおよびタンパク質などからなる糖タンパク質複合体として、カニ・エビ類をはじめとする多くの甲殻動物類の外骨格として利用されています。カニ・エビ類の大量消費国である我が国は、毎年多量のキチン廃棄物（12-17 万トン/年）を排出していると推定されます。このキチンは現在、食品、医療、環境、農業および工業などの多岐にわたる分野で有効活用がおこなわれています。しかし、キチンの利用率（1.4-1.9%）は極端に低く、未利用のキチン(10 万トン/年以上)は産業廃棄物として処理されています。そのような利用が困難なキチン（ケガニ殻およびアカエビ殻、図 1、上段）も生物由来の資源として考えられ、キチン廃棄物を効率的に分解し、分解物である *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）類を植物のエリシター活性誘導剤および工業製品の原料として、有効活用する方法を模索することは重要な事柄であると考えられます。今回の報告では、キチナーゼ分泌菌である *Bacillus cereus* CH によるケガニ殻およびアカエビ殻の分解に加え、その分解で重要な役割を担っているキチナーゼについて報告をおこないます。

結果および考察　本研究では二種の異なるキチナーゼ{キチナーゼ A (ChiA)およびキチナーゼ B (ChiB)}を分泌する *B. cereus* CH（以下、本菌と略）を用いキチン分解実験をおこなった。はじめにケガニおよびアカエビから、キチンをそれぞれ調製し、煮沸洗浄および滅菌乾燥処理を施した。その後、各キチン(0.2% w/w, 乾燥重量)を貧栄養培地（10 倍希釈キチナーゼ誘導培地）に加えキチン分解培地として用いた。あらかじめ前培養をおこなった本菌の培養液をキチン分解培地に加え（0.07% w/w, 湿重量)、一週間浸透培養（33℃）をおこなった。その後、培地の濁度の観察をおこない、キチンの分解率(=分解後の乾燥重量/分解前の乾燥重量)および GlcNAc 類の生産量を求めた。

本菌の接種および培養に伴いキチン分解培地の白濁が観察された（図 2, 本菌非添加区（－）と添加（＋）を比較した)。この結果は、本菌からキチナーゼが分泌され、ケガニ殻およびアカエビ殻が分解し、炭素源および窒素源の供給が本菌におこなわれた可能性を示唆している（図 2)。上清に分泌されたと考えられるキチナーゼを抗 ChiA 抗体および抗 ChiB 抗体を用いそれぞれ検出した。ChiA の誘導はコロイダルキチンを除く、他のキチンによってその分泌がおこなわれた（図 3 左, 1 および 2)。一方、ChiB およびその分解物は全てのキチンによって誘導され（図 3 右, 1‐3)、キチン（コロイダルキチン、ケガニ殻およびアカエビ殻）の分解で主要な役割を担っている可能性が示された（図 3)。さらに加えて、キチン残渣の観察からケガニ殻およびアカエビ殻が *B. cereus* CH の分泌するキチナーゼによって分解されていることが示された(図 1, 下段)。

次に、乾燥破砕した各キチン（0.2% w/w）をキチン分解培地に加え一週間浸透培養をおこない、各キチンの分解率および生産された GlcNAc 類を測定した。その結果、浸透培養にともなう、物理的なキチンの分解がおよそ 5〜10%存在した。そこで図 4 および図 5 では、この影響を差し引いた結果を図示した。キチナーゼの分泌にともないケガニ殻の約 45%およびアカエビ殻の約 65%が分解された（図 4)。各キチンの分解が確認された上清をフィルターろ過（除菌・除タンパク処理）後、脱アセチル化処理をおこない、生産された GlcNAc 類を *N*-グルコサミン（GlcN）類として測定した（図 5, MBTH 法)。ケガニ殻およびアカエビ殻の培養上清（100 ml）は、それぞれ、約 34 umol および約 53 umol の GlcN 類を含んでいた。この結果は、キチンの分解にともなう GlcNAc 類の生産がおこなわれている可能性を示した。また、エビ殻の分解率および GlcN の生産量がケガニに比べ大きかったこと（キチンの分解率および GlcN 類の生産量）は、エビ殻がカニ殻よりも薄く、キチンを多く含むことが主な要因となり、キチナーゼがエビ殻を効率的に分解した結果であると考えられる。今回、キチンの分解率はあまり高くなかったが、キチン分解培地への本菌の接種量を増量させることによって、各キチンの分解率を向上できると考えている。今後、GlcNAc 類の回収量を向上させる方法を検討していきたい。

