第36回糖質科学懇話会

Function and Enzyme Chemistry of Chitin Oligosaccharide Deacetylase from *Vibrios*

Vibrio 属細菌のキチンオリゴ糖デアセチラーゼの機能と酵素化学

日本大学生物資源科学部生命化学科 ¹ 助手 ² 教授平野貴子¹, 西尾俊幸² (ひらの たかこ, にしお としゆき)¹ Research Assistant, ² Professor, Department of Chemistry and Life Science, College of Bioresource Sciences, Nihon UniversityTakako Hirano,¹ Toshiyuki Nishio²

1. はじめに

キチンは、主に *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) が β -1,4 結合で重合した不溶性の多糖であり、自然界では甲殻類の殻や昆虫の外皮、糸状菌の細胞壁などを構成している。*Vibrio* 属細菌などの海洋細菌は海底土壤中に散在するキチンを分解して栄養源としており、これにより海洋中のキチンは分解・消失していると考えられている。多くの *Vibrio* 属細菌も、このキチン利用システムの中でキチナーゼを分泌しキチンから GlcNAc の 2 糖である (GlcNAc)₂ を産生して栄養源としている。一方で、我々が千葉県習志野市の谷津干潟から単離した *Vibrio parahaemolyticus* KN1699 は、キチナーゼ (EC 3.2.1.14) [Glycoside Hydrolases (GH) family 18] を分泌しキチンから (GlcNAc)₂ を産生するばかりではなく、さらにキチンオリゴ糖デアセチラーゼ (COD, EC 3.5.1.105) [Carbohydrate Esterase (CE) family 4] を分泌して、(GlcNAc)₂ の還元性末端側のみを脱アセチル化し、ヘテロ 2 糖である 4-*O*-(*N*-acetyl- β -D-glucosaminyl)-D-glucosamine (GlcNAc-GlcN) を菌体外におけるキチン分解最終産物として産生することがわかった (図 1)¹⁾。しかし、本菌は (GlcNAc)₂ を栄養源とすることができると、GlcNAc-GlcN を産生する理由については不明であった。

2. COD の役割についての研究

キチンはカニやエビなどの甲殻類の殻の主成分であり、海底土壤中ではこれらのキチンが海洋細菌により分解されている。そのメカニズムは以下のように考えられている。

海洋細菌はキチン塊に接触し、キチン分解酵素を菌体外に分泌する。そしてキチンから GlcNAc のオリゴ糖を生産してこれを栄養源として増殖する。このとき海洋細菌は周鞭毛を用いたキチン塊の上を這うような運動 (ソーミング) をし、キチンを資化していく。一方、菌体外に分泌されたキチン分解酵素は海底土壤中を拡散していき、近くに存在する別のキチン塊にも接触し、そこからもオリゴ糖が生産される。海洋細菌は新たに生産されるこのオリゴ糖の濃度勾配に従い、極鞭毛を用いた遊走行動 (スウィミング) をして新たな栄養源へ移動していく²⁾。このように海底土壤中のキチンの分解には、海洋細菌の増殖、酵素生産、移動が重要な役割を担っていることがわかる。

近年、*Vibrio furnissii* を用いた研究で、菌体外で生産するキチン分解最終産物である (GlcNAc)₂ が、本菌自身にとっての栄養源だけではなくキチン分解酵素生産誘導因子や化学遊走因子であることが報告された³⁻⁵⁾。そこで、KN1699 株を含む COD 生産性 *Vibrio* 属では GlcNAc-GlcN が特異的にこれらの役割を担っているのではないかと考え、本酵素の役割の解明を目指した。まず、*Vibrio* 属細菌のなかでも COD 遺伝子を持つものの報告は極わずかであったため、数種の保存菌株を用いて、COD 生産性のものと非生産性のものを分類した。そしてこれらを用いて GlcNAc-GlcN による生理機能の発現の有無を調べた結果、本ヘテロ 2 糖は COD 生産菌のみにキチナーゼ生産誘導因子および遊走性因子として働くことがわかった^{6,7)}。つまり GlcNAc-GlcN は COD 生産菌にとって特異的に生理機能を発現させるシグナルであり、COD はそのシグナルを生産するために必須の酵素であるといえる (図 2)。

図 1. ヘテロ 2 糖の生産

一部の *Vibrio* 属細菌はキチナーゼと COD を分泌し、菌体外での最終産物として GlcNAc-GlcN を産生する。

図2. COD の役割

COD は GlcNAc-GlcN の生産に必須の酵素であり、GlcNAc-GlcN は COD 生産菌にとって酵素生産や遊走のシグナルとして働く。

3. COD の酵素化学的性質に関する研究

GlcNAc 鎖に作用し脱アセチル化する酵素としてキチンデアセチラーゼ (EC 3.5.1.41) が良く知られているが、これは長鎖のものに作用する酵素である⁹⁾。一方で COD は一般にオリゴ糖に作用し、単糖と長鎖のものには作用しないことが知られている。

