

P-31 カニ殻堆肥由来の放線菌“*Cellulosimicrobium* sp. NTK2”の遺伝資源と特性を利用した次世代バイオマス“キチン”からの有用物質生産

有馬二郎 (鳥取大学農学部生命環境農学科)

背景 キチンは生理活性物質の材料やセルロースに次ぐ次世代バイオマス資源としての利用に期待されている多糖である。しかしその分解には煩雑な作業や環境負荷を伴い、生物学的な分解も試みられているが、未だ有効利用には至っていない。

目的 我々はカニ殻堆肥からキチンを迅速に分解する放線菌*Cellulosimicrobium* sp. NTK2 (以下NTK2株)を単離した。NTK2株は、8つのキチナーゼ遺伝子と2つのキチン結合タンパク質(CBP)遺伝子を持つ。NTK2株やその遺伝資源を利用した穏和なキチン分解、分解物/キチナーゼの有効利用の実現を目指し(図1)、本研究では、NTK2株の特性やキチナーゼの能力について評価した。

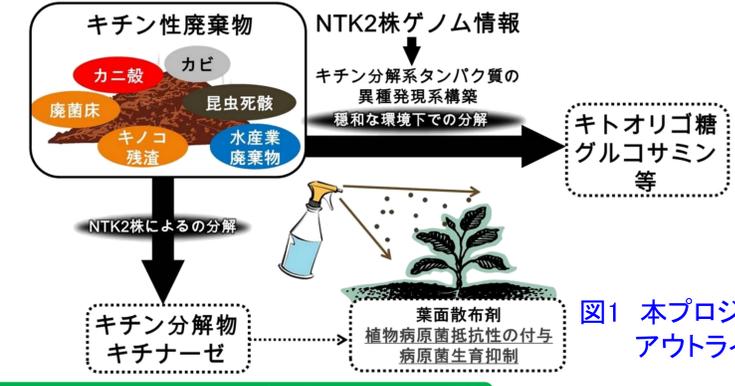
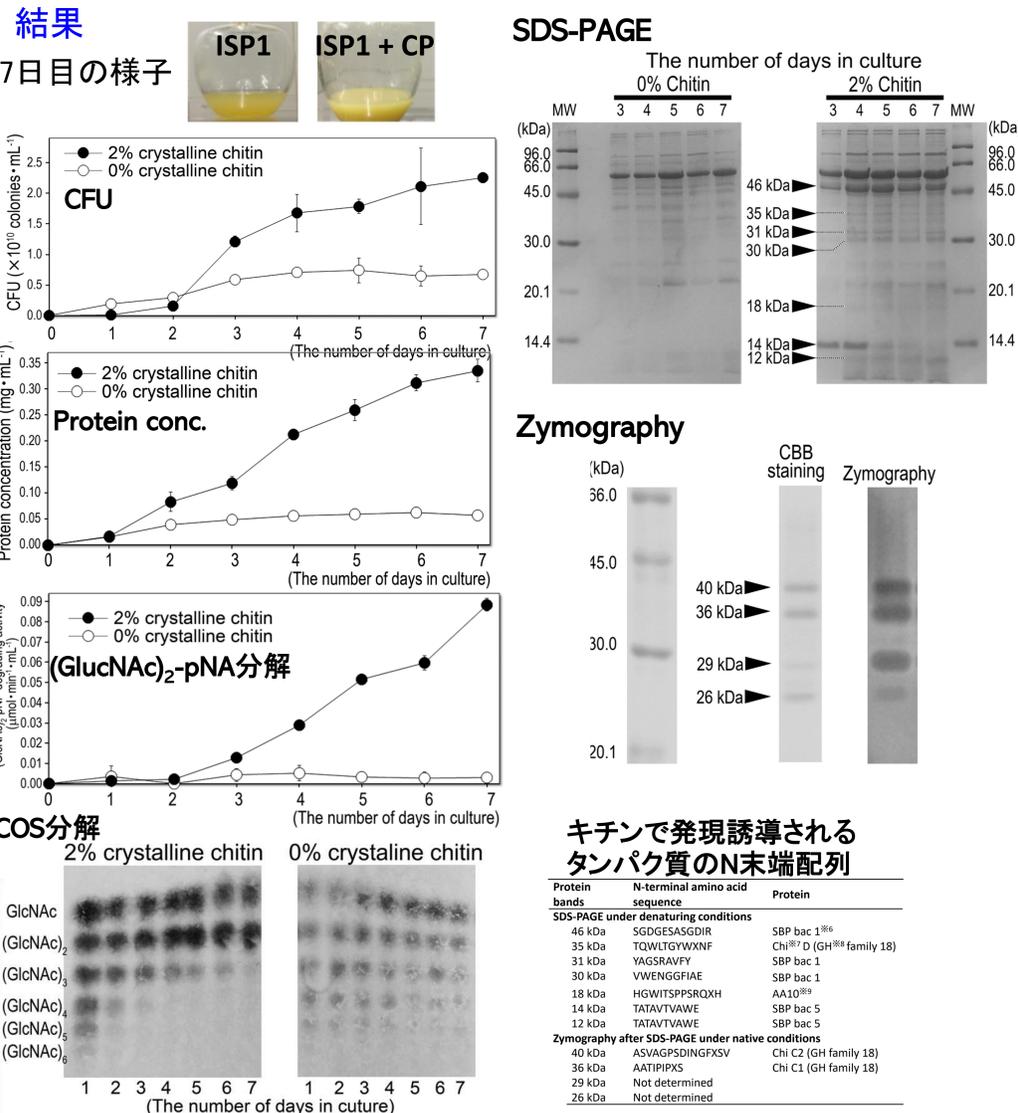


図1 プロジェクトのアウトライン

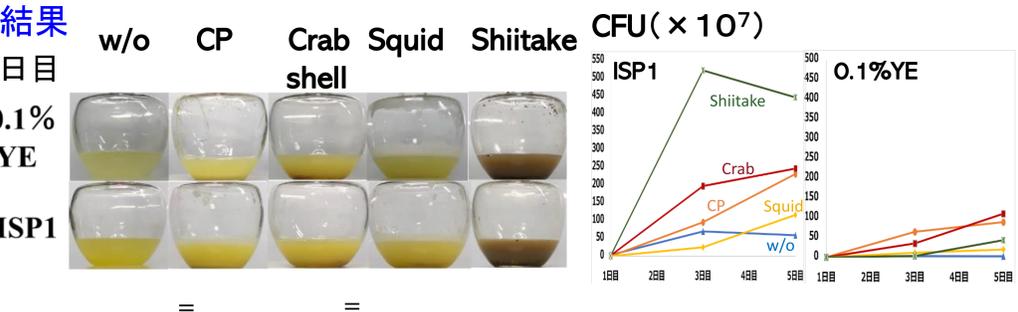
1. キチンによる生育促進とキチナーゼ発現誘導

方法 NTK2株をISP1※1, ISP1 + CP※2, 25°C, 120 rpm, 1~7日培養。CFU※3, タンパク質濃度 (GlcNAc)₂-pNP※4分解, COS※5分解, Zymography, N末端解析。



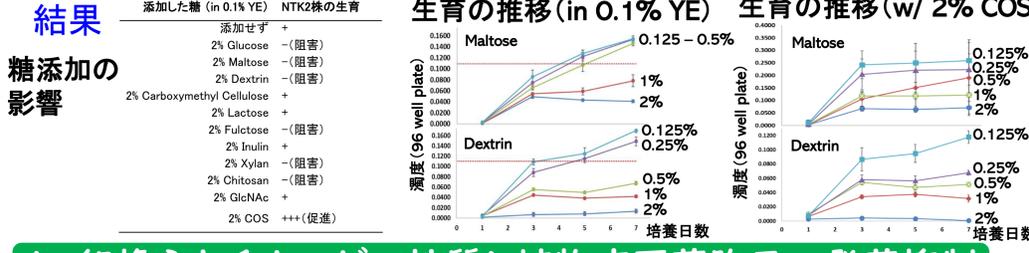
2. キチン廃棄物を使用したNTK2株の培養

方法 NTK2株をISP1, ISP1 + CP, ISP1 + CW※10, 0.2% YE※11, 0.2% YE + CP, 0.2% YE + CW, 25°C, 120 rpm, 7日培養。CFU, COS分解, SDS-PAGE, N末端解析。



