

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580309

研究課題名(和文) 海洋細菌のキチン分解機構に関する網羅的解析

研究課題名(英文) The global analysis of the chitinolytic system of the marine bacterium

研究代表者

宮本 勝城 (Miyamoto, Katsushiro)

大阪薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40231625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：私は、海洋細菌0-7株のキチン分解機構に関する分子生物学的研究を行っている。最近、次世代シーケンサーを用いて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。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遺伝子発現量は2倍に、GlcNAcase D遺伝子発現量は30倍に増大した。さらに、それらタンパク質の高発現系を構築し、生化学的諸性質について検討した。また、キチン分解機構に関する遺伝子の調節タンパク質NagRを特定する目的で、ホモログの高発現系を構築した。

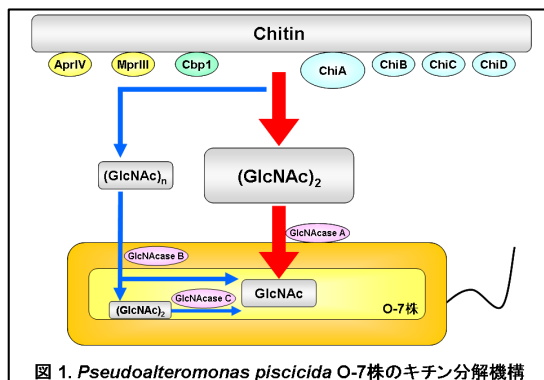
研究成果の概要(英文)：We have clarified that four chitinases (ChiA, ChiB, ChiC, and ChiD), three -N-acetylglucosaminidases (GlcNAcases A, B, and C), a transglycosylative enzyme (Hex99), a chitin-binding protein (Cbp1), and two proteases (AprIV and MprIII) are involved in chitin degradation of the marine bacterium, *Pseudoalteromonas piscicida* strain 0-7. Recently, the genome analysis of this strain was performed by Illumina Genome Analyzer. The homology search indicated that there are additional chitinases-, 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 N-acetylglucosamine. The proteins were produced in *E. coli* BL21 (DE3) and purified with Ni Sepharose Fast Flow (GE Healthcare). The function of each protein has been examined. Furthermore, NagR homologs of *P. piscicida* strain 0-7 were also produced.

研究分野：バイオマス有効利用

キーワード：キチナーゼ N-アセチルグルコサミニダーゼ キチン結合タンパク質 NagR

1. 研究開始当初の背景

キチンは、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)が β -1,4 結合した多糖類で、カニ・エビ・昆虫の甲殻、イカ・貝などの軟体動物の器官、および真菌の細胞壁など、多くの生物に含まれており、再利用可能なバイオマスである。私は、キチンから、種々の生理活性を示すキチンオリゴ糖、ならびに変形関節症の予防および改善に効果を有する GlcNAc の効率的な酵素生産を目指し、海洋細菌 *Pseudoalteromonas piscicida* O-7 株のキチン分解機構の全体像を分子レベルで解明することを目的に研究を行っている。本菌はキチン存在下において、複数のキチナーゼ (ChiA、ChiB、ChiC、ChiD)、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (GlcNAcase A、B、C、Hex99) およびプロテアーゼ (AprIV、MprIII) を産生する (図1)。それらタンパク質の遺伝子をクローニングし、酵素学的諸性質について明らかにした。また、それら酵素の相乗作用により、キチンをその構成単位である GlcNAc に分解することをすでに明らかにしている。



2. 研究の目的

最近、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。また、これら遺伝子発現量が GlcNAc 存在下および非存在下で変動するか否かについて検討した結果、GlcNAc 存在下で増大することを認めた。そこで、それらタンパク質の高発現系を構築し、諸性質について検討した。また、Yang ら [J. Biol. Chem. 281:29872-29885 (2006)] は、比較ゲノム解析により、本菌が分類される γ プロテオバクテリアに属する細菌において、キチン分解機構に関する遺伝子の調節タンパク質は LacI ファミリーに属する NagR であると推測している。そこで、本菌株の NagR を特定する目的で、ホモログの高発現系を構築した。

