

平成30年6月6日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07355

研究課題名(和文)細菌キチナーゼによるプロセッシブな結晶性キチン分解機構解明の新展開

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism underlying processive hydrolysis of crystalline chitin by bacterial chitinases.

研究代表者

渡邊 剛志 (Watanabe, Takeshi)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：10201203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、より普遍的で進化した結晶性キチン分解機構モデルの提案を究極的な目標としている。そのため、「キチン分解促進蛋白質(CBP21)の結晶性キチン分解利用における役割の検証」、「キチン分解細菌の生物機能におけるCBP21の重要性の解明」、「自然界に圧倒的に多く存在する β -キチンの分解機構の解明」などの研究を行った。その結果、天然状態に近いキチンの分解利用にCBP21が特に重要であること、1つのキチナーゼ分子が配向方向の異なるキチン鎖に移動して逆方向に分解を開始すること、結晶化度の高い基質分解には触媒クレフト入り口に大きな共鳴構造の芳香環が重要であること、などの重要な結果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The ultimate goal of this research is proposition of the universal and evolved model of the mechanism for crystalline chitin degradation and utilization by chitinolytic bacteria. Therefore, "the role of the protein (CBP21) that promote degradation of crystalline chitin", "the importance of CBP21 for the biological and ecological function of the chitinolytic bacteria", "the mechanism for biodegradation of β -chitin that exists in nature more abundantly" were studied. As a results, it became clear that CBP21 is especially important for degradation and utilization of chitin close to natural condition, an amino acid residue with aromatic ring of big resonating structure at the entrance of the catalytic cleft of chitinase is very important for hydrolysis of highly crystalline chitin substrate, and that one chitinase molecule jump to another chitin chain in different orientation and begins hydrolysis in opposite direction.

研究分野：応用微生物学

キーワード：微生物酵素 キチナーゼ CBP21 AA10タンパク質 キチン分解細菌

1. 研究開始当初の背景

キチンは、真菌類・藻類・甲殻類・昆虫・軟体動物をはじめ多種多様な生物に存在し、構造多糖として重要な役割を果たしている。その生産量はセルロースに匹敵し、またキチンとその誘導体は様々な分野に利用されている。結晶性キチン分解メカニズムの解明はこの未利用バイオマス資源のさらなる活用のためだけでなく、キチン分解を介した様々な生物学的プロセスの理解と応用に必須である。

筆者らは、*Bacillus circulans* WL-12 のキチナーゼ A1 (BcChiA1)、*Serratia marcescens* 2170 のキチナーゼ A (SmChiA) および B (SmChiB) を用いて結晶性キチン分解機構解明の研究をおこない、キチン結合ドメインや FnIII ドメインの発見と結晶性キチン分解における重要性の解明、キチナーゼの触媒残基の初めての同定、触媒ドメイン表面の芳香族アミノ酸残基の結晶性キチン分解における重要性の解明、細菌キチナーゼによる結晶性 β -キチンのプロセッシング(連続的)な分解モデルの提案、触媒クレフト内部の芳香族アミノ酸残基の結晶性キチン分解における重要性の解明、SmChiA と SmChiB の逆方向からの分解の証明、などの成果を上げてきた。そして、高速原子間力顕微鏡を用いて高結晶性 β -キチン微小繊維上を分解しながら高速移動する SmChiA および SmChiB 分子の可視化に成功し、プロセッシングな分解に関する詳細なデータの取得に成功した。そして、高速原子間力顕微鏡を用いて高結晶性 β -キチン微小繊維を分解しながら高速移動する SmChiA および SmChiB 分子の可視化に成功し、先に提案した「細菌キチナーゼによる結晶性 β -キチンのプロセッシングな分解モデル」の基本的な考え方の実証に成功した。

一方で、ノルウェーの Eijsink らは、*S. marcescens* のキチン結合タンパク質 CBP21 が酸化酵素 (lytic polysaccharide monoxygenase) であり、キチナーゼによるキチン分解を促進することを見いだした。現在、CBP21 と類似のタンパク質は、糖質関連酵素データベース CAZy の Auxiliary Activities family 10 (AA10) に分類されている。キチン分解細菌の多くが AA10 蛋白質を持っており、キチン分解酵素系の主要メンバーの一つと言って良い状況になって来た。そのため、CBP21 を含めて結晶性キチン分解機構を捉え直すことが必要となった。

