

## 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 25 年 6 月 25 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22580381

研究課題名（和文） 細菌のキチン分解機構に関する研究

研究課題名（英文） A research for the chitinolytic systems of bacteria

研究代表者

辻坊 裕 (TSUJIBO HIROSHI)

大阪薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90175464

研究成果の概要（和文）：

グラム陰性海洋細菌 *Pseudoalteromonas piscicida* O-7 株は、キチン存在下において、4 種類のキチナーゼ、3 種類の *N*-アセチルグルコサミニダーゼおよび 2 種類のプロテアーゼを産生し、キチンを *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)にまで分解することを明らかにしている。最近、Illumina 社の Genome Analyzer を用いて、O-7 株のゲノム解析を行った結果、新たに 2 種類のキチナーゼ(ChiE、ChiF)および *N*-アセチルグルコサミニダーゼ(GlcNAcase D) 遺伝子が存在することを認めた。ChiE は、ChiA と相同性の高いファミリー18 に属する触媒ドメイン、およびその C 末端側に 2 つの PKD 領域と 2 つのキチン結合領域(ChtBD)を有する分子量 95.6 kDa の前駆体タンパク質としてコードされていた。また、*chiE* 遺伝子の 19 塩基上流域に、2 つの ChtBD を有するキチン結合タンパク質(Cbp2)をコードする ORF が認められた。さらに、ChiF は、ファミリー19 に属する触媒ドメイン、およびその C 末端側に機能未知領域と ChtBD 領域を有する分子量 53.1 kDa の前駆体タンパク質としてコードされていた。一方、GlcNAcase D は、シグナルペプチドを有し、ファミリー20 に属する触媒領域からなる分子量 88.7 kDa の前駆体タンパク質としてコードされていた。次に、これら遺伝子の転写量について検討したところ、GlcNAc 存在下で ChiE および Cbp2 遺伝子発現量は、培養中期において 2 倍に、GlcNAcase D 遺伝子発現量は、すべての培養時期において 30 倍に増大した。さらに、ChiE、ChiF、Cbp2 および GlcNAcase D のキチン分解系における役割を明らかにする目的で、それらタンパク質の高発現系を構築した。今後、それらタンパク質の生化学的および酵素学的諸性質について検討する。

研究成果の概要（英文）：

We have clarified that four chitinases (ChiA, ChiB, ChiC, and ChiD), three  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidases (GlcNAcases A, B, and C), a transglycosylative enzyme (Hex99), a chitin-binding protein (Cbp1), and two proteases (AprIV and MprIII) are involved in chitin degradation of the marine bacterium, *Pseudoalteromonas piscicida* strain O-7. Recently, the genome analysis of strain O-7 was performed by Illumina Genome Analyzer. The homology search indicated that there are additional chitinase-, chitin-binding protein-, and *N*-acetylglucosaminidase-encoding genes in the genome. Real-time quantitative PCR analyses demonstrated that the expression of these genes was induced by the presence of GlcNAc. The proteins were produced in *E. coli* BL21 (DE3) and purified with Ni Sepharose Fast Flow (GE Healthcare).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：バイオマス、環境微生物、海洋細菌、キチン

### 1. 研究開始当初の背景

キチンは、地球上でセルロースに次いで多く存在する再利用可能なバイオマスである。我々は、キチンの有効利用を目的に、種々の生理活性を示すキチンオリゴ糖、ならびに *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の効率的な酵素生産を目指し、海洋細菌 *Alteromonas* sp. O-7 株ならびに好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 株を用いてキチン分解機構に関する研究を行っている。海洋細菌 *Alteromonas* sp. O-7 株(現在 *Pseudoalteromonas piscicida* O-7 株と同定)は、キチン存在下において細胞外に4種類のキチナーゼ、および細胞外膜、ペリプラズム、サイトプラズムにそれぞれ分布する3種類のβ-*N*-アセチルグルコサミニダーゼを産生する。さらに、キチン分解には直接関与しないが、天然キチンの構成タンパク質を分解し、キチナーゼ活性を促進させるキチン結合ドメインを有する新規なセリンプロテアーゼおよびメタロプロテアーゼが、本菌のキチン分解系に関与することを認めた。一方、好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 株は、キチン存在下において4種類のキチナーゼおよび2種類のβ-*N*-アセチルグルコサミニダーゼを細胞外に分泌する。これらの酵素は、いずれも高い最適温度、熱安定性を示し、また比活性が高いことから、GlcNAc などの効率的な酵素生産に適している。

### 2. 研究の目的

海洋細菌 *Alteromonas* sp. O-7 株ならびに好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 株をモデル細菌として用い、①細菌

がどのような分子を介してキチンに吸着しているのか？、②キチン分解産物 (GlcNAc およびキチンオリゴ糖) の輸送系の解析、③キチン分解産物の代謝経路に関与する酵素の特定および役割、④キチン分解系、輸送系および代謝系に関与する遺伝子発現調節機構、および⑤食品素材としての GlcNAc およびキチンオリゴ糖の酵素生産技術の開発等を目的に研究を行った。

### 3. 研究の方法

*Alteromonas* sp. O-7 株のキチン分解機構に関与するタンパク質を網羅的に解析する目的で Illumina 社の Genome Analyzer を用いて、Sequence-by-Synthesis 法によりゲノム解析を行った。ゲノム解析により明らかにされた、本菌株のキチン分解機構に関与すると思われる新規タンパク質の遺伝子発現量が GlcNAc 存在下および非存在下で変動するかどうかについて検討した。すなわち、1.0% GlcNAc 存在下、非存在下において培養初期、中期、後期の菌体からトータル RNA を調製し、M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus (Promega) で逆転写反応後、Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara) により、SYBR Premix Ex Taq (Takara) を用いて定量的リアルタイム PCR を行った。

次に、キチン分解系に関する新規タンパク質の高発現系を構築するために、目的タンパク質が glutathione S-transferase との融合タンパク質として高発現される pGEX-6P-1 (GE Healthcare) および His タグ融合タンパク質として高発現される pProEX HTa (Invitrogen) にそれら遺伝子を導入し、大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換した。得られた形質転換株を、

150 ml のアンピシリン含有 LB 液体培地を用いて、600 nm での吸光度が 0.7 になるまで 37°C、200 rpm で攪拌培養した。これらの培養液に最終濃度が 0.1 mM となるように 0.1 M IPTG を加えた後、さらに 1.5 時間攪拌培養した。培養液を 4°C、7,000 rpm で 5 分間遠心分離することにより集菌し、10 ml の 1 mM PMSF 含有生理食塩水で再懸濁して超音波破碎した。

#### 4. 研究成果

O-7 株のゲノム解析を行った結果、新たに 2 種類のキチナーゼ(ChiE, ChiF)、N-アセチルグルコサミニダーゼ(GlcNAcase D)およびキチン結合タンパク質(Cbp2)遺伝子が存在することを認めた。ChiE は、ChiA と相同性の高いファミリー18 に属する触媒ドメイン、およびその C 末端側に 2 つの PKD 領域とキチン結合領域(ChtBD)を有する分子量 95.6 kDa の前駆体タンパク質としてコードされていた。また、ChiF は、ファミリー19 に属する触媒ドメイン、およびその C 末端側に機能未知領域と ChtBD 領域を有する分子量 53.1 kDa の前駆体タンパク質としてコードされていた。また、chiE 遺伝子の 19 塩基上流域に、2 つの ChtBD を有するキチン結合タンパク質(Cbp2)をコードする ORF が認められた。一方、GlcNAcase D は、シグナルペプチドを有し、ファミリー20 に属する触媒領域からなる分子量 88,700 Da の前駆体タンパク質としてコードされていた。次に、これら遺伝子の転写量について検討したところ、GlcNAc 存在下で ChiE および Cbp2 遺伝子発現量は、培養中期において 2 倍に、GlcNAcase D 遺伝子発現量は、すべての培養時期において 30 倍に増大した。

ChiE、ChiF、Cbp2 および GlcNAcase D のキチン分解系における役割を明らかにする目的で、キチン分解系に関与する新規タンパク質の高発現系を構築した結果、すべてが封入体として発現した。そこで、8 M 塩酸グアニジン存在下において Ni Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)カラムクロマトグラフィーにより His タグ融合タンパク質を精製し、得られた精製標品を 10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)に対して透析を行った。今後、それらタンパク質の諸性質について検討する予定である。

#### 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 8 件)

1) Tatsuya Funahashi, Tomotaka Tanabe, Katsushiro Miyamoto, Hiroshi Tsujibo, Jun Maki,

and Shigeo Yamamoto. Characterization of a gene encoding the outer membrane receptor for ferric enterobactin in *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup>. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 353-560 (2013).

2) Tatsuya Funahashi, Tomotaka Tanabe, Jun Maki, Katsushiro Miyamoto, Hiroshi Tsujibo, and Shigeo Yamamoto. Identification and characterization of a cluster of genes involved in biosynthesis and transport of acinetoferrin, a siderophore produced by *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 17906<sup>T</sup>. *Microbiology*. **159**, 678-690 (2013).

3) Tomotaka Tanabe, Tatsuya Funahashi, Keiichi Shiuchi, Noriyuki Okajima, Hiroshi Nakao, Katsushiro Miyamoto, Hiroshi Tsujibo, and Shigeo Yamamoto. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* genes encoding the systems for utilization of enterobactin as a xenosiderophore. *Microbiology*. **158**, 2039-2049 (2012).

4) Tatsuya Funahashi, Tomotaka Tanabe, Mihara Kazutoshi, Katsushiro Miyamoto, Hiroshi Tsujibo, and Shigeo Yamamoto. Identification and characterization of an outer membrane receptor gene in *Acinetobacter baumannii* required for utilization of desferricoprogen, rhodotorulic acid, and desferrioxamine B as xenosiderophores. *Biol Pharm Bull*. **35**, 753-760.

5) Takahiro Tsuchiya, Norifumi Nakao, Shigeo Yamamoto, Yoshikazu Hirai, Katsushiro Miyamoto, and Hiroshi Tsujibo. NK1.1(+) cells regulate neutrophil migration in mice with *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *Microbiol Immunol*. **56**, 107-116 (2012).

6) Tomotaka Tanabe, Tatsuya Funahashi, Noriyuki Okajima, Hiroshi Nakao, Yasuo Takeuchi, Katsushiro Miyamoto, Hiroshi Tsujibo, and Shigeo Yamamoto. The *Vibrio parahaemolyticus* pvuA1 gene (formerly termed psuA) encodes a second ferric vibrioferrin receptor that requires tonB2. *FEMS Microbiol Lett*. **324**, 73-79 (2012).

7) Tomotaka Tanabe, Tatsuya Funahashi, Katsushiro Miyamoto, Hiroshi Tsujibo, and Shigeo Yamamoto. Identification of genes, *desR* and *desA*, required for utilization of desferrioxamine B as a xenosiderophore in *Vibrio furnissii*. *Biol Pharm Bull*. **34**, 570-574 (2011).

8) Hideaki Morioka, Yasuhiro Miki, Kei Saito, Koji Tomoo, Toshimasa Ishida, Tomokazu

Hasegawa, Akihito Yamano, Chiaki Takada, Katsushiro Miyamoto, and Hiroshi Tsujibo. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of BxlA, an intracellular beta-D-xylosidase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. **66**, 791-793 (2010).

