

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 4日現在

機関番号：33803

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780064

研究課題名（和文） 放線菌を利用した新規オリゴ糖-ポリオールトランスポーターの探索と機能解明

研究課題名（英文） Exploration and characterization of novel transporters for oligosaccharides and polyols in actinomycetes

研究代表者 齋藤 明広 (SAITO AKIHIRO)

静岡理工科大学・理工学部・准教授

研究者番号：50375614

研究成果の概要（和文）： ストレプトミセス属放線菌において複数のオリゴ糖-ポリオールの輸送に関わる ATP-binding cassette タンパク質 MsiK を利用することで、輸送系未知の糖質に対する新規 ABC トランスポーターを見出し、その機能を解明することを目的とした。タグ付 MsiK タンパク質を用いたプルダウン法と放線菌の膜画分に対する Blue-Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis 法を確立した。得られたタンパク質画分には、輸送糖質不明の ABC 輸送系タンパク質が含まれていた。生化学的な解析により、検出されたタンパク質の一群が新規の輸送特異性を有する輸送系であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： MsiK is an ATP-binding cassette protein, which is essential for uptake of some oligosaccharides in streptomycetes. In this study, we successfully obtained proteins interacting MsiK by pull-down method, Blue-Native PAGE, and subsequent mass spectrometry analysis. One of the gained proteins, of which transport substrates are unknown, was suggested to possess novel binding specificity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：応用微生物学・微生物代謝

キーワード：ABC トランスポーター、放線菌、糖質輸送系

1. 研究開始当初の背景

放線菌は、土壤中の主要な生体高分子分解細菌である。研究代表者らは、モデル放線菌の一つ *Streptomyces coelicolor* A3(2) について、キチン（アミノ多糖の一種）の分解系について研究してきた（図1）。その中で、(1) キチン分解二糖である *N,N'*ジアセチルキトビオース [(GlcNAc)₂] の新規の ABC

(ATP-binding cassette) 型輸送系 DasABC を発見した (Saito ら 2007)。また、(2) DasABC の機能に必須である ATPase サブユニット MsiK を同定した (Saito ら 2008)。興味深いことに、MsiK は、その他のオリゴ糖（マルトース、セロビオース/セロトリオース、キシロビオース/キシロトリオース）の ABC 輸送系に共通する必須成分である

(Schlösser ら 1997; Saito ら 2008)。このような例は、他の原核生物にはない。MsiK は、ストレプトミセス属放線菌に特有のオリゴ糖輸送系必須成分である。

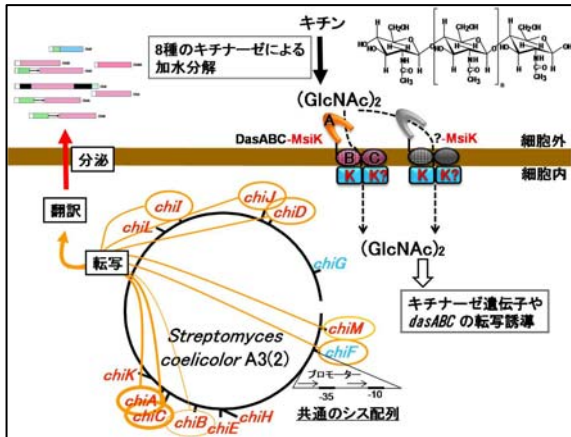


図1. *Streptomyces coelicolor* でのキチン分解と分解産物輸送のモデル。細胞内に輸送された (GlcNAc)₂ がキチン分解関連遺伝子の転写を誘導する。

2. 研究の目的

S. coelicolor A3(2)ゲノムの特徴の1つは、多くの分泌型加水分解酵素と輸送系の遺伝子をもつことである (Bentley et al. 2002 Nature)。有用機能を持つことが多いオリゴ糖とポリオール [以下, OSP (Oligosaccharides and Polyols)] の輸送に関わると推定される ABC 輸送系 (以下, OSP-ABC 輸送系) 遺伝子群は 37 セット存在するが、そのうち 28 セットは、アミノ酸配列に基づく輸送糖質の推定ができない。他の原核生物では OSP-ABC 輸送系遺伝子群 1 セットに特異的な ATPase サブユニット遺伝子が 1 つずつ存在するのに対し、*S. coelicolor* では 37 もの OSP-ABC 輸送系遺伝子群に対して ATPase サブユニット遺伝子が MsiK (上述) を含めて 2 つしか存在しないことも特徴的である (未発表)。これら 2 つの ATPase サブユニット遺伝子の産物は、37 セットの OSP-ABC 輸送系と二者択一で相互作用して機能することが想像された (Saito et al. 2008)。本研究では、(ア) 放線菌が数多くのオリゴ糖 - ポリオールの推定輸送系遺伝子群をもつことと、(イ) それらに共通する 2 つの ATPase サブユニットを有することを利用して、輸送系不明のオリゴ糖 - ポリオールの新規輸送系を効率的に探索、同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *msiK* 遺伝子とそのホモログ遺伝子の機能の比較解析