CE family 4 COD は、遺伝子の報告もわずかであり、実際に COD を生産してその酵素化学的性質が調べられたものは、*V. alginolyticus* H-8⁹⁾、*V. cholerae* EI Tor N16961¹⁰⁾、*V. parahaemolyticus* KN1699¹¹⁾、*Vibrio* sp. SN184¹²⁾ の4菌株のみである。これらは全て (GlcNAc)₂ に最も良く作用することが知られている。*V. cholerae* EI Tor N16961 は、2糖から6糖まで作用することが報告されており、いずれも非還元性末端側から2つ目の GlcNAc を脱アセチル化する¹⁰⁾。また、*V. parahaemolyticus* KN1699 と *Vibrio* sp. SN184 は3糖にも作用することが報告されているが、やはり非還元性末端側から2つ目の GlcNAc を脱アセチル化する^{11,12)}。このように COD が作用できるのは非還元性末端側から2つ目の GlcNAc 残基である。

COD の立体構造の報告はまだ無いが、そのアミノ酸配列から Polysaccharide deacetylase domain と2個の Carbohydrate binding domain の存在が推測されている¹³⁾。COD の脱アセチル化反応メカニズム解明に向けて構造の解析が待たれる。

4. おわりに

COD についてはまだ解明すべき点が多い。酵素化学的性質の解明も十分であるとはいえず、立体構造の解明に加えてさらに多くの COD について調査する必要がある。

これまでの研究から、一部の *Vibrio* 属細菌では COD により生産されるヘテロ2糖の役割が解明され、COD 生産

の生理的意義が明確になった。このようなキチン様化合物の脱アセチル化体は、多くの生物のシグナルとなる可能性があり、*Vibrio* 属以外の細菌の中から COD 生産菌を探索することも必要と考えられる。

文献

- 1) K. Kadokura, A. Rokutani, M. Yamamoto, T. Ikegami, H. Sugita, S. Itoi, W. Hakamata, T. Oku and T. Nishio: Purification and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* extracellular chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase involved in the production of heterodisaccharide from chitin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 357–365 (2007).
- 2) N.O. Keyhani and S. Roseman: Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochem. Biophys. Acta*, **1473**, 108–122 (1999).
- 3) B. Bassler, P. Gibbons and S. Roseman: Chemotaxis to chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*, a chitinovorous marine bacterium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 1172–1176 (1989).
- 4) B.L. Bassler, P.J. Gibbons, C. Yu and S. Roseman: Chitin utilization by marine bacteria: Chemotaxis to chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 24268–24275 (1991).
- 5) B.L. Bassler, C. Yu, Y.C. Lee and S. Roseman: Chitin utilization by marine bacteria: Degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 24276–24286 (1991).
- 6) T. Hirano, K. Kadokura, T. Ikegami, Y. Shigeta, Y. Kumaki, W. Hakamata, T. Oku and T. Nishio: Heterodisaccharide 4-O-(N-acetyl-β-D-glucosaminyl)-D-glucosamine is a specific inducer of chitinolytic enzyme production in *Vibrio* harboring chitin oligosaccharide deacetylase. *Glycobiology*, **19**, 1046–1053 (2009).
- 7) T. Hirano, M. Aoki, K. Kadokura, Y. Kumaki, W. Hakamata, T. Oku and T. Nishio: Heterodisaccharide 4-O-(N-acetyl-β-D-glucosaminyl)-D-glucosamine is an effective chemotactic attractant for *Vibrio* bacteria that produce chitin oligosaccharide deacetylase. *Lett. Appl. Microbiol.*, **53**, 161–166 (2011).
- 8) Y. Zhao, R.D. Park and R.A.A. Muzzarelli: Chitin deacetylases: Productions and applications. *Mar. Drugs*, **8**, 24–46 (2010).
- 9) K. Ohishi, M. Yamagishi, T. Ohta, M. Motosugi, H. Izumida, H. Sano, K. Adachi and T. Miwa: Purification and properties of two deacetylases produced by *Vibrio alginolyticus* H-8. *Bio-Sci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 113–117 (1997).
- 10) X. Li, L.X. Wang, X. Wang and S. Roseman: The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio cholera*: Characterization of a unique chitin oligosaccharide deacetylase. *Glycobiology*, **17**, 1377–1387 (2007).
- 11) K. Kadokura, Y. Sakamoto, K. Saito, T. Ikegami, T. Hirano, W. Hakamata, T. Oku and T. Nishio: Production of recombinant chitin oligosaccharide deacetylase from *Vibrio parahaemolyticus* in the culture medium of *Escherichia coli* cells. *Biotechnol. Lett.*, **29**, 1209–1215 (2007).
- 12) Y. Sakamoto, E. Kuno, A. Tomiyama, T. Hirano, Y. Kumaki, A. Tanaka, H. Kanda, K. Furuya, W. Hakamata, T. Oku and T. Nishio: A chitin oligosaccharide deacetylase from *Vibrio* sp. SN184: Gene cloning, overexpression, purification and characterization. *J. Appl. Glycosci.*, **56**, 273–279 (2009).
- 13) K. Kadokura, Y. Sakamoto, A. Rokutani, T. Ikegami, T. Hirano, M. Yamamoto, T. Oku and T. Nishio: Purification, characterization and cloning of *Vibrio parahaemolyticus* chitinolytic enzymes and application to oligosaccharide production. *J. Appl. Glycosci.*, **55**, 157–164 (2008).