

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19780163

研究課題名（和文） 海洋細菌が分泌するキチナーゼの修飾糖鎖に関する基礎的研究

研究課題名（英文） Studies on glycosylation of chitinase secreted by marine bacteria

研究代表者

系井 史朗 (ITOI SHIRO)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：30385992

研究成果の概要：海洋細菌 *Vibrio proteolyticus* 由来キチナーゼの分子量が明らかに理論値よりも大きいことから、翻訳後修飾の可能性が高いと考え、研究を進めた。当該タンパク質の大腸菌組換え体が複数のレクチンを用いるレクチンブロッキングにより陽性反応を示した。また、850 アミノ酸からなる当該組換えキチナーゼの一次構造のうち、C 末端側 250 アミノ酸を欠損する組換え体を作製し、レクチンブロッキングを試みた結果、C 末端側欠損組換え体でも陽性反応が認められ、この領域中に糖鎖修飾部位が存在する可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：キチナーゼ、海洋細菌、糖鎖修飾、結晶キチン、*Vibrio proteolyticus*

1. 研究開始当初の背景

魚類腸内から分離された海洋細菌 *Vibrio proteolyticus* が α 型結晶キチンを速やかに分解することを見出し、そのキチナーゼの分離および全長 850 アミノ酸残基をコードする 3,500 bp の当該遺伝子をクローニングした。演繹アミノ酸配列を既報のキチナーゼ A 前駆体タンパク質のものと比較した結果、他の *Vibrio* 属キチナーゼ A 前駆体と約 80% の高いアミノ酸同一率を示した。また、その一次構造から、糖鎖分解酵素ファミリー 18 に分類さ

れる領域を有すると共に、フィブロネクチンタイプ III 様領域および糖鎖結合領域を含むことを明らかにした (図 1)。ただし、既報の *Vibrio carchariae* (*Vibrio harveyi*) のキチナーゼ A は、N 末端側のシグナル配列および C 末端側のフィブロネクチンタイプ III 様領域以後がプロセッシングを受けることで、63~65 kDa の成熟タンパク質となることが報告されており、申請者が分離・遺伝子クローニングしたキチナーゼとは大きく異なる。

この *V. proteolyticus* 由来のキチナーゼは、

SDS-PAGE ゲル上での分子量は約 110 kDa であるのに対し、クローニングした遺伝子配列から演繹されるアミノ酸配列を元に計算すると 90 kDa に満たないことが報告されている。また、当該遺伝子を発現ベクターに組み込んだ後、リコンビナントタンパク質を回収して SDS-PAGE に供したところ、このリコンビナントタンパク質も *V. proteolyticus* が分泌したタンパク質サイズと同様、約 110 kDa であった。このように SDS-PAGE ゲル上および演繹アミノ酸からの計算値が大きく異なる理由として糖鎖修飾による可能性が示唆された。しかしながら、一般的に、リコンビナントタンパク質を大腸菌で発現させる場合、糖鎖修飾されないことが知られている。

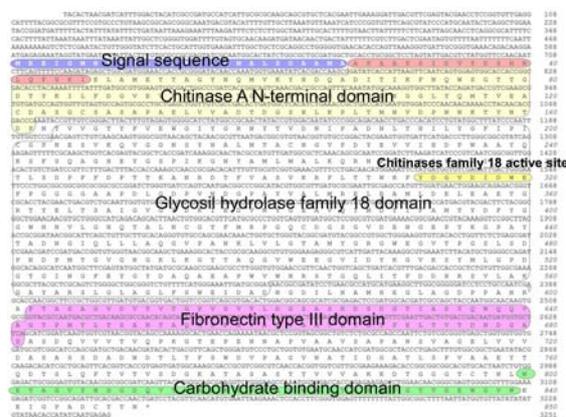


図 1. *Vibrio proteolyticus* キチナーゼ遺伝子の塩基配列および演繹アミノ酸配列。赤枠で示したアミノ酸配列は、N 末端アミノ酸配列分析で決定されたものと一致した部分を示す。ドメイン構造は、既報のキチナーゼとの比較で推定した。

2. 研究の目的

これまで一般的に細菌が発現するタンパク質は糖鎖修飾を受けないとされ、実際に真核生物由来のリコンビナントタンパク質を大腸菌の発現系を用いて正常に発現させることは不可能であった。これらリコンビナントタンパク質を正常に発現させる場合、酵母発現系やバキュロウィルスを用いた昆虫培養細胞系などがよく用いられている。近年、細菌由来のタンパク質が糖鎖修飾を受けていることが報告され始めているが、その数は非常に少ないのが現状である。

以上のことから本研究では、海洋細菌 *V. proteolyticus* が分泌するキチナーゼの糖鎖修飾について調べるとともに、当該キチナーゼ

遺伝子を連結した発現ベクターにより形質転換した大腸菌が分泌するリコンビナントキチナーゼの分子量増大の原因を明らかにすることを目的として行った。

3. 研究の方法

カニの甲羅由来 α 型結晶キチンを含む液体培地中で海水魚腸管内由来の *V. proteolyticus* を培養し、未分解の残留キチンに結合しているタンパク質を回収した。また、当該キチナーゼ遺伝子を連結した発現ベクターで大腸菌を形質転換し、発現系大腸菌株を作出した (図 2)。発現系大腸菌株は、糖鎖修飾部位を絞り込むため、C 末端側 250 アミノ酸残基を欠損させたものの発現系も作出した (図 2)。これら発現ベクターには、Novagen 社の pET vector を用い、発現用大腸菌には、BL21(DE3) 株を用いた。

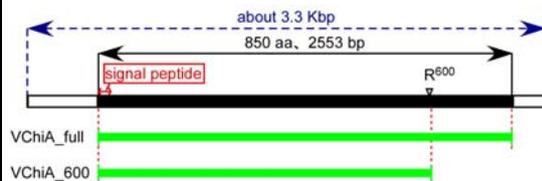


図 2. 発現系構築に用いた *Vibrio proteolyticus* 由来キチナーゼの模式図。キチナーゼ 850 アミノ酸残基をコードする約 3.3 kbp のうち、全長 850 アミノ酸コード領域 (VChiA_full) および C 末端側 250 残基を欠失する領域 (VChiA_600) を発現ベクターに連結した。R⁶⁰⁰ は、N 末端から 600 残基目のアルギニンを示す。

作出したこれら大腸菌株のリコンビナントタンパク質の発現を誘導し、培養上清を回収した。これらタンパク質試料につき SDS-PAGE 分析により、リコンビナントタンパク質の発現チェックを行った。また、リコンビナントタンパク質の配列確認は、SDS-PAGE 分析後、セミドライブロッキング法により PVDF 膜に転写し、N 末端アミノ酸配列分析を行った。

リコンビナントタンパク質の発現および配列を確認できたものから、SDS-PAGE 分析後、N 末端アミノ酸配列分析の場合と同様に、セミドライブロッキング法により PVDF 膜に転写した。タンパク質試料を転写した PVDF 膜は、ブロッキング後、糖鎖を認識するレクチンを用いるレクチンブロッキング

グに供した。レクチンには、WGA および ConA を用いた。レクチンブロッキングの際、糖タンパク質として知られるヒトトランスフェリンを陽性コントロールとして、糖タンパク質ではないウシ血清アルブミンを陰性コントロールとして同時に処理した。

4. 研究成果

V. proteolyticus が分泌したキチン結合タンパク質およびそのリコンビナントタンパク質を SDS-PAGE 分析に供した結果、キチン結合タンパク質では、主に約 140 および 110 kDa のタンパク質バンドが観察された (図 3)。また、発現系大腸菌の培養上清では、*V. proteolyticus* 由来キチナーゼの全長をコードする遺伝子を組み込んだベクターを有する株では約 110 kDa、C 末端側 250 アミノ酸残基を欠失させたキチナーゼの遺伝子を組み込んだベクターを有する株では約 70 kDa のタンパク質バンドが観察された (図 3)。

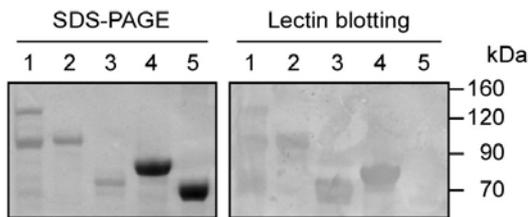


図 3. *Vibrio proteolyticus* 由来キチン結合タンパク質および大腸菌リコンビナントのレクチンブロッキングパターン。レクチンには WGA を用いた。レーン 1: *V. proteolyticus* 由来キチン結合タンパク質、レーン 2: 大腸菌リコンビナント (全長)、レーン 3: 大腸菌リコンビナント (C 末端側 250 残基欠損)、レーン 4: ヒトトランスフェリン (陽性コントロール)、レーン 5: ウシ血清アルブミン (陰性コントロール)。

これらリコンビナントタンパク質はいずれも演繹アミノ酸配列から算出される 89 kDa および 62 kDa よりも大きな分子サイズであったため、N 末端アミノ酸配列分析に供して配列を確認した結果、APAAPSIDVYGSNNLQFSKI の 20 アミノ酸残基が決定された。(図 4)。既知のデータと比較した結果、*V. proteolyticus* のキチナーゼ A と完全に一致し、その他 *Vibrio* 属のキチナーゼ A とも高いアミノ酸同一率を示した。なお、陽性コントロールとして用いたヒトトランスフェリンおよび陰性コントロールとして

