

平成 22 年 6 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19580386

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)：

海洋細菌 *Alteromonas* sp. O-7 株は、キチン存在下において、複数のキチナーゼ (ChiA、ChiB、ChiC、ChiD)、 $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (GlcNAcase A、B、C、Hex99)、キチン結合タンパク質 (Cbp1)、およびプロテアーゼ (AprIV、MprIII) を産生し、それらの酵素の相乗作用によりキチンをその構成単位である *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に分解することをすでに明らかにしている。しかしながら、①本菌のキチン吸着機構、②キチン分解産物 (GlcNAc およびキチンオリゴ糖) の輸送機構、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の発現調節機構などについては、未解明のままである。今回、キチン分解産物の代謝経路に関与する酵素として *GlmS* に着目し、その役割ならびに発現調節機構について明らかにした。また、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、ゲノム解析を行った結果、新たに 1 種類のキチナーゼ、キチン結合タンパク質および *N*-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子が存在することを認めた。

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, *Alteromonas* sp. strain O-7. Recently, the *glmS* gene coding for one of the key enzymes of GlcNAc utilization was cloned, and the function and regulation of the enzyme was clarified. Furthermore, 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.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 1,900,000 | 570,000   | 2,470,000 |
| 2008 年度 | 800,000   | 240,000   | 1,040,000 |
| 2009 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・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、いずれも高い至適温度、熱安定性を示し、また比活性が高いことから、N-アセチルグルコサミン (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

(1) 一般に、細胞内に取込まれた GlcNAc は、グルコサミン-6-リン酸 (GlcN6P) に変換された後、解糖系および細胞壁生合成に利用される。GlcN6P 生合成酵素 (GlmS) はこの両経路の分岐点に位置しており、フルクトース-6-リン酸から GlcN6P を合成する重要な役割を果たす

酵素として注目されている。そこで、*Alteromonas* sp. O-7 株の *glmS* 遺伝子のクローニングを試みた。

(2) *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。

### 4. 研究成果

(1) *Alteromonas* sp. O-7 株の *glmS* 遺伝子をクローニングし、その上流域に DeoR ファミリーに属する調節タンパク質である *glmR* 遺伝子が、さらに膜タンパク質と推測される6回繰り返しPKD領域から成るユニークなタンパク質をコードする *pkdA* 遺伝子が *glmR* 遺伝子の上流域に存在することを認めた。GlmS、GlmR および PkdA タンパク質が本菌のキチン分解系に関与するか否かを明らかにする目的で、それら遺伝子の発現量について検討した。その結果、*glmS* 遺伝子および *glmR* 遺伝子の発現量は、GlcNAc 存在下で抑制されたが、*pkdA* 遺伝子の発現量には変化が認められなかった。*glmR* 遺伝子は *glmS* 遺伝子の10塩基上流に存在し、GlcNAc 存在下でともに抑制されたことから、両遺伝子がオペロンを形成しているかどうかについて検討した。その結果、これらの遺伝子はオペロンを形成していることを明らかにした。DeoR ファミリーに属するタンパク質は、リン酸化糖と結合して転写を抑制するリプレッサーである。そこで、GlmR タンパク質の発現系を構築し、GlmR タンパク質の DNA 結合能を調べた。その結果、GlmR タンパク質は、*glmRS* オペロンの上流域に結合し、GlcN6P 存在下で結合能が増大することを明らかにした。さらに、GlmR タンパク質のシス配列をフットプリン

ト法により解析を行い、開始コドンの上流域に存在する 5'-CCTTAAATTCGAAACGAAACTT-3' に GlmR タンパク質が結合することを認めた。次に、PkdA タンパク質のキチン分解系における役割を調べる目的で、発現系を構築した。精製した PkdA タンパク質のα-キチン、β-キチン、キトサンおよびアビセルに対する結合能について検討した結果、PkdA タンパク質はこれらの高分子多糖に結合することが明らかとなった。現在、PkdA タンパク質の局在部

位について検討しているところである。

(2) O-7株のゲノム解析を行った結果、新たに1種類のキチナーゼ(ChiE)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95,559 Da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。今後、ChiE、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、キチン分解機構に関与する遺伝子の発現量について比較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9件)

- 1) Katsushiro Miyamoto, Kazutaka Kosakai, Satomi Ikebayashi, Takahiro Tsuchiya, Shigeo Yamamoto, and Hiroshi Tsujibo. Proteomic analysis of *Vibrio vulnificus* M2799 grown under iron-repleted and iron-depleted conditions. *Microb. Pathog.*, **46**, 171-177 (2009).
- 2) Takahiro Tsuchiