

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06340

研究課題名(和文) Paenibacillus属細菌によるキチン分解の制御機構の解明

研究課題名(英文) Studies of chitin degradation mechanism of Paenibacillus sp.

研究代表者

伊藤 貴文 (Itoh, Takafumi)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：10402827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で次の成果を得た。(1) キチンオリゴ糖分解酵素の解析：P. FPU-7株がGlcNAcaseIによりキチンオリゴ糖を単糖にまで分解することを決定した。(2) アルギン酸リアーゼの解析：P. FPU-7株のアルギン酸リアーゼの諸性質を決定した。アルギン酸オリゴ糖はイネ及びコマツナ根の伸長を促進した。(3) キチンオリゴ糖結合タンパク質の解析：キチンオリゴ糖結合タンパク質の糖認識機構を決定した。(4) 二成分制御系タンパク質の解析：二成分制御系タンパク質NagSと糖質との相互作用を解析したところ、NagSがキチンオリゴ糖結合タンパク質を介して、キチンに応答することが示唆された。

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、カニ殻由来の固体状のキチンをも強力に分解する。P. FPU-7のキチン分解を制御し、有用なキチンオリゴ糖を効率的に生産するためには、分解されたキチンがどのように取り込まれ、どのように利用されているのかも明らかにする必要がある。今回、P. FPU-7が細胞表層でどのようにキチンを認識しているのかについて、その一端を明らかにした。また、取り込んだオリゴ糖を分解する酵素やアルギン酸分解酵素についてもその諸性質と立体構造を決定した。これらの成果は、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。

研究成果の概要(英文)：The following results were obtained in this study.(1) Analysis of chitin oligosaccharide degrading enzyme: P. FPU-7 degrades chitin oligosaccharides to monosaccharides by GlcNAcase NagZ in the cytosol.(2) Analysis of alginate lyase: The alginate lyase of P. FPU-7 was characterized and the enzymatic products of alginate promoted the elongation of rice and spinach roots.(3) Analysis of chitin oligosaccharide-binding proteins: The chitin oligosaccharides recognition mechanisms of two chitin oligosaccharide-binding proteins (NagB1 and NagB2) were determined.(4) Analysis of two-component regulatory protein: Analysis of the interaction between the two-component regulatory protein NagS and chitin oligosaccharides suggested that NagS recognizes to chitin oligosaccharides through NagB1.

研究分野：環境農学

キーワード：alginate alginate lyase chitin chitin binding protein glucanase Paenibacillus

1. 研究開始当初の背景

キチンは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(病害抵抗性誘導)や健康機能性食品(免疫賦活作用など)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未だ重要な課題である。

我々は、これまでに土壌よりキチン分解能に優れた *Paenibacillus* 属細菌(*P. FPU-7*)を見出し(Itoh *et al. Appl. Environ. Microbiol.* 2013)、その強力なキチン分解能力や分解機構についての研究を進めてきた(Itoh *et al. PLoS One* 2016 他)。そして、細菌による多糖の分解に関する理解を深め、未利用資源となっている難分解性の多糖の利用拡大を目指し、研究を行ってきた。

多糖キチンの細菌による分解は、我々の研究も含め、分解酵素を中心に広く研究されてきた。しかし、分解されたオリゴ糖がどのように細菌に利用されているのか、その理解は不十分であった。細菌の多糖分解を自在に制御するためには、分解されたオリゴ糖がどのように取り込まれ、利用されているのか、分解はどのように制御されているのかを明らかにする必要があった。また、鎖長のそろったオリゴ糖を生産する酵素の解析は、潜在的な機能性を有する新たな素材の調製方法の開発ともなり、未利用資源のさらなる有効利用にも繋がる。

我々が見出した *P. FPU-7* は、細胞外に複数種のキチン分解酵素を分泌し、さらに細胞表面提示型のキチン分解酵素も利用して、多糖キチンを2糖にまで強力に分解する。*P. FPU-7* のキチン分解とその制御機構を解明することは、他の難分解性の多糖も含めて、より効率的で環境負荷の少ない多糖分解法の確立に繋がる。また、キチンなどの多糖を分解して得られるオリゴ糖や単糖は、多糖と比較して粘性が低く、水によく溶け、多糖よりも利用しやすいだけでなく、植物の生体防御機構を活性化する活性(エリシター活性)や動物に対する免疫賦活作用など多糖とは異なった様々な生理活性も確認されている。これまでの研究過程で *P. FPU-7* の培養液中に新規なアルギン酸リアーゼも見出した。この酵素はアルギン酸3から5糖を純度良く生産する。この酵素の反応特異性を理解し、反応を制御できれば、生理活性オリゴ糖生産酵素の実現に繋がり、例えば、化学農薬および化学肥料の使用量の削減に寄与することも期待される。このように、細菌の多糖分解の解明研究は、低環境負荷型の機能性材料生産技術の確立に貢献する。