図 1. 分解実験前後のキチン

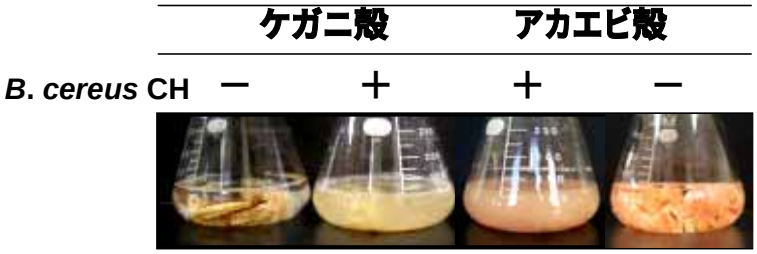

図 2. キチン分解培地における*B. cereus* CHの増殖

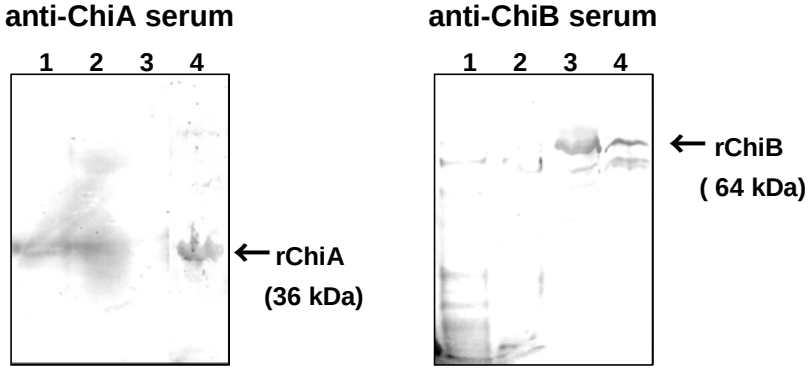

図 3. 培養上清中のキチナーゼ

各誘導剤を加え培養した培地から培養液を取り出し、上清を調整し、Western blot 法に供した(左；抗ChiA抗体、右；抗ChiB抗体)。上述した数字は以下の誘導剤で誘導された上清 (300 ug)および形質転換キチナーゼ(rChiAおよびrChiB) 5 ugをそれぞれ加えた：1, カニ殻； 2, エビ殻；3, コロイダルキチン；4 左, rChiA；4 右, rChiB.

3

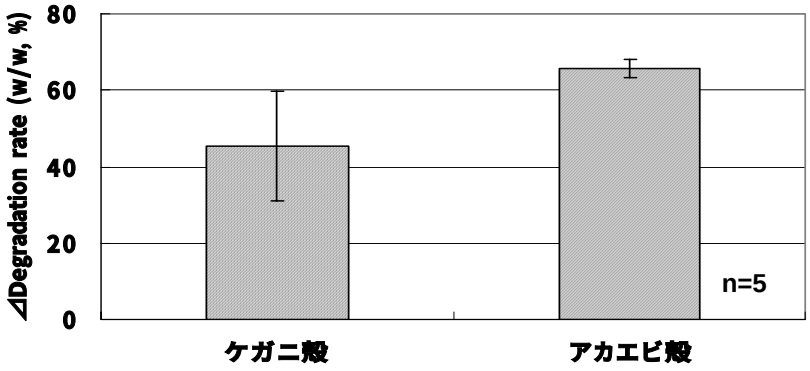

図 4. ***B. cereus*** **CHの接種のともなうキチンの分解**

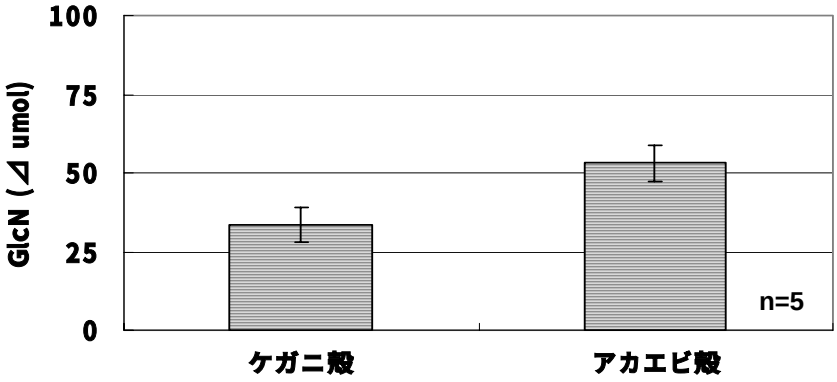

図 5. ***B. cereus*** **CHの接種にともなう*N*-グルコサミン類の生産**

学会発表

B. cereus **CHのキチナーゼ分泌に関する研究　佐藤　禅、荒木　義雄**
平成17年10月　乳酸菌研究会　北海道支部会

4