2. 研究の目的

本研究は「より普遍的で進化した結晶性キチン分解機構モデルの提案」を究極的に目指している。そのために、「細菌のキチン分解酵素系の主要メンバーとして認知されつつあるキチン分解促進蛋白質(AA10 蛋白質・CBP21)の結晶性キチン分解利用における役割の検証」、「キチン分解細菌の生物機能にお

ける AA10 蛋白質の重要性の解明と補助因子の探索」、「自然界に圧倒的に多く存在する α -キチンの分解機構の解明」を当面の目的として研究を行い、その結果を総合して最終的に、「より普遍的で進化した結晶性キチン分解機構」を考察し、モデルの提案に繋げていく。

3. 研究の方法

(1) キチン分解促進蛋白質(AA10 蛋白質・CBP21)の結晶性キチン分解利用および昆虫病原性における役割の検証

プラスミド pKNG101 に連結した CBP21 の欠損遺伝子を *S. marcescens* 2170 に導入し、Allelic Exchange により染色体上の *cbp* 遺伝子を破壊し、CBP21 蛋白質の欠損株 (*cbp*) を取得した。*S. marcescens* のキチン分解利用と昆虫病原性に対する CBP21 蛋白質欠損の影響を分析し、その重要性と程度を解明する。また、大腸菌で構成的に発現するプロモーター (*plpp*) を *cbp* 遺伝子に連結した pACYC184-*plpp/cbp* を欠損株 (*cbp*) に導入し、相補株 *cbp/pcbp* を構築した。*S. marcescens* 2170 野生株、CBP21 欠損株 *cbp*、CBP21 相補株 *cbp/pcbp* を用いて、キチン分解利用および昆虫病原性に対する CBP21 の重要性と寄与を分析した。

(2) 自然界に圧倒的に多く存在する β -キチンの分解機構解明 (高結晶性 β -キチン微小繊維を用いた SmChiA, SmChiB による β -キチン分解機構の解明)

京都大学の和田准教授から、海洋藻類 *Phaeocystis* の大量培養によって得られた高結晶性 β -キチン微小繊維の提供を受けた。これを用いて、高結晶性 β -キチン微小繊維の酵素分解機構の経験を活かし、高速原子間力顕微鏡を主な研究手段として、 α -キチン分解機構の解析を試みた。

(3) キチナーゼ分子表面及び触媒クレフト内部に存在する芳香族アミノ酸残基の機能解明

これまでの研究によって、結晶性キチン分解活性の高いプロセッシングな分解を行うキチナーゼの分子表面に存在する芳香族アミノ酸残基が、結晶性キチン分解において非常に重要な役割を果たすことがわかっていく。また、触媒クレフト内部に並んだ芳香族アミノ酸残基も、結晶性キチンの連続分解に特に重要と考えられている。上述のように、入手が容易でない高結晶性 β -キチン微小繊維を用いての実験には現状では限界がある。そのため、それを補う意味でも酵素側の結晶性キチン分解に必要な構造と機能の詳細な理解を進める必要がある。そこで、分子表面に Tyr, Trp, Trp, Tyr という特徴的な芳香族アミノ酸残基が並んでいる SmChiB の特に触媒クレフト入り口の Tyr240 に着目し、部位特異的変異による解析をさらに詳細に行うことにした。

また、触媒クレフト内部の芳香族アミノ酸残基に関しては、SmChiA のサブサイト - 3

位に位置する Trp167 に着目し、部位特異的変異の影響を分析した。

4. 研究成果

(1) キチン分解促進蛋白質(AA10 蛋白質・CBP21)の結晶性キチン分解利用および昆虫病原性における役割の検証

< 結晶性キチン分解利用における役割 > : CBP21 をコードする遺伝子の欠損株 *cbp*、及びその相補株 *cbp/pcb* の構築を試みその取得に成功した。 *cbp* を (GlcNAc)₂ で定常期まで培養し、その上清タンパク質を SDS-PAGE で解析したところ、野生株に見られる 21 kDa 付近のバンドが消失しており、CBP21 が発現していないことが確認された。また、*cbp* 相補株は、CBP21 を過剰気味に発現していたが、キチナーゼの発現量は野生株と比べて低いことがわかった。 *S. marcescens* 2170 野生株と、CBP21 欠損株 *cbp*、CBP21 相補株 *cbp/pcb* を用いて、キチン分解利用および昆虫病原性に対する CBP21 の欠損及び補完の影響を詳細に分析した。

cbp 株を異なる形状のキチンで培養し CBP21 のキチン分解利用への影響を調査した。高結晶性 β -キチン微小線維またはコロイダルキチンを分散させた寒天平板培地で培養したところ、いずれの基質でも *cbp* 株は野生株に比べ小さく不明瞭なクリアゾーンを形成した。一方、相補株は β -キチン微小線維を含む培地で野生株よりも大きく明瞭なクリアゾーンを形成したが、コロイダルキチンでは小さく不明瞭なクリアゾーンを形成した。

さらにフレーク状の高結晶 β -キチンとコロイダルキチンを炭素源として液体培養を行ったところ、相補株が最も速やかにフレーク状キチンを分解し、その生育も早かったが、

cbp 株は分解も生育も顕著に遅いことがわかった。一方、コロイダルキチン培養では *cbp* 株と野生株の生育速度はほぼ同等であり、フレーク状キチンの場合と逆に、相補株の生育の遅れが観察された。*cbp* 相補株は、CBP21 を過剰に発現するがキチナーゼの発現量が低い。したがってこれらの結果は、より結晶化度が高く天然状態に近いキチンの分解利用において CBP21 が特に重要であることを示すと同時に、キチン分解細菌が生産する分解酵素の比率が必ずしも最適でないという非常に興味深い可能性を示唆している。

< 昆虫病原性への関与の可能性 > :

S. marcescens は昆虫病原菌としてもよく知られており、その昆虫病原性にキチン分解酵素や CBP21 の関与が予想されていた。その理由は、昆虫の腸管内壁がキチン質で構成された囲食膜により覆われており、この囲食膜が病原菌の侵入から生体を守るバリアとなっているためである。これまでの実験で、*S. marcescens* の病原性の発揮に CBP21 が関与する可能性が示唆されていた。そこで帝京大学

医真菌研究センターとの共同研究により、カイコを感染モデルとして、昆虫病原性に対する CBP21 蛋白質の欠損及び補完の影響を分析した。 *cbp* 株と *chiR* 株を、腸管注射または食餌投与による経口感染と血液感染の3つの感染経路によりカイコに投与し、その病原性への影響を調査した。しかし、いずれの感染経路でもキチナーゼと CBP21 の欠損による昆虫病原性の顕著な低下は観察されず、したがって本実験からは残念ながら CBP21 およびキチナーゼの昆虫病原性への関与を示すことができなかった。

(2) 自然界に圧倒的に多く存在する β -キチンの分解機構の解明 (高結晶性 β -キチン微小線維を用いた SmChiA, SmChiB による β -キチン分解機構の解明)

S. marcescens のキチナーゼである SmChiA, SmChiB と *Phaeocystis* 由来高結晶性 β -キチン微小線維を用いて β -キチン分解機構を解明するため、SmChiA による β -キチン分解の高速原子間力顕微鏡によるリアルタイム観察の条件検討をまずおこなった。その結果、 β -キチン微小線維を用いた場合と類似の条件で、 β -キチン状を動くキチナーゼ分子の観察が可能であることがわかった。その結果に基づいて、原子間力顕微鏡による観察を開始し、不鮮明かつ限られた分子数ではあるが、 β -キチン微小線維上を分解移動していた SmChiA 分子が途中で折り返し、反対方向に移動する様子を観察することができた。

残念ながら、もともと入手出来る高結晶性 β -キチン微小線維の量が非常に微量であるため、 β -キチン微小線維上を分解移動するキチナーゼ分子の速度や、分解距離などの詳細なデータを得ることはできなかった。しかしながら、本研究で得られた結果は、 β -キチンに結合し分解している1つの SmChiA 分子が、近くにある配向方向の異なるキチン鎖に移動して、それまでと逆の方向に向かって分解を開始することを示唆していると考えられ、この特殊な分解挙動を観察できた意義は大きい。

β -キチンは、逆方向に配向したキチン鎖が水素結合によって強固な結晶構造を形成している。このような β -キチンの分解機構解明は、自然界に多量に存在するキチンの酵素分解、キチン分解細菌によるキチンのリサイクリングのメカニズムの理解に必須である。より詳細な解析を行うためには、解析に十分な量の高結晶性の β -キチン微小線維をいかに十分な量取得するか、その方法の確立が課題である。

(3) キチナーゼ分子表面及び触媒クレフト内部に存在する芳香族アミノ酸残基の機能解明

< SmChiB > SmChiB の分子表面に露出した芳香族アミノ酸残基のうち、特に触媒クレフト入り口の Tyr(Y)240 に着目し、部位特異的

変異により種々のアミノ酸残基に置換し、その影響を解析した。これまでの研究で、クレフト入り口の Tyr 残基を Ala に変異させると結合活性と分解活性の両方が低下する結果が得られているが、この分解活性の低下は、結合活性の低下による可能性が排除できない。そこで、Y240 を種々のアミノ酸残基(W, F, L) に置換した変異型酵素 (Y240W, Y240F, Y240L) を作製し、野生型酵素と共にキチンへの結合活性、不溶性・水溶性基質に対する分解活性を比較した。Y240L は結合活性、分解活性ともに低下した。一方、Y240W、Y240F のキチン結合活性は野生型とほぼ同等であった。結晶化度の高い α -キチンに対しては、Y240W が野生型とほぼ同等の分解活性と反応初速度を示したのに対し、Y240F の分解活性は野生型より明らかに低下した。このことから、結晶性キチン分解において、クレフト入り口にチロシンまたはトリプトファンの芳香環が重要であることが示唆された。

また、可溶性キチンに対しては、Y240L がもっとも高い分解活性を示した。この基質は水溶性の一本鎖で、キチン鎖を引きはがす必要がない。そのため、芳香環を持った結合力の高いアミノ酸残基は必要なく、Y240L が高い分解活性を示したものと解釈された。

以上のことから、結晶化度の高い基質分解には、触媒クレフト入り口に大きな共鳴構造の芳香環が重要であり、水溶性高分子基質の分解には逆に芳香環がない方が有利であることが明らかとなった。

<SmChiA> SmChiA のサブサイト - 3 に位置する Trp167 は連続分解性 (プロセッシビティ) に関わっているとの報告がある。そこで、SmChiA の Trp167 については、Tyr と Ala に置換した変異体 W167Y と W167A を構築し、Trp167 の変異の影響を高結晶性の α -キチン微小繊維を用いて分析した。W167A, W167Y とともにキチンへの最大結合量が若干低下したが、結合定数の変化は顕著なものではなかった。特に W167Y は、キチンへの結合に野生型とほとんど差がないものと考えられた。一方で、W167A, W167Y とともに結晶性キチンの分解活性が大幅に低下した。このことから、Trp167 は基質の乖離を抑制することによって、プロセッシブ (連続的) な分解に大きく寄与していることが強く示唆された。

以上述べてきたように、*S. marcescens* のキチン分解利用において、キチナーゼそのものが結晶性キチンを分解するための極めて巧妙な局所構造を駆使しており、そこに加えて AA10 タンパク質がこのようなキチナーゼの働きを高め、自然界における効率的なキチン分解を可能にしていることが示された。この仕組みを、自然界のキチンの大部分を占める α -キチンの分解においてより詳細に解析していく必要があるが、今回の研究では、基質として用いられる α -キチンの量が少なく、

この点に関しては十分な結果を得るに至らなかった。今後は、高純度の高結晶性 α -キチン微小繊維の取得が課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計7件)

Identification and characterization of chitinolytic bacteria isolated from a freshwater lake. (2018) D. M. Tran, H. Sugimoto, D. A. Nguyen, T. Watanabe, and K. Suzuki. Biosci. Biotechnol. Biochem. 82(2):343-355. (査読あり)

Rate constants, processivity, and productive binding ratio of chitinase A revealed by single-molecule analysis. (2018) A. Nakamura, T. Tasaki, Y. Okuni, C. Song, K. Murata, T. Kozai, M. Hara, H. Sugimoto, K. Suzuki, T. Watanabe, T. Uchihashi, H. Noji, and R. Iino. Phys. Chem. Chem. Phys. 20:3010-3018. (査読あり)

Differences in the roles of the two surface-exposed tyrosine residues, Y240 and Y481, of *Serratia marcescens* chitinase B during processive degradation of crystalline chitin. (2016) H. Sugimoto, K. Nakamura, Y. Nishino, Y. Idezawa, Y. Fujinuma, K. Suzuki, and T. Watanabe. J. Gen. Appl. Microbiol. 61:255-261. (査読あり)

Regulation of the chitin degradation and utilization system by the ChiX small RNA in *Serratia marcescens* 2170. (2016) K. Suzuki, M. Shimizu, N. Sasaki, C. Ogawa, H. Minami, H. Sugimoto, and T. Watanabe. Biosci. Biotechnol. Biochem. 80(2):376-385. (査読あり)

Suppressive effects of *Bacillus* spp. on mycelia, apothecia and sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and potential as biological control of white mold on mustard. (2016) Md M. E. Rahman, Delwar M. Hossain, Ayaka Shiya, Kazushi Suzuki, Tapan Kumar Dey, Masanori Nonaka, Naoki Harada. Australasian Plant Pathology. 45(1): 103-117. (査読あり)

細菌由来の糖質加水分解酵素ファミリー 18 キチナーゼにおけるサブファミリー C の解析. (2015) 鈴木一史、杉本華幸、工藤江利子、伊藤学、渡邊剛志、キチン・キトサン研究. 21(3):209-218. (査読あり)

Serratia marcescens 2170 の CBP21

欠損株の構築 . (2015) 桜井大地、杉本華幸、鈴木一史、渡邊剛志、キチン・キトサン研究 . 21 (2):46-51. (査読あり)

〔学会発表〕(計 15 件)

細菌のキチン分解酵素系とキチン分解利用機構 ---包括的な理解を目指して--- (2017) 渡邊剛志、第 31 回日本キチン・キトサン学会大会 8/23-24 宜野湾市 (招待講演)

Analysis of chitinolytic bacteria from a freshwater lake in Niigata. (2017) D. M. Tran, H. Sugimoto, T. Watanabe, and K. Suzuki. 第 31 回日本キチン・キトサン学会大会 8/23-24 宜野湾市

細菌の小分子 RNA によるキチン分解系とキチン分解産物取り込み系の制御機構. (2017) 堀井恭子、南晴香、山岸拓矢、宗像直輝、杉本華幸、渡邊剛志、鈴木一史、第 31 回日本キチン・キトサン学会大会 8/23-24, 25 宜野湾市 口頭発表

2 種のターゲット mRNA による小分子 RNA ChiX の制御. (2017) 堀井恭子、宗像直輝、山岸拓矢、南晴香、杉本華幸、渡邊剛志、鈴木一史、第 19 回日本 RNA 学会年会 7/19-21 富山市

サブサイト-3 に位置するトリプトファン残基が *Serratia marcescens* キチナーゼ A の基質連続分解機構におよぼす影響 . (2016) 杉本華幸、猪浦弾、鈴木一史、渡邊剛志 第 30 回日本キチン・キトサン学会大会 8/18-19 川越市

Serratia marcescens における small RNA・ChiX によるキチナーゼ発現抑制とその解除 . (2016) 鈴木一史、南晴香、山岸拓矢、小川知佐奈、佐々木直美、杉本華幸、渡邊剛志、第 30 回日本キチン・キトサン学会大会 8/18-19 川越市

Screening of chitinolytic bacteria from Sakata, a sand dune lake, in Niigata. (2016) D. M. Tran, H. Sugimoto, T. Watanabe, and K. Suzuki. 第 30 回日本キチン・キトサン学会大会 8/18-19 川越市

Serratia marcescens 2170 の多糖モノオキシゲナーゼ CBP21 の生理機能の解明. (2016) 桜井大地、杉本華幸、鈴木一史、渡邊剛志、日本農芸化学会 2016 年度大会 3/27-30 札幌市

Serratia marcescens キチナーゼ B の結晶性キチン分解機構の解明 - 触媒クレフト入口の芳香族アミノ酸残基の役割について -. (2016) 杉本華幸、出澤有太、猪浦弾、鈴木一史、渡邊剛志、日本農芸化学会 2016 年度大会 . 3/27-30 札幌市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊剛志 (WATANABE Takeshi)
新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号 : 10201203

(2) 研究分担者

()
研究者番号 :

(3) 連携研究者

五十嵐 圭日子 (IGARASHI, Kiyohiko)
東京大学・大学院農学生命科学研究科
・准教授
研究者番号 : 80345181

鈴木一史 (SUZUKI, Kazushi)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号 : 00444183

杉本華幸 (SUGIMOTO, Hayuki)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号 : 60529527

(4) 研究協力者

()