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。

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、「*Paenibacillus* 属細菌によるキチン分解の制御機構の解明」を計画した。我々は、キチン分解性細菌 *P. FPU-7* のゲノムの解読もほぼ終了し、*P. FPU-7* が持つ潜在能力の利用研究を展開してきた。本研究では、キチンオリゴ糖を *P. FPU-7* の細胞内に輸送するタンパク質や、細胞内でオリゴ糖を分解する酵素の機能解析を行うことを目的とした。さらに、キチン分解に関わるタンパク質の発現を制御している機構の解析を行い、その知見によって、*P. FPU-7* のキチン分解に関わる遺伝子の発現を自在に制御し、多糖の分解を制御する技術の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞内キチンオリゴ糖分解酵素の解析

P. FPU-7 株由来 β -グルコシダーゼ(NagZ)を大腸菌を用いて大量に調製した。精製した酵素に対して、生化学的手法による諸性質の決定とX線結晶構造解析を行った。

(2) アルギン酸分解酵素(AlgL)の解析とアルギン酸オリゴ糖の種子に対する効果

P. FPU-7 株のアルギン酸分解酵素(AlgL)を大腸菌を用いて大量に調製した。精製酵素に対して、生化学的手法による諸性質の決定とX線結晶構造解析を行った。この酵素を利用して、3から5糖の不飽和アルギン酸オリゴ糖を調製し、イネ及びコマツナ種子の培地に添加し、発芽させ、根の伸長を観察した。また、植物体のグルカナーゼ活性も測定した。

(3) キチンオリゴ糖結合タンパク質の糖質結合能の解析

キチンオリゴ糖結合タンパク質候補(NagB1とNagB2)2種類、大腸菌を用いて大量に調製した。精製タンパク質に対して、SyproOrangeを用いた示差走査蛍光定量法により結合する糖質を探索した。結合した糖に対しては、分子間相互作用解析を実施した(Biacore)。さらに、X線結晶構造解析によって、それらタンパク質のオリゴ糖認識機構を決定した。

(4) 二成分制御系タンパク質の解析

NagB1 遺伝子近傍に、二成分制御系タンパク質 NagS (センサータンパク質) と NagR (レスポンスレギュレーター) の遺伝子を検出した。NagS と NagR、大腸菌による調製を試みた。NagS のセンサードメイン領域のタンパク質 (NagS³⁰⁻²⁹⁴) も調製した。NagS³⁰⁻²⁹⁴ については、様々な糖質との相互作用を示差走査蛍光定量法によって解析した。また、NagS³⁰⁻²⁹ の結晶化スクリーニングを実施した。

4. 研究成果

本研究では、再生可能な生物資源である多糖キチンの有効利用を目指し、「*Paenibacillus* 属細菌によるキチン分解の制御機構の解明」を行い、次の成果を得た。

(1) 細胞内キチンオリゴ糖分解酵素の解析

P. FPU-7 株が β -グルコシダーゼ (NagZ) を利用して、細胞質内に取り込まれたキチンオリゴ糖を単糖にまで分解することを明らかにし、その酵素学的諸性質と立体構造を決定した (図 2)。そして、本酵素が細胞質内でキチンオリゴ糖代謝に関わっているだけでなく、細胞壁多糖のリサイクルにも関与していることが示唆された。

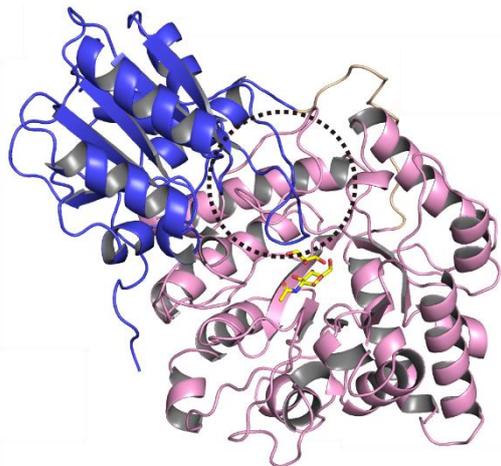


図 2:

細菌 *P. FPU-7* は NagZ を利用して、細胞内でキチンオリゴ糖を単糖にする。

(2) アルギン酸分解酵素 (AlgL) の解析とアルギン酸オリゴ糖の種子に対する効果

P. FPU-7 株のアルギン酸分解酵素 (AlgL) の酵素学的諸性質と立体構造を決定した (図 3)。この酵素により、3 から 5 糖の不飽和アルギン酸オリゴ糖を調製し、オリゴ糖のイネ及びコマツナ種子発芽に対する影響を調べたところ、このオリゴ糖は優位に根の伸長を促進した。また、植物体の β -グルカナーゼ活性はオリゴ糖の有無で差が無かった。よって、不飽和アルギン酸オリゴ糖は、植物のエリシター活性を誘導せず、別の機構によって、根の伸長を促進することが示唆された。