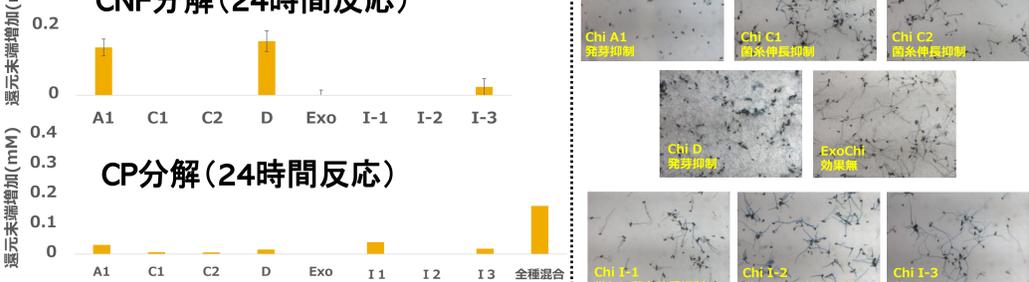
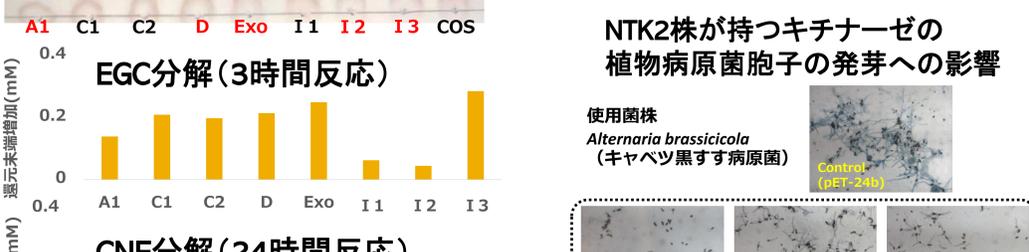
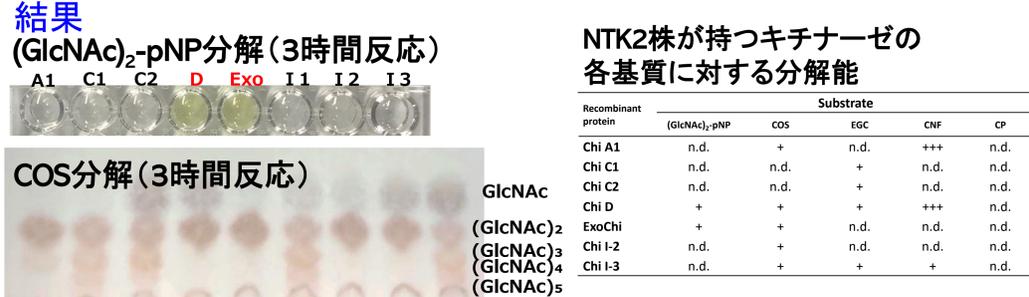
3. 糖添加によるNTK2の生育への影響

方法 NTK2株を0.1% YE, + Glucose, + COS, + Dextrin, + Cellulose, + Maltose ... etc, 25°C, 120 rpm, 1~7日培養。濁度測定による生育の推移。



4. 組換えキチナーゼの性質と植物病原菌胞子の発芽抑制

方法 NTK2株が持つ8つのキチナーゼ遺伝子 (Chi A1, Chi C1, Chi C2, Chi D, ExoChi, Chi class I-1, Chi class I-2, Chi class I-3) のPCRによる遺伝子の増幅とpETベクターへの導入。基質特異性解析 (基質: (GlcNAc)₂-pNP, COS, EGC※13, CNF※14, CP) とカビ胞子発芽抑制試験。



まとめ

NTK2のゲノムには、キチナーゼ遺伝子が8つ存在し(4.方法)、キチン存在下で培養すると、顕著な生育促進に伴い4つのキチナーゼと1つのCBPを発現した(1.結果)。NTK2はカニ殻等のキチン廃棄物も効率よく分解し(2.結果)、プロテアーゼの発現も確認された(2.結果)。一方で、グルコースベースのオリゴ糖や多糖を添加するとNTK2は生育が抑制され(3.結果)、キチンに特化して分解・生育促進することが分かった。8つの組換えキチナーゼのうち、7つはキチンやキチンオリゴ糖に対して分解活性を示し、それぞれで特異性は異なっていた(4.結果)。さらには、5つのキチナーゼは植物病原系状菌の胞子発芽も抑制した(4.結果)。

発表論文: Niki et al., 2020: Chitinolytic Proteins Secreted by *Cellulosimicrobium* sp. NTK2. FEMS Microb. Lett. 367; doi: 10.1093/femsle/fnaa055.

※1 ISP: International Streptomyces Project medium 1 ※6 SBP bac 1: Bacterial Solute Binding Protein 1 ※11 YE: Yeast Extract
 ※2 CP: Chitin Powder ※7 Chi: Chitinase ※12 w/o: Without Sample
 ※3 CFU: Colony Formation Unit ※8 GH: Glycosyl Hydrolase ※13 EGC: Ethylene Glycol Chitin
 ※4 (GlcNAc)₂-pNP: p-Nitrophenyl Chitobioside ※9 AA10: Auxiliary Activity Family 10 Protein ※14 CNF: Chitin Nano-Fiber
 ※5 COS: Chitin Oligo Saccharide ※10 CW: Chitin Waste