

・研究助成題目

「超好熱菌における新規な規なペプチドグリカン代謝経路の同定」

・助成期間

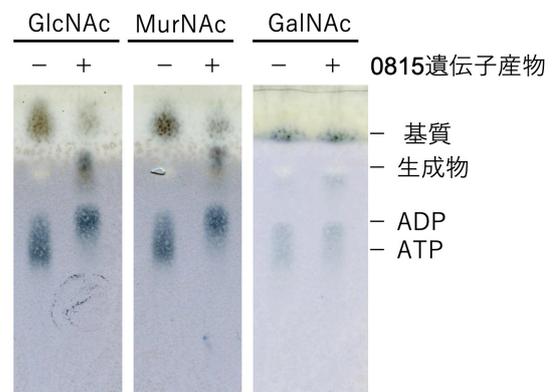
2022 年 4 月 ～ 2023 年 3 月

・研究の目的

キチンは *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が β 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・キチン関連物質の資化経路の解明を目的としている。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。これまでに本菌より構造的に新規なキチナーゼ 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。前年度までの解析により、本菌が GlcNAc からグルコサミン-6リン酸(GlcN6P)の変換に関わる代謝経路を、複数保持している可能性が示されている。

・研究成果

これまでに *P. chitonophagus* の 0804 遺伝子産物が GlcNAc-6 リン酸脱アセチル化活性をもち、また 0815 遺伝子産物が GlcNAc リン酸化活性をもつことを示している。今回は 0815 遺伝子産物の基質特異性を調べるため、GlcNAc の構造類縁体を用いて ATP を用いたリン酸化活性の有無を検討した。その結果、本酵素が GlcNAc 以外に *N*-アセチルムラミン酸 (MurNAc) を基質として用いた際に、基質と ATP が減少し、それに伴うリン酸化糖と思われる物質と ADP の生成が確認された (Fig. 1)。一



(Fig. 1) 0815 遺伝子産物の酵素活性

方、0804 遺伝子産物には GalNAc-6 リン酸脱アセチル化活性が存在するが、0815 遺伝子産物には GalNAc リン酸化活性は検出されず、GalNAc-6 リン酸の生成ルートは不明である。

0815 遺伝子産物が基質とする MurNAc と GlcNAc は、共にペプチドグリカンの主要構成成分であることから、これらの酵素遺伝子群が含まれているオペロンがキチン代謝だけでなくペプチドグリカン代謝にも関与すると予想した。そうであるならば、MurNAc 6-リン酸

(MurNAc6P)を脱乳酸化し、GlcNAc6P へと変換する酵素の存在が推定される。オペロン内の機能未知遺伝子の一つに、内部に SIS ドメインをもつことからリン酸化糖を認識する酵素をコードすると推測した。そこで大腸菌で本遺伝子産物の組換え酵素を調製し、MurNAc や MurNAc6P に対する脱乳酸活性を検討した。MurNAc に対しては活性が検出されなかったが、0815 遺伝子産物により生成させた MurNAc のリン酸化反応液に、さらに本遺伝子産物を作用させたところ、TLC 解析により GlcNAc6P に対応するスポットが出現した (Fig. 2)。さらには脱離した D-乳酸が検出された (data not shown)。

これらの結果より、当該オペロン中の機能未知遺伝子が、MurNAc6P 脱乳酸活性を示す可能性が示唆され、本代謝経路がペプチドグリカンの資化経路としても機能している可能性が示された。

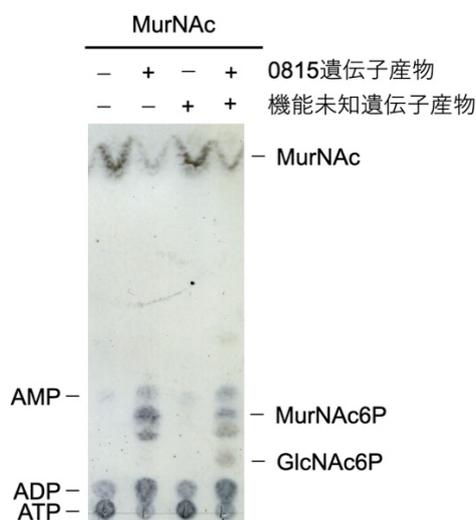


Fig. 2 酵素反応による MurNAc から GlcNAc6P への変換(TLC)

・学会発表 (下線は発表者)

Y. Watanabe, H. Miyamoto, T. Kanai, H. Atomi, Identification of a potential second chitin assimilation pathway in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus chitonophagus*, 13th International Congress on Extremophiles, 2022.9.18-22 (Loutraki, Greece).

Y. Watanabe, H. Miyamoto, T. Kanai, H. Atomi, A second chitin assimilation pathway proposed in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus chitonophagus*, Active Enzyme Molecule 2022, 2022.9.30-10.1 (Imizu, Japan).