MsiK ホモログ遺伝子の機能を解明するた

め、同遺伝子を相同組換えによって破壊した。得られた破壊株と親株、及び、既得の *msiK* 破壊株 について、輸送系未知のものを中心に、各種オリゴ糖/ポリオールの資化性を調べた。

(2) MsiK と相互作用するタンパク質の取得と解析

3' 端に 6xHis タグが付加するように人工的な配列を付加した *msiK* 遺伝子とその上流域をプラスミドベクター pWHM3BE を用いて *msiK* 遺伝子破壊株 ASC3 に導入した。得られた形質転換体を各種の糖質存在下で培養した後、膜画分を調製し、ニッケル親和性によって MsiK およびそれと相互作用するタンパク質を含む画分を得た。得られた画分をブルーネイティブページ (BN-PAGE) によりさらに分画し、イムノブロット解析によって MsiK を含むスポットを判別した。得られたスポットについて、トリプシンと Orbitrap-質量分析計を用いたペプチドマスマフィンガープリンティング法 (PMFP) によって解析を行った。

(3) 放線菌由来の ABC 輸送系受容体様タンパク質の大腸菌での生産・精製と結合特異性の解析

C 末端側にヒスチジンタグを付加した組換えタンパク質を大腸菌のペリプラズムに分泌生産させた。コールドオズモティックショック法によって、ペリプラズムタンパク質を抽出した後、Ni 親和性によって組換えタンパク質を精製した。結合特異性は、タンパク質の蛍光強度の変化を測定することで決定した。

4. 研究成果

(1) *msiK* 遺伝子とそのホモログ遺伝子の機能の比較解析

msiK 遺伝子破壊株が 28 種類中 17 種類の糖質を唯一の炭素源とする最少培地で生育できなかったのに対し、MRC 株とその親株である M145 株は 28 種全ての糖質を資化した。これらの結果から、*msiK* がこれら 17 種類の糖質の資化に必須であるのに対し、*mhpK* は 28 種類の糖質の資化に必須でないことが判明した。

(2) タグ付加 MsiK タンパク質の *msiK* 破壊株での生産系の構築

C 末端にヒスチジンタグ (His タグ) を付加した MsiK (以下、MsiK^{His}) を、*msiK* 破壊株においてネイティブの推定プロモーターの制御下で発現させた。発現させた MsiK^{His} は、Ni 親和性クロマトグラフィーによって、回収することができた。また、MsiK^{His} と相互作用すると考えられるタンパク質を得ることができた。

(3) BN-PAGE 系の構築と MsiK と相互作用するタンパク質の同定

各種培養条件下で His-MsiK を生産させた *S. coelicolor* A3(2)細胞を破碎し、ニックル親和性クロマトグラフィーによって MsiK と相互作用すると考えられるタンパク質を得た。得られたタンパク質試料について、条件を検討・最適化することで、Blue-Native PAGE (BN-PAGE) によって複合体をバンドとして分離することに成功した。得られた複合体バンドに含まれるタンパク質を、ペプチドマスマスフィンガープリンティング法 (PMFP) によって網羅的に検出、同定した。コロイド状キチンを炭素源として培養した放線菌細胞を用いてこれらの解析を行ったところ、キチン分解産物の輸送に関わると推定される輸送系基質未同定の輸送系受容体様タンパク質 A, B, C を見いだすことができた。

(4) タンパク質 A,B,C の結合特異性

タンパク質 A, B については、大腸菌のペリプラズムに生産・精製し、蛍光消光法によって各種糖質との相互作用解析を行った。その結果、タンパク質 A はマルトースに特異的に結合するタンパク質であり、タンパク質 B は *N*-アセチルグルコサミン、*N*-アセチルマンノサミン、*N*-アセチルガラクトサミン、*N*-アセチルムラミン酸に結合することが示唆された。タンパク質 B は、*S. coelicolor* A3(2)の細胞で構成的に生産されており、そのレベルは *N*-アセチルグルコサミンおよび *N,N'*-ジアセチルキトビオースの存在下で 1.5 倍程度増加した。タンパク質 B をコードする遺伝子については破壊株を作成し、表現系を解析した。