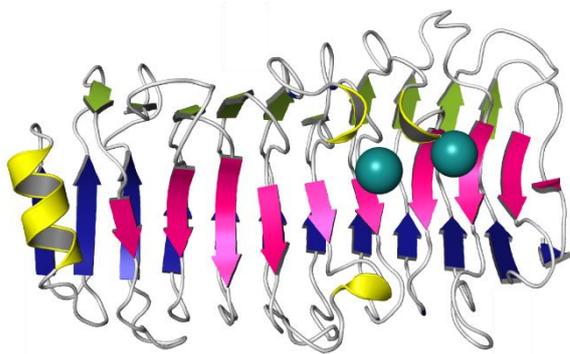


図 3:

細菌 *P. FPU-7* のアルギン酸分解酵素

(3) キチンオリゴ糖結合タンパク質の糖質結合能の解析

キチンオリゴ糖を菌体内へ輸送する装置として、キチンオリゴ糖結合タンパク質 (NagB1 と NagB2) を2種類見出し、オリゴ糖との結合と解離を分子間相互作用解析によって解析し、さらに、X線結晶構造解析によって、それらタンパク質のオリゴ糖認識機構を決定した (図4)。

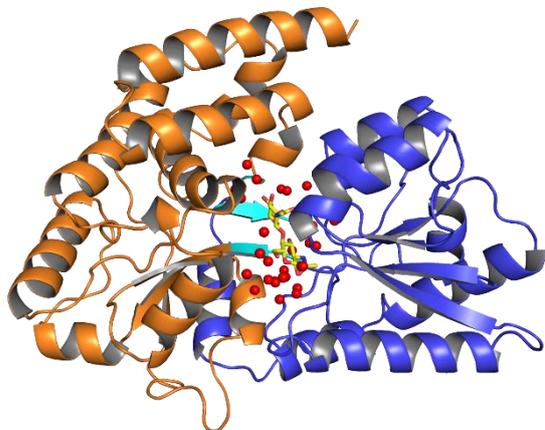


図4:

細菌 *P. FPU-7* は NagB1 と NagB2 を利用して、表層でキチンオリゴ糖を捉える。

(4) 二成分制御系タンパク質の解析

NagB1 遺伝子近傍に、二成分制御系タンパク質 NagS (センサータンパク質) と NagR (レスポンスレギュレーター) の遺伝子を検出した。組換え NagS 全長タンパク質は微量であるが精製タンパク質を取得した。NagR についても組換えタンパク質を取得した。NagS のセンサードメインとして働くと予想されるタンパク質 (NagS³⁰⁻²⁹⁴) も取得した。NagS³⁰⁻²⁹⁴ に関して、キチン2糖を含む様々な糖質との相互作用を解析した。NagS がキチン2糖と直接結合せず、キチン2糖結合タンパク質 (NagB1) を介して、キチン2糖に応答することが示唆された。また、NagS³⁰⁻²⁹⁴ の微結晶が得られ、予備的な X 線回折実験を実施した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Itoh Takafumi, Yaguchi Misaki, Nakaichi Akari, Yoda Moe, Hibi Takao, Kimoto Hisashi	4. 巻 5
2. 論文標題 Structural characterization of two solute-binding proteins for N,N'-diacetylchitobiose/ N,N',N''-triacetylchitotriose of the gram-positive bacterium, Paenibacillus sp. str. FPU-7	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Structural Biology: X	6. 最初と最後の頁 100049 ~ 100049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjsbx.2021.100049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Itoh Takafumi	4. 巻 In press
2. 論文標題 Structures and functions of carbohydrate-active enzymes of chitinolytic bacteria Paenibacillus sp. str. FPU-7	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Itoh Takafumi, Araki Tomomitsu, Nishiyama Tomohiro, Hibi Takao, Kimoto Hisashi	4. 巻 166
2. 論文標題 Structural and functional characterization of a glycoside hydrolase family 3 -N- acetylglucosaminidase from Paenibacillus sp. str. FPU-7	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 503 ~ 515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Itoh Takafumi, Nakagawa Emi, Yoda Moe, Nakaichi Akari, Hibi Takao, Kimoto Hisashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Structural and biochemical characterisation of a novel alginate lyase from Paenibacillus sp. str. FPU-7	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51006-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤 貴文
2. 発表標題 糖質関連酵素の反応機構に関する構造生物学的研究
3. 学会等名 北陸支部第37回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川 えみ、伊藤 貴文、三浦 孝太郎、日比 隆雄、木元 久
2. 発表標題 Paenibacillus 属細菌由来アルギン酸リアーゼの反応機構と反応産物の植物に対する効果
3. 学会等名 第12回 北陸合同バイオシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 貴文、中川 えみ、要田 萌、仲市 あかり、日比 隆雄、木元 久
2. 発表標題 Paenibacillus sp. str. FPU-7由来アルギン酸リアーゼの立体構造
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------