用いたウシ血清アルブミンは、それぞれ約 80 kDa および 65 kDa のタンパク質バンドとして検出された (図 3)。

Recombinants	-----APAAPSIDVYGSNNLQFSKI	20
<i>V. proteolyticus</i>	MNRITLCAASIAMALSGAAMA.....	46
<i>V. parahaemolyticus</i>	MIRFNLCAAGVALALSGAAVA..T...V.M.....	42
<i>V. alginolyticus</i>	MIRFNLCAAGVALALSGAAVA..T...V.M.....	42
<i>V. harveyi</i>	MIRFNLCAAGVALALSGAANA..T...I.M.....	42
<i>V. cholerae</i>	MNRMTLCAASIALASTAMA..S...V.....	42

図 4. *Vibrio proteolyticus* 由来キチナーゼリコンビナントの N 末端アミノ酸配列および関連種キチナーゼの当該配列との比較。右端の数字は、N 末端からのアミノ酸残基数を示す。

V. proteolyticus (DNA database accession no. AB252739), *Vibrio alginolyticus* (protein database accession no. CAC29091), *Vibrio parahaemolyticus* (BAC61398), *Vibrio harveyi* (*Vibrio carchariae*, Q9AMP1), *Vibrio splendidus* (ZP_00992475), *Alteromonas* sp. (P32823), *Aeromonas hydrophila* (DNA database accession no. AF251793) and *Serratia plymuthica* (protein database accession no. P97034)。

これらタンパク質試料を SDS-PAGE 分析後、PVDF 膜に転写し、糖鎖を認識するレクチン (WGA) を用いるレクチンブロッキングに供した。その結果、*V. proteolyticus* が分泌したキチン結合タンパク質では、約 140 および 110 kDa のタンパク質バンドに加え、複数の陽性反応が認められた。これらタンパク質バンドは、本研究を行うきっかけとなる予備実験で、N 末端アミノ酸配列分析により、キチナーゼ A であることが確認されている。また、発現系大腸菌の培養上清では、全長をコードする遺伝子および C 末端側欠損型の遺伝子を組み込んだベクターを有する株のいずれのタンパク質バンドでも陽性反応を示した (図 3)。なお、陽性コントロールとして用いたヒトトランスフェリンでは、陽性反応が観察されたのに対し、陰性コントロールとして用いたウシ血清アルブミンでは、反応は認められなかった (図 3)。

以上の結果は、海洋細菌由来のタンパク質が糖鎖修飾されているだけでなく、大腸菌発現系のリコンビナントタンパク質も糖鎖修飾されていることを示唆する。今後、さらに分析を進め、糖鎖修飾を受けるアミノ酸残基の特定を行う予定である。

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 4件)

- ① Shiro Itoi, Kohei Yuasa, Sayaka Washio, Takeshi Abe, Erika Ikuno and Haruo Sugita: Phenotypic variation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates derived from intestinal tracts of marine and freshwater fishes. *Journal of Applied Microbiology* 印刷中, 2009. 査読有
- ② Kazunari Kadokura, Yusuke Sakamoto, Akiko Rokutani, Takanori Ikegami, Takao Hirano, Mahiro Yamamoto, Kaori Saito, Wataru Hakamata, Shiro Itoi, Haruo Sugita, Tadatake Oku and Toshiyuki Nishio: Purification, characterization and cloning of *Vibrio parahaemolyticus* chitinolytic enzymes and application to oligosaccharide production. *Journal of Applied Glycoscience* **55**, 157-164, 2008. 査読有
- ③ Shiro Itoi, Yuna Kanomata, Yuki Koyama, Kazunari Kadokura, Shinsuke Uchida, Toshiyuki Nishio, Tadatake Oku and Haruo Sugita: Identification of a novel endochitinase from a marine bacterium *Vibrio proteolyticus* strain No. 442. *Biochimica et Biophysica Acta* **1774**, 1099-1107, 2007. 査読有
- ④ Kazunari Kadokura, Akiko Rokutani, Masahiro Yamamoto, Takanori Ikegami, Haruo Sugita, Shiro Itoi, Wataru Hakamata, Tadatake Oku and Toshiyuki Nishio: Purification and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* extracellular chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase involved in the production of heterodisaccharide from chitin. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**, 357-365, 2007. 査読有

[学会発表] (計 2件)

- ① 鹿股悠奈、糸井史朗、門倉一成、西尾俊幸、奥忠武、杉田治男：海洋細菌 *Vibrio proteolyticus* 由来キチナーゼのpH依存性に及ぼすC末端領域の影響。平成19年度日本水産学会秋季大会、2007年9月26日、函館（北海道大学水産学部）
- ② 鹿股悠奈、糸井史朗、内田晋輔、門倉一成、西尾俊幸、奥忠武、杉田治男：海洋細菌 *Vibrio proteolyticus* 由来エンドキチナーゼの精製および活性におよぼすC末端領域の影響。2007（平成19）年度日本水産増殖学会大会、2007年7月18日、品川（東京海

洋大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

糸井 史朗 (ITOI SHIRO)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：30385992