3. 研究の方法

キチン分解系に關与する新規タンパク質の高発現系を構築するために、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 IPTG を最終濃度 1.0 mM となるように加え、20°C、200 rpm で一晩攪拌培養した。得られた菌体を 10 ml の 1 mM PMSF 含有 PBS で懸濁後、超音波破碎して上清を回収し、Ni Sepharose 6FF 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た。得られたタンパク質を 4°C、24 時間 AcTEV プロテアーゼで処理することにより His タグを切断した。次に、得られたタンパク質のキチナーゼ活性、*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性およびキチン結合能について解析した。さらに、NagR ホモログについても、同様に高発現系を構築してタンパク質を精製した。

4. 研究成果

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 ChtBD 領域を有する分子量 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。さらに、GlcNAcase D はシグナルペプチド様配列を有し、GlcNAcase A、B、Hex99 と同様にファミリー 20 に属する触媒ドメインからなる分子量 88.7 kDa の前駆体タンパク質としてコードされていた。これらタンパク質のキチン分解系における役割を明らかにする目的で、高発現系を構築し、酵素学的諸性質について解析した。その結果、ChiE および ChiF の至適 pH はそれぞれ 9.0 および 8.0 であり、至適温度はいずれも 40 であった。一方、GlcNAcase D の至適 pH は 6.0、至適温度は 50 であった。また、O-7 株のドラフトゲノム情報から、7 種類の NagR ホモログ (NagR01 ~ 07) を見出し、高発現系を構築した。様々な条件検討の結果、これら NagR ホモログについて可溶性での発現に成功し、これらタンパク質を用いて、NagR box 様配列 (5'-ATTGACAGCGATGTCAAC-3') を有する *aprIV* 遺伝子上流域に対するゲルシフトアッセイを行った結果、NagR06 のみ結合能が確認された。今後、GlcNAc、GlcNAc 6-リン酸、グルコサミン (GlcN)、GlcN 6-リン酸存在下、非存在下においてもゲルシフトアッセイを行うことにより、キチン分解機構に關与する NagR タンパク質を特定する予定である。

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 9 件)

1. The RND protein is involved in the vulnibactin export system in *Vibrio vulnificus* M2799.
宮本勝城, 他 11 名, 2 番, Microb. Pathog. **75**:59-67 (2014). 査読有
DOI: 10.1016/j.micpath.2014.09.001
2. Regulation of the expression of the *Vibrio parahaemolyticus* *peuA* gene encoding an alternative ferric enterobactin receptor.
宮本勝城, 他 7 名, 4 番, PLoS One 2014 **9**:e105749 (2014). 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0105749
3. Identification and characterization of *Aeromonas hydrophila* genes encoding the outer membrane receptor of ferrioxamine B and an AraC-type transcriptional regulator.
宮本勝城, 他 5 名, 4 番, Biosci. Biotechnol. Biochem. **78**:1777-1787 (2014). 査読有
DOI:10.1080/09168451.2014.932669
4. Role of periplasmic binding proteins, FatB and VatD, in the vulnibactin utilization system of *Vibrio vulnificus* M2799.
宮本勝城, 他 8 名, 2 番, Microb. Pathog. **65**:73-81 (2013). 査読有
DOI:10.1016/j.micpath.2013.10.002
5. Characterization of a gene encoding the outer membrane receptor for ferric enterobactin in *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966(T).
宮本勝城, 他 5 名, 3 番, Biosci. Biotechnol. Biochem. **77**:353-360 (2013). 査読有
DOI:10.1271/bbb.120774
6. Identification and characterization of a cluster of genes involved in biosynthesis and transport of acinetoferrin, a siderophore produced by *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 17906T.
宮本勝城, 他 5 名, 3 番, Microbiol. **159**:678-690 (2013). 査読有
DOI 10.1099/mic.0.065177-0
7. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* genes encoding the systems for utilization of enterobactin as a xenosiderophore.
宮本勝城, 他 7 名, 2 番, Microbiol.

158:2039-2049 (2012). 査読有

DOI 10.1099/mic.0.059568-0

8. Identification and characterization of an outer membrane receptor gene in *Acinetobacter baumannii* required for utilization of desferricoprogen, rhodotorulic acid, and desferrioxamine B as xenosiderophores.
宮本勝城, 他 5 名, 4 番, Biol. Pharm. Bull. **35**:7537-60 (2012). 査読有
DOI:10.1128/AAC.01519-12
9. NK1.1(+) cells regulate neutrophil migration in mice with *Acinetobacter baumannii* pneumonia.
宮本勝城, 他 5 名, 5 番, Microbiol. Immunol. **56**:107-116 (2012). 査読有
DOI: 10.1111/j.1348-0421.2011.00402.x

[学会発表](計 15 件)

1. *Vibrio vulnificus* M2799 株のバルニバクチンを介する鉄獲得機構におけるペリプラズム結合タンパク質 FatB と VatD の役割
宮本勝城, 他 5 名, 2 番, 第 87 回日本細菌学会総会 東京 2015 年 3 月 27 日
2. 臨床分離株 *Vibrio vulnificus* M2799 株の鉄獲得機構の解明
宮本勝城, 他 5 名, 4 番, 日本結晶学会平成 26 年度年会 東京 2014 年 11 月 2 日
3. *Vibrio vulnificus* M2799 株における Vulnibactin 分泌機構
宮本勝城, 他 5 名, 2 番, 第 26 回微生物シンポジウム 東京 2014 年 9 月 19 日
4. *Vibrio vulnificus* M2799 株のペリプラズム結合タンパク質 VatD の構造解析
宮本勝城, 他 7 名, 4 番, 第 26 回微生物シンポジウム 東京 2014 年 9 月 19 日
5. *Vibrio vulnificus* M2799 株の鉄獲得機構の解明
宮本勝城, 他 6 名, 1 番, 第 38 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 仙台 2014 年 9 月 7 日
6. *Pseudoalteromonas piscicida* O-7 株のキチン分解機構に關与する新規タンパク質の解析
宮本勝城, 他 6 名, 1 番, 日本キチン・キトサン学会第 28 回シンポジウム 東京 2014 年 8 月 8 日
7. *Vibrio vulnificus* M2799 株における鉄獲得関連遺伝子欠失株の作製
宮本勝城, 他 5 名, 2 番, 第 86 回日本細菌学会総会 千葉 2014 年 3 月 27 日
8. *Vibrio vulnificus* の病原因子の解析
宮本勝城, 他 4 名, 4 番, 第 86 回日本細菌学会総会 千葉 2014 年 3 月 27 日
9. 2D-DIGE 解析を用いた *Vibrio vulnificus*

- M2799 株の鉄取り込み機構に関するタンパク質群の網羅的解析
宮本勝城, 第 63 回日本電気泳動学会シンポジウム 東京 2013 年 6 月 21 日
10. *Vibrio vulnificus* M2799 株の鉄獲得機構の解明
宮本勝城, 他 7 名, 2 番, 第 25 回微生物シンポジウム 静岡 2013 年 9 月 6 日
11. *Vibrio vulnificus* M2799 株の鉄獲得機構の解明
宮本勝城, 他 7 名, 1 番, 第 37 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 東京 2013 年 9 月 8 日
12. Analysis of the novel proteins involved in the chitinolytic system of *Pseudoalteromonas piscicida* strain O-7
宮本勝城, 他 6 名, 1 番, 日本キチン・キトサン学会第 27 回シンポジウム 米子 2013 年 10 月 7 日
13. Role of infiltrating cells in the lung of *Acinetobacter pneumonia* model mice
宮本勝城, 他 3 名, 2 番, 第 85 回日本細菌学会総会 長崎 2013 年 3 月 19 日
14. *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
宮本勝城, 他 5 名, 1 番, 日本キチン・キトサン学会第 26 回シンポジウム 札幌 2012 年 7 月 17 日
15. *Vibrio vulnificus* M2799 株の鉄獲得機構の解明
宮本勝城, 他 6 名, 1 番, 第 24 回微生物シンポジウム 大阪 2012 年 9 月 4 日

〔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：
 出願年月日：
 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

宮本 勝城 (MIYAMOTO KATSUSHIRO)
 大阪薬科大学・薬学部・准教授
 研究者番号：40231625

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：