

・研究助成題目

「超好熱菌における新規なキチン資化代謝経路の同定」

・助成期間

2021年 4月 ～ 2022年 3月

・研究の目的

キチンは *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が  $\beta$ 1,4-結合で連結したホモポリマーである。バイオマスであるキチンの年間生産量はセルロースに次いで多く、その利用拡大が期待されている。本研究では超好熱菌 *Pyrococcus chitonophagus* がもつキチン資化経路の解明を進めた。これまでに本菌より新規なキチナーゼ ChiD を同定しており、本研究では本菌に関する研究をさらに進め、新規なキチン資化経路の探索を目指した。本菌はキチン依存的な生育が確認されている唯一の超好熱菌であり、多様なキチン資化経路が見つかる可能性が高いと考えた。

・研究成果

これまでに超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* で見つかった GlcNAc 代謝経路では、GlcNAc が最初に脱アセチル化酵素 (GlcNAc deacetylase) によりグルコサミン (GlcN) となった後、グルコサミンリン酸化酵素 (GlcN kinase) によりグルコサミン-6 リン酸 (GlcN6P) へと変換される (図1)。*P. chitonophagus* のゲノム上にも本経路の遺伝子ホモログ群が存在するが、本菌には他の超好熱菌には見られないタイプの GlcNAc 代謝経路を構成する遺伝子ホモログが存在する。これは GlcNAc のリン酸化酵素 (GlcNAc kinase) と、その生成物である *N*-アセチルグルコサミン-6 リン酸 (GlcNAc6P) の脱アセチル化酵素 (GlcNAc6P deacetylase) の各ホモログ遺伝子の存在である (図1の青矢印と赤矢印)。*P. chitonophagus* が、これらの酵素反応により構成される新規な GlcNAc 資化経路をもつことを予想し、各酵素の機能解析を進めた。

大腸菌を用いて調製したこれらの組換え酵素を用いて、以下の活性測定を行った。なお酵素反応は、本菌の至適生育温度である 85°C で行った。

まずはリン酸化酵素ホモログを用いて、GlcNAc とその構造類縁体に対する ATP を用いたリン酸化活性の有無、ならびに基質選択性を検討した。酵素反応後の溶液を TLC と HPLC で解析した結果、GlcNAc、*N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) において基質と ATP の減少、それに伴うリン酸化糖と ADP の生成が確認された。一方、GlcN など脱アセチル化された基質に対しては活性が検出されなかった。

次に脱アセチル化酵素ホモログを用いて、GlcNAc6P とその構造類縁体を用いた脱アセチル化活性の有無、ならびに基質選択性を検討した。反応溶液の TLC 解析および遊離酢酸の

定量を行った結果、本酵素は GlcNAc6P と *N*-アセチルグルコサミン-6 リン酸 (GalNAc6P) に対し脱アセチル化活性を示すことが判明した。

これらの結果より、本菌では GlcNAc から GlcN6P の変換に関わる代謝経路を重複して保持している可能性が示唆された。

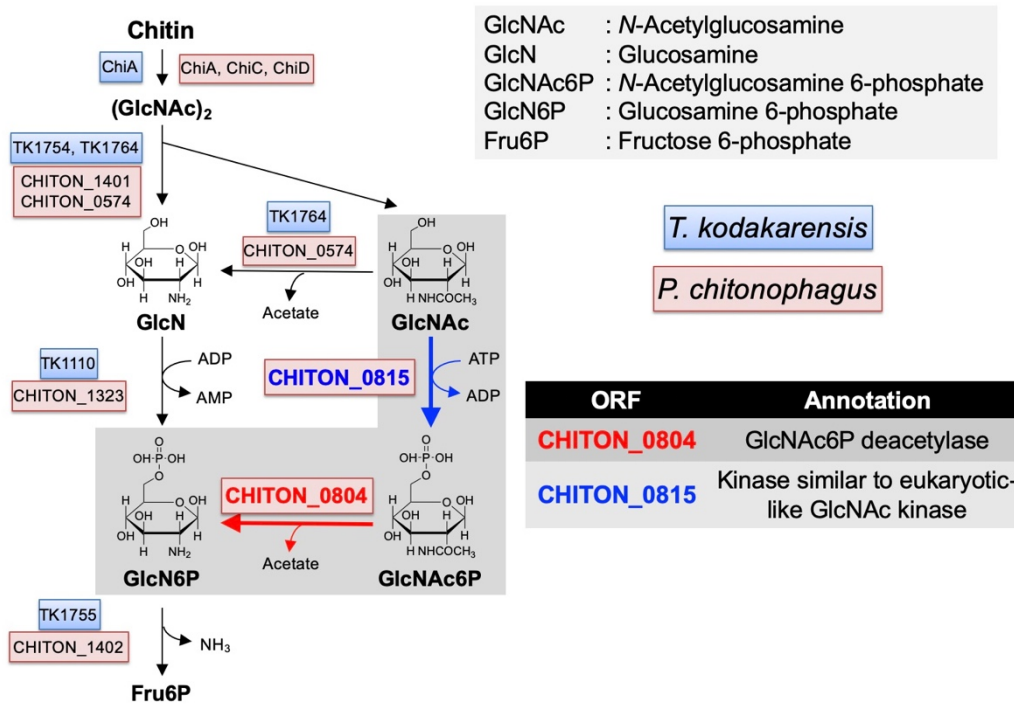


図 1 *P. chitonophagus* における GlcNAc 代謝経路

・学会発表

金井保、超好熱菌を用いたキチンからの水素生産 2021 年度日本生物工学会中部支部例会 (オンライン) 2021 年 8 月 6 日

渡邊侑、宮本大暉、金井保、跡見晴幸 超好熱性アーキア *Pyrococcus chitonophagus* における新たなキチン資化経路の発見 日本農芸化学会 2022 年度大会(オンライン) 2022 年 3 月 15-18 日