

令和元年6月17日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08114

研究課題名(和文)細菌P. FPU-7によるキチン分解機構の解明と細胞表面タンパク質提示の利用

研究課題名(英文) Understanding of the molecular mechanism of chitinolysis by *Paenibacillus* sp. str. FPU-7 and the bacterial cell surface display system.

研究代表者

伊藤 貴文 (Itoh, Takafumi)

福井県立大学・生物資源学部・准教授

研究者番号：10402827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生物資源である多糖キチンの有効利用を目指し、「細菌P. FPU-7による難分解性キチン分解機構の解明とその応用」を行い、次の成果を得た。(1) 細胞表面発現型キチナーゼChiWは、ドメイン構造を形成することで、効率的にキチンを分解することが示された。(2) 機能性オリゴ糖合成活性が上昇したChiW変異体を取得した。(3) P. FPU-7が発現するタンパク質を決定し、ChiWの発現制御に関わるタンパク質やキチンオリゴ糖輸送タンパク質を見出した。(4) さらに、細菌細胞表面組換えタンパク質発現系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

土壌細菌*Paenibacillus* sp. str. FPU-7は、酵素ChiWを利用して、カニ殻由来の固体状のキチンをも強力に細胞表面で分解する。今回、ChiWがどのようにキチンを分解しているかを明らかにした。他の難分解性高分子多糖も含めて、より効率的で環境負荷の少ない酵素による多糖分解法の確立に繋がること期待される。また、P. FPU-7の細胞表面タンパク質提示機構によって、細菌に複雑な機能を持たせることができた。このように、「細菌P. FPU-7による難分解性キチン分解機構の解明とその応用」による成果は、低環境負荷型の機能性材料生産技術の確立に貢献する。

研究成果の概要(英文)：This study has been carried out to utilize the biomass chitin effectively and we have been obtained the following four results. (1) The surface-expressed chitinase, ChiW, of *Paenibacillus* sp. str. FPU-7 can effectively degrade chitin using multi-domains. (2) The mutant enzyme of ChiW with high transglycosylation activity was developed by site-directed mutagenesis. (3) The proteins related to the ChiW gene expression and the chitin oligosaccharides transport were found in the expressed proteins of P. FPU-7 by the mass spectrometry-based proteomics. (4) The expression system on the bacterial cell surface was developed and used to display some useful enzymes.

研究分野：環境農学

キーワード：Chitin biomass Chitinase *Paenibacillus* Oligosaccharides

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

キチンはセルロースに次いで地球上に多く存在する多糖であり、その分解物（オリゴ糖や単糖）には多彩な機能が認められ、農業資材（エリシター活性）や健康機能性食品（免疫賦活作用等）として利用する研究が盛んに行われてきた。しかしながら、*N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) が重合したキチン多糖の構造は非常に安定であり、利用目的に適した鎖長にまで分解を制御することは容易ではない。キチンの分解とその制御技術の確立は重要な課題である。

細菌 *Paenibacillus* sp. str. FPU-7 (*P.* FPU-7) は、カニ殻に含まれる固体状のキチンをも強力に分解する (図 1)。本研究者らは、*P.* FPU-7 が従来知られている細胞外分泌型キチナーゼの他に、新規キチナーゼ ChiW を細胞表面に提示し、キチンを分解していることを見出していた (Itoh, T. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7482-7490, 2013.)。また、ChiW が特に不溶性のキチンに対して高い分解活性を持つことも明らかにしていた (Itoh, T. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 624-634, 2014)。さらに、ChiW が 2 つの触媒ドメインを含む複数のドメインから形成されていることも明らかにしていた (Itoh, T. *et al.*, *Acta Cryst. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 70, 350-353, 2014)。