〔学会発表〕(計 15 件)

1) Takahiro Tsuchiya, Katsushiro Miyamoto, Shigeo Yamamoto, and Hiroshi Tsujibo. Role of infiltrating cells in the lung of *Acinetobacter pneumoniae* model mice. 第 85 回日本細菌学会総会 2012 年 3 月 (長崎) .

2) Hiroshi Tsujibo. Chitinolytic system of a marine bacterium, *Pseudoalteromonas piscicida* strain O-7. Chinese Academy of Agricultural Sciences. (Beijing) . (招待講演)

3) 宮本勝城、尾上涼馬、中村有貴、小澤舞祈子、土屋孝弘、辻坊 裕 *Pseudoalteromonas piscicida* O-7 株のキチン分解機構に関する新規タンパク質の解析 日本キチン・キトサン学会第 26 回シンポジウム 2012 年 7 月 (札幌) .

4) 宮本勝城、河野広朗、廣本武史、土屋孝弘、田邊知孝、山本重雄、辻坊 裕 *Vibrio vulnificus* M2799 株の鉄獲得機構の解明 第 24 回微生物シンポジウム 2012 年 7 月 (大阪) .

5) 宮本勝城、土屋孝弘、辻坊 裕 *Pseudoalteromonas piscicida* O-7 株のキチン分解機構に関する新規タンパク質の解析 日本キチン・キトサン学会第 26 回シンポジウム 2011 年 8 月 (奈良) .

6) 土屋孝弘、宮本勝城、辻坊 裕 *Vibrio vulnificus* の病原因子の解析 第 24 回微生物シンポジウム 2011 年 9 月 (千葉) .

7) 宮本勝城、土屋孝弘、辻坊 裕 Siderophore (acinetobactin) is involved in biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* ATCC19606. 日本細菌学会総会 2011 年 9 月 (札幌) .

8) 土屋孝弘、宮本勝城、辻坊 裕 Analysis of infiltrating cells in the lung of *Acinetobacter pneumoniae* model mice. 日本細菌学会総会 2011 年 9 月 (札幌) .

9) 宮本勝城、辻坊 裕 Utilization of xenosiderophores by *Vibrio parahaemolyticus*:

identification and characterization of genes, *irgA*, *vctA* and *vpa0150*, encoding ferric enterobactin receptors. 日本細菌学会総会 2011 年 9 月 (札幌) .

10) 宮本勝城、辻坊 裕 The *Vibrio parahaemolyticus* *psuA* gene encodes a second ferric vibrioferrin receptor exclusively dependent on the TonB2 system. 日本細菌学会総会 2011 年 9 月 (札幌) .

11) 宮本勝城、土屋孝弘、辻坊 裕 臨床分離株 *Vibrio vulnificus* M2799 株における鉄獲得機構の解明 日本細菌学会総会 2010 年 3 月 (横浜) .

12) 土屋孝弘、宮本勝城、辻坊 裕 *Acinetobacter baumannii* における肺炎モデルマウスの浸潤細胞の解析 日本細菌学会総会 2010 年 3 月 (横浜) .

13) 宮本勝城、土屋孝弘、辻坊 裕 *Pseudoalteromonas piscicida* O-7 株のキチン分解機構に関する新規タンパク質の探索 日本キチン・キトサン学会第 26 回シンポジウム 2010 年 7 月 (東京) .

14) 土屋孝弘、中尾紀文、中津正太、米村未奈子、宮本勝城、辻坊 裕 *Acinetobacter baumannii* による肺炎モデルマウスの浸潤細胞の解析 第 24 回微生物シンポジウム 2010 年 9 月 (大阪) .

15) 宮本勝城、川沼高夫、土屋孝弘、辻坊 裕 海洋細菌 *Pseudoalteromonas piscicida* O-7 株のキチン分解機構に関する新規タンパク質の探索 日本農芸化学会関西支部総会 2010 年 10 月 (奈良) .

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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 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  
<http://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushitu/bisei.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

辻坊 裕 (TSUJIBO HIROSHI)

研究者番号：90175464

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：