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 9 件)

- ① Kouzai Y, Mochizuki S, Saito A, Ando A, Minami E, Nishizawa Y (2012) Expression of a bacterial chitinase in rice plants improve disease resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell Reports*. 31:629-636. (査読あり) DOI: 10.1007/s00299-011-1179-7
- ② Nazari B, Saito A, Kobayashi M, Miyashita K, Wang Y, Fujii T (2011) High expression levels of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in soil. *FEMS Microbiology Ecology*. 77: 623-635. (査読あり) DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01143.x
- ③ Shibasaki A, Kudo T, Yaguchi T, Saito A, Ando A, Mikami Y, Gono T (2011) *Streptomyces coaveratus* sp. nov., isolated from the intestinal tract of *Armadillidium vulgare*. *International Journal of Systematic and Environmental Microbiology*. 61:1073-1077. (査読あり) DOI:

ijs.0.019091-0v161/5/1073

- ④ Kamijo T, Saito A, Ema S, You I, Hayashi H, Nagata R, Nagata Y, Ando A (2011) Molecular and enzymatic characterization of a subfamily I.4 lipase from an edible oil degrader *Bacillus* sp. HH-01. *Antonie van Leeuwenhoek*. 99:179-187. (査読あり) DOI: 10.1007/s10482-010-9474-9
- ⑤ 齋藤政則, 篠山浩文, 齋藤明広, 知久和寛, 安藤昭一 (2011) スギ落葉から分離した *Pestalotiopsis* sp. 属糸状菌が生産するカテコール配糖化酵素の精製と諸性質. *食と緑の科学*. 65: 75-80. (査読あり)
- ⑥ 齋藤政則, 篠山浩文, 齋藤明広, 知久和寛, 安藤昭一 (2010) *Trichoderma* sp. 由来のフェノール類配糖化酵素の精製と諸性質. *食と緑の科学*. 64: 35-41. (査読あり)
- ⑦ 齋藤明広 (2010) 「放線菌によるキチンの認識機構」 *バイオサイエンスとインダストリー*. 68: 412-414. (査読なし)
- ⑧ Saito A, Ooya T, Miyatsuchi D, Fuchigami H, Terakado K, Nakayama S, Watanabe T, Nagata Y, Ando A (2009) Molecular characterization and anti-fungal activity of a family 46 chitinase from *Amycolatopsis* sp. CsO-2. *FEMS Microbiology Letters*. 293: 79-84. (査読あり) DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01507.x
- ⑨ Chiku K, Dohi H, Saito A, Ebise H, Kouzai Y, Shinoyama H, Nishida Y, Ando A (2009) Enzymatic synthesis of 4-hydroxyphenyl β -D-oligoxylsides and their notable tyrosinase inhibitory activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 73: 1123-1128. (査読あり) DOI: <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.80885>

[学会発表] (計 18 件)

- ① 菊地彩美, 齋藤明広, 富田真世, 安藤昭一 「変異型キトサナーゼによるキトサンプローブの開発」日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都女子大学, 2012 年 3 月 24 日.
- ② 香西雄介, 望月進, 齋藤明広, 安藤昭一, 南栄一, 西澤洋子 「細菌キトサナーゼを発現するイネの作製とそのいもち病抵抗性の解析」日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都女子大学, 2012 年 3 月 23 日.
- ③ 折原由香里, 海老瀬広規, 村上聡史, 齋藤明広, 安藤昭一, 藤井毅, 宮下清貴 「放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) の DasD タンパク質は細胞内局在型 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼとして機能する」第 25 回キチン・キトサンシンポジウム, 奈良県新公会堂, 2011 年 8 月 31 日.