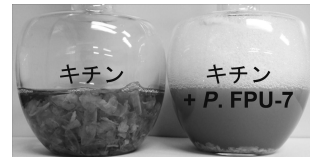


図 1: 細菌 *P.* FPU-7 はカニ殻由来の固体状のキチンを良く分解する。

本研究では、ChiW の立体構造と活性の相関を明らかにし、ChiW のキチン分解能力の構造的要因を解明すると共に、利用価値の高いオリゴ糖（例えば、植物に高いエリシター活性を示すのは 6 糖）を生産する ChiW 変異体酵素の取得を目指した。また、*P.* FPU-7 が細胞表面に ChiW を提示する機構を利用し、より複雑な機能を持った細菌を生体触媒として汎用的に利用する基盤技術の確立も目指した。これまでに酵母や細菌の細胞表面に種々の機能性タンパク質を提示させることで、新しい機能を持った細胞が作製され、様々な分野で利用されている。しかし、酵素を提示した微生物による物質生産では、酵素反応が表面で起こるため、反応する場の密度が低く、物質の生産量は低くなる。ChiW の場合、部位特異的な切断が起こるため、細胞表面に提示した後に細胞から切り離すことが可能であり、酵素反応を溶液中に移行させ、反応収量を高めることができる。さらに、ChiW の細胞表面提示に関与しているタンパク質や ChiW と協奏的に働いているタンパク質を決定することで、*P.* FPU-7 の細胞表面タンパク質提示機構を明らかにし、細胞表面へのタンパク質の発現を制御する方法の確立に繋げることも目指した。

2. 研究の目的

キチンなど多糖は生物が作る再生可能な資源である。その有効利用のために、「細菌 *P.* FPU-7 による難分解性キチン分解機構の解明とその応用」を行った。まず、*P.* FPU-7 由来細胞表面提示型キチナーゼ ChiW はどのようにキチンを分解するのか、立体構造と変異解析に基づいて明らかにすることを目的とした。そして、変異体の反応産物の解析を通じ、様々な鎖長のオリゴ糖を調製する変異体酵素を作製することを目指した。さらに、*P.* FPU-7 の細胞表面タンパク質提示機構を遺伝子工学的に制御することで、より複雑な機能を持った細菌を作製する技術の確立を目指した。

3. 研究の方法

研究開始時までに細菌 *P.* FPU7 細胞表面提示型酵素 ChiW が 2 つの触媒ドメインを含む複数のドメインから形成され、キチンの鎖の途中をランダムに切断する (エンド型) ことを明らかにしてきた。本研究期間内に下記を行った。

(1) ChiW のキチン分解方法の解明とその利用

2 つの触媒ドメインのみのタンパク質やその順番を入れ替えたタンパク質を調製し、それらのキチンに対する分解反応を追跡した。

活性クレフト中の基質を認識する部位を中心にアミノ酸変異体を作製した。そして、オリゴ糖を調製することができる酵素を見出した。

(2) *P.* FPU-7 細胞表面組換えタンパク質発現系の構築

ChiW の細胞表面提示ドメインと他のタンパク質や酵素を連結したタンパク質発現ベクターを作製し、*P.* FPU-7 での発現と機能性を評価した。

(3) 細胞表面 ChiW 提示に関わる *P.* FPU-7 タンパク質の決定

P. FPU-7 を培養液や細菌細胞表面からタンパク質を抽出し、ゲノム配列の情報と質量分析装置を利用して、*P.* FPU-7 の発現タンパク質を解析した。

4. 研究成果

(1) ChiW のキチン分解方法の解明とその利用

ChiW 触媒ドメインのキチンに対する反応様式の解析: ChiW には触媒ドメインが 2 つ存在し (Cat1、Cat2)、それらはリンカードメイン (Ig2) を挟み、触媒領域 (Cat1-Ig2-Cat2) を形成している。触媒領域、各々の触媒ドメインのみの組換えタンパク質、および、触媒ドメインを入れ替えたタンパク質 (Cat2-Ig2-Cat1) を調製した。Cat1、Cat2、Cat1-Ig2-Cat2、Cat2-Ig2-Cat1 の合成基質 pNP-(GlcNAc)₂ に対する比活性は、それぞれ、0.46、0.15、1.8、0.37 U/mg であっ

た。各触媒ドメイン単独で存在するよりも、ドメイン構造を形成することで、効率的にキチンを分解することが示唆された(図2)。また、Cat1、Cat2の4糖を基質にした際の反応産物を液体クロマトグラフィーで追跡したところ、同様の反応挙動を示し、Cat1、Cat2ともに単独のドメインで糖転移活性を有していた。

クレフトを形成するアミノ酸残基に対する変異体の解析: 触媒残基、基質を認識するアミノ酸残基を中心に変異体を作製したところ、120-130%オリゴ糖合成活性が上昇した変異体が取得された。

立体構造と活性の相関解析: ChiWの立体構造を決定し、活性との相関解析を行った。キチンを基質とした際の反応産物の還元末端を定量すると4.9U/mgであったが、遊離する2糖を定量すると2.1U/mgであり、ChiWは低プロセッシブ型であることを示した。クレフトの形状がプロセッシブ度に影響を与えていることが示唆された。

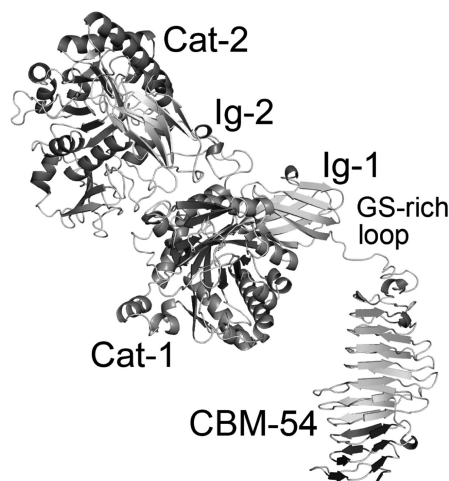


図2: 細菌 *P. FPU-7* 細胞表面提示型キチナーゼ ChiW の立体構造。ChiW は2個の触媒ドメイン(Cat-1, Cat-2)と細胞壁結合ドメイン(CBM-54)を中心に複合ドメイン構造から形成される。

(2) *P. FPU-7* 細胞表面組換えタンパク質発現系の構築

ChiWの細胞表面提示ドメインと他のタンパク質や酵素(緑色蛍光タンパク質および細菌分泌型アミラーゼ)を連結したタンパク質発現ベクターを作製した。このベクターにより *Brevibacillus* 菌を形質転換し、目的のタンパク質が表面に発現することを確認した。

(3) 細胞表面 ChiW 提示に関わる *P. FPU-7* タンパク質の決定

P. FPU-7 培養液に含まれるタンパク質の網羅的解析: *P. FPU-7* 培養液中に含まれるタンパク質を電気泳動、質量分析装置、*P. FPU-7* のドラフトゲノムおよびアミノ酸配列データベースを用いて、網羅的に解析した。本方法にて、100種類以上のタンパク質が同定された。また、*P. FPU-7* のキチン分解には、これまで見出されていたキチナーゼ以外にも5種類のGH18キチナーゼ、1種類のGH19キチナーゼ、4種類の多糖分解オキシゲナーゼも関与していた。これらほとんどの酵素は、キチンが培地に存在していなくても発現していた。細胞表面発現型キチナーゼ ChiW はキチンによって発現が誘導されていた。

P. FPU-7 細胞表面に発現するタンパク質の網羅的解析法の確立: *P. FPU-7* 細胞表面に含まれるタンパク質の解析方法の確立を行った。対数増殖期にある細菌を回収後、トリプシンによる部分消化および質量分析装置にて試料中に含まれるタンパク質を同定した。その際、懸濁溶液として、炭酸アンモニウムを含む溶液、スクロースを含む溶液、トレハロースを含む溶液の3種類を用いた。いずれも細胞質内由来のタンパク質が混入していたため、ネガティブコントロールを作製し、細胞表面由来と考えられるタンパク質を検出した。

キチンオリゴ糖結合タンパク質とキチンオリゴ糖加水分解酵素の機能解析: キチン添加時に発現していたタンパク質群の中にキチナーゼ ChiW の発現制御に関わるキチンオリゴ糖結合タンパク質候補を見出した。その組換えタンパク質を大腸菌発現系により調製した。そして、示差走査蛍光測定法により、キチンオリゴ糖の結合能を確認し、このタンパク質をキチンオリゴ糖結合タンパク質と同定した。さらに、近傍の遺伝子から、キチンオリゴ糖加水分解酵素候補を見出した。

新規タンパク質の機能解析: 2つのキチナーゼと遺伝子上で並ぶ機能未知遺伝子を検出し、多糖分解に関与するタンパク質候補として見出した。そして、その組換えタンパク質を大腸菌発現系により調製した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

伊藤貴文, 日比隆雄, 木元久: 細菌 *P. FPU-7* によるキチン分解機構と細胞表面提示型キチナーゼ (Chitin degradation mechanism and cell-surface-expressed chitinase of *Paenibacillus* sp. str. FPU-7). **アグリバイオ** 2018年12月臨時増刊号, 2018. 査読無.
http://hokuryukan-ns.co.jp/cms/books/アグリバイオ_2018年12月臨時増刊号/7/

Itoh, T., Hibi, T., Suzuki, F., Sugimoto, I., Fujiwara, A., Inaka, K., Tanaka, H., Ohta, K., Fujii, Y., Taketo, A. and Kimoto, H.: Crystal structure of chitinase ChiW from *Paenibacillus* sp. str. FPU-7 reveals a novel type of bacterial cell-surface-expressed multi-modular enzyme machinery. **PLOS ONE**, 11:e0167310, 2016. 査読有.

DOI: 10.1371/journal.pone.0167310

[学会発表](計9件)

Itoh, T., Nakagawa, E., Yoda, M., Hibi, T. and Kimoto, H.: Structure and function of alginate lyase from *Paenibacillus* sp. str. FPU-7. The Asian Crystallographic Association (AsCA 2018), Auckland, New Zealand, 2018.

中川えみ, **伊藤貴文**, 木元久, 日弁隆雄: *Paenibacillus* 属細菌由来アルギン酸リアーゼの立体構造解析. 第11回 北陸合同バイオシンポジウム, 加賀市, 2018.

伊藤貴文, 日弁隆雄, 藤井豊, 木元久: グラム陽性細菌 (*Paenibacillus* sp. str. FPU-7) のキチン分解機構の解析. 日本生化学会 北陸支部第36回大会, 福井市, 2018.

伊藤貴文, 中川えみ, 要田萌, 木元久, 日比隆雄: *Paenibacillus* 属細菌由来アルギン酸リアーゼの機能解析. 日本農芸化学会 2018年度大会, 名古屋市, 2018

伊藤貴文, 仲市あかり, 藤井豊, 日比隆雄, 木元久: *Paenibacillus* 属細菌 FPU-7 株のキチン分解と取り込みの構造基盤. 2017年度 生命科学系学会 合同年次大会 (ConBio2017), 神戸市, 2017.

中川えみ, 要田萌, **伊藤貴文**, 木元久, 日弁隆雄: *Paenibacillus* sp. str. FPU-7 由来新規アルギン酸リアーゼの機能解析. 第10回 北陸合同バイオシンポジウム, 射水市, 2017.

伊藤貴文, 日比隆雄, 藤井豊, 武藤明, 木元久: *Paenibacillus* 属細菌由来細胞表層キチナーゼ ChiW の立体構造. 日本農芸化学会 2017年度大会, 京都市, 2017.

Itoh, T., Hibi, T., Fujii, Y., Taketo, A., Kimoto, H.: Structure and function of cell-surface-expressed multi-modular chitinase ChiW of *Paenibacillus* sp. str. FPU-7. 14th conference of the Asian Crystallographic Association (AsCA 2016), Hanoi, Vietnam, 2016.

伊藤貴文, 日比隆雄, 木元久: 細胞表層で働くグラム陽性細菌由来キチナーゼの機能と立体構造. 第5回応用糖質フレッシュシンポジウム, 福山市, 2016.

〔図書〕(計1件)

Itoh, T. and Kimoto, H.: Bacterial chitinase system as a model of chitin biodegradation. Targeting Chitin-containing Organisms: Advances in Experimental Medicine and Biology, 2019, 1142. 131-151, Yang, Q. and Fukamizo, T. (Eds.), Springer, Singapore.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.fpu.ac.jp/faculty_members/ito-t.html

6. 研究組織

(1) 研究協力者

日弁 隆雄 (HIBI, Takao)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号: 00285181

木元 久 (KIMOTO, Hisashi)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号: 70283166

藤井 豊 (FUJII, Yutaka)

福井大学・医学部・教授

研究者番号: 80211522

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。