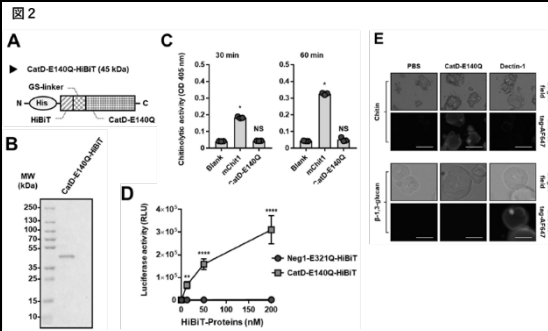


研究テーマ番号	IPSN224008
研究・発明のタイトル	キチン結合ポリペプチドならびにキチン検出法
研究分野	基盤技術
<p>1) 研究・発明の概要</p> <p>2) 成果概要</p>	<p>1) キチンはポリ-<math>\beta</math>-1,4-<i>N</i>-アセチルグルコサミンにより構成される窒素含有多糖である。キノコやカビなどの真菌細胞壁、節足動物や甲殻類の外骨格、イカなどの軟体動物などに含まれ、多様な可能性を有する有益な天然素材として、食品、化粧品、医薬品、バイオプラスチックなどへ応用されている。しかしながら、キチンはダニまたは真菌の死骸や破碎後の微粒子などに含まれ、ヒトの免疫系に干渉してアレルギーを誘導する。目視の判別が難しいため、夾雑物存在下で不溶性および可溶性キチンを簡便かつ高感度で検出・定量できるように、キチンに対して高い結合特異性と結合活性を有する分子が求められていた。キチン分解酵素キチナーゼは、キチン結合ドメイン (CBD) を有する。CBD を用いたキチン検出法は早期に開発された。例えば、ヒトキチナーゼは、最小 49 アミノ酸から構成される CBD がキチン結合能を示し、低分子であることが利点である。しかしながら、同 CBD は不溶性キチンに対してはある程度結合するが、可溶性キチンとの結合活性は mM レベルと弱く、CBD は植物セルロース、細菌のペプチドグリカンなどとは結合しないが、ヒアルロン酸と結合する等の問題がある。今回、発明者らは、キチン結合活性を有する新たなポリペプチドとキチン検出法を確立した。本検出法の汎用が期待される。</p> <p>2) 【ヒトキトトリオキシダーゼ Chit1-CBD のキチン結合活性】</p> <p>ヒトキトトリオキシダーゼ Chit1 の C 末端側 49 アミノ酸からなる CBD (CBD49) に 6xHis、LgBiT または SmBiT タグを融合させて大腸菌で発現させた (図 1A, B : LgBiT と SmBiT タグとの融合タンパク質は互いにルシフェラーゼ・サブユニット融合体といい、各々の連結する融合タンパク質間で結合して1つの構造体となることで、ルシフェラーゼを再構築して発光する)。CBD49-His は不溶性カニ殻キチンに結合した (図 1C)。CBD49-LgBiT と CBD49-SmLiT は、キチンの用量依存的にルシフェラーゼ発光したが、<math>\beta</math>-1,3-グルカン粒子 (カードラン) 存在下では発光しなかった (図 1D)。</p> <p>【ヒトキトトリオキシダーゼ CatD 改変体のキチン結合活性】</p> <p>ヒトキトトリオキシダーゼ CatD の触媒部位をアミノ酸置換し、キチン分</p>

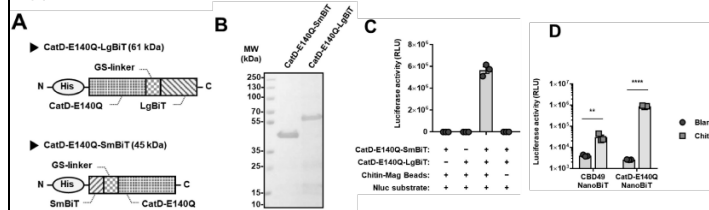


解活性をもたない CatD-E140Q を作り、これに HiBiT タグを融合させて大腸菌で発現させた (図 2A, B)。CatD-E140Q は糖分解活性をもたないが (図 2C)、キチン結合ビーズに対して有意な結合活性を示した (図 2D)。また、CatD-E140Q はカードランと結合しないことがわかった (図 2E)。以上から、CatD-E140Q はキチン認識プローブの候補になることがわかった。

### 【CatD-E140Q によるキチン構造の検出】

高感度な無洗浄キチン検出法を確立すべく、SmBiT と LgBiT をそれぞれ CatD-E140Q に融合させた CatD-E140Q-SmBiT と CatD-E140Q-LgBiT を大腸菌で発現させた (図 3A, B)。これら CatD-E140Q 融合体はキチンビーズ (リガンド) 存在下で強いルシフェラーゼ発光を示した (図 3C)。そこで、市販キチン粒子に対する CBD49 と CatD-E140Q の反応性について

図 3



ルシフェラーゼ・サブユニット融合体を用いて比較したところ、シグナル対ノイズ比は CBD49 が約 7.7、CatD-E140Q は約 340 で、改変型 CatD が高い感度を有することがわかった (図 3D)。

### 【CatD-E140Q によるリガンド認識における構造特異性】

CatD-E140Q のリガンド認識における構造特異性を調べた。不溶性カニ殻キチン及び可溶性 EGC の両形態のキチン構造、酵母粗精製粒子 (ザイモサン A) のキチン構造には反応したが、GlcNAc モノマー、セルロース、カードラン、プスツラン、マンナン、キシラン、デキストラン、ヒアルロナン、ヘパリン等のキチン構造不含有物質には反応しなかった。以上から、CatD の厳密な基質特異性が、CatD-E140Q に保存されていることを確認した。

### 【CatD-E140Q による天然物におけるキチン構造の検出】

CatD-E140Q が、生きたカンジダ・アルビカンス (LiveCA) と加熱殺菌したカンジダ・アルビカンス (HKCA) の細胞表面上のキチンを検出できるか調べたところ、CatD-E140Q は両方の菌に対して細胞濃度依存的にルシフェラーゼ活性を有意に増加させた。また、CatD-E140Q が細胞壁表面上の各多糖構造の位置関係を評価できるか調べた。HKCA 細胞壁上の多糖を糖質分解酵素で分解し、細胞壁に生じる構造変化を CatD-E140Q を用いて

ルシフェラーゼ・サブユニット融合体を用いて比較したところ、シグナル対ノイズ

<p>3) 適用分野・目標</p> <p>4) 今後の研究予定</p>	<p>リアルタイムに解析した。ルシフェラーゼ活性を検出する際に、基質にエンド-<math>\beta</math>-1, 4-N-アセチルグルコサミニダーゼを添加した場合、発光シグナルは経時的に減少して表面キチン構造の損失を示したが、<math>\beta</math>-1, 3-または<math>\beta</math>-1, 6-グルカナーゼを添加した場合、発光シグナルは経時的に増加した。発光シグナルは<math>\beta</math>-1, 3-グルカナーゼ処理で最も増加したことから、キチンが<math>\beta</math>-1, 3-グルカンに高度に覆われていることが示唆された。さらに、主要なダニの虫体やチャバネゴキブリ粉体に含まれるキチンを検出できるか調べたところ、検体濃度依存的に発光強度が増加した。以上から、CatD-E140Qは、これら天然検体中の微量キチンも検出可能であることがわかった。</p> <p><b>【CatD-E140Q のキチン構造およびサイズ依存的結合】</b></p> <p>天然物は、キチン構造とキトサン構造の両方を含むことがある。CatD-E140Q がキチンとキトサンを区別できるかを調べたところ、キトサンとは結合しないことがわかった。また、CatD-E140Q との結合に必要な GlcNAc ユニット数を調べたところ、GlcNAc の 1 量体～3 量体に結合しないことがわかった。さらに、EGC に対する CatD-E140Q-HiBiT の結合力を算出したところ、KD 値は <math>9.9 \times 10^{-8} \text{ M}</math> で、抗体と同等レベルの値を示すことがわかった。そこで、CatD-E140Q-ST II 添加マイクロプレートと CatD-E140Q-HiBiT を用いてサンドイッチ-ELIA を構築して反応曲線を得たところ、算出された定量限界は 13.6 pg/mL であった。以上から、CatD-E140Q は、キトサン及び GlcNAc の 1 量体～3 量体に結合しないこと、pg レベルの可溶性キチンが CatD-E140Q サンドイッチ ELISA によって検出できることが実証された。</p> <p>3) CatD-E140Q を含む本発明のキチン結合ポリペプチドを用いることで、高感度のキチン検出法および検出キットを提供することが可能である。</p> <p>4) ・ CatD-E140Q についてのさらなる精査          ・他の種由来の CatD を用いたキチン検出法の確立など</p>
<p>希望する提携の種類</p>	<p>本発明の技術の共同研究、委託研究に関心のある企業の参画を求める。</p>
<p>特許出願（予定）</p>	<p>出願済</p>
<p>関連特許の出願の有無</p>	<p>無</p>
<p>学術発表（予定）</p>	<p>無</p>
<p>共同研究の有無</p>	<p>無</p>

註：本資料は知的財産戦略ネットワーク（株）が全ての権利を有しており、本目的外の使用を禁ずる。