- ④ 茂木麻衣, 海老瀬広規, 村上聡史, 佐野ユカリ, 石井健雄, 木村明音, 齋藤明広, 安藤昭一「放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)におけるキトサナーゼ遺伝子の探索」第25回キチン・キトサンシンポジウム, 奈良県新公会堂, 2011年8月30日.
- ⑤ 太筈勇太, 齋藤明広「キチン2糖輸送系に変異を持つ放線菌を用いたキチン2糖生産の検討」第25回キチン・キトサンシンポジウム, 奈良県新公会堂, 2011年8月31日.
- ⑥ 海老瀬広規, 折原由香里, 村上聡史, 齋藤明広, 安藤昭一, 藤井毅, 宮下清貴「放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)の *dasD* 遺伝子のキチン分解における機能の解明」日本土壤肥料学会 2011年度つくば大会, エポカルつくば, 2011年8月9日.
- ⑦ 海老瀬広規, 村上聡史, 佐藤守, 安藤昭一, 齋藤明広「放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) における MsiK-ABC 輸送系複合体の探索」第8回大腸菌研究会, 2011年5月18日.
- ⑧ Ebise H, Iinuma C, Murakami S, Nakatake T, Ando A, Miyashita K, Fujii T, Saito A “Biological Roles of MsiK: the ATP-hydrolyzing component of multiple ABC sugar transporters in the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* A3(2)”, 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010), Aug. 4., 2010, Makuhari Messe, Chiba, Japan.
- ⑨ Nishida Y, Matsuda K, Koizumi A, Fukuda K, Dohi H, Harasawa R, Ichiyama K, Matsuda S, Saito A, Ebise H, Tokishige R, “Chemical structures, syntheses and applications of *Mycoplasma pneumoniae*-specific glycolipid antigens”, 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010), Aug. 4., 2010, Makuhari Messe, Chiba, Japan.
- ⑩ 齋藤明広, 飯沼千晴, 新屋友規, 出崎能丈, 澁谷直人, 安藤昭一, 藤井毅, 宮下清貴「放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)における2つの(GlcNAc)₂輸送系の役割」第24回キチン・キトサンシンポジウム, 東京大学, 2010年7月14日.
- ⑪ 佐野ユカリ, 村上聡史, 海老瀬広規, 齋藤明広, 新屋友規, 出崎能丈, 澁谷直人, 安藤昭一, 藤井毅, 宮下清貴, 「放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)のキチナーゼ生産における DasR の機能解析」第24回キチン・キトサンシンポジウム, 東京大学, 2010年7月14日.
- ⑫ 飯沼千晴, 齋藤明広, 安藤昭一, 糖質 ABC トランスポーター遺伝子 *ngcE* の *Streptomyces coelicolor* A3(2)での機能解明, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 東京大学, 2010年3月28日.
- ⑬ 大宮梢子, 齋藤明広, 安藤昭一, 「*Bacillus circulans* MH-K1 株のキトサナーゼにおける2つのシステイン残基の役割の解明」日本農芸化学会 2010 年度大会, 東京大学, 2010年3月29日.
- ⑭ Saito A, Fujii T, Shinya T, Shibuya N, Ando A, Miyashita K, “Chitinase-production and *N,N'*-diacetylchitobiose-uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2)”, The 11th International Conference on Chitin and Chitosan and The 8th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium, Sep. 8., 2009, Taiwan University of Science and Technology, Taipei, Taiwan.
- ⑮ 木村明音, 齋藤明広, 安藤昭一「放線菌でのキトサン分解産物の輸送とキトサナーゼ遺伝子の発現制御」第23回キチン・キトサンシンポジウム, 佐賀大学, 2009年8月20日.
- ⑯ 齋藤明広, 藤本瑞, 南栄一, 安藤昭一, 宮下清貴, Hildgund Schrempf, 門間充「*Streptomyces olivaceoviridis* の *N*-アセチルグルコサミン/*N,N'*-ジアセチルキトビオース ABC 輸送系の溶質結合タンパク質 NgcE の結晶構造」2009 年度日本放線菌学会大会, 秋田ビューホテル, 2009年7月16日.
- ⑰ 海老瀬広規, 村上聡史, 中武卓博, 齋藤明広, 安藤昭一「*Streptomyces coelicolor* A3(2)における糖質 ABC (ATP-binding cassette) 輸送系のカギを握るタンパク質 MsiK と相互作用するタンパク質の探索」2009 年度日本放線菌学会大会, 秋田ビューホテル, 2009年7月16日.

〔図書〕(計2件)

- ① 齋藤明広 他, 「物質と生命の科学」(惣田昱夫・出口潔 編著), 現代図書, 2011, 150 (113-122) .
- ② 齋藤明広 他, 「食品衛生食品衛生学実験書」(中村好志・白尾美佳編著), 光星館, 2011, 170 (60-12) .

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
齋藤 明広 (SAITO AKIHIRO)
静岡理工科大学・理工学部・准教授
研究者番号: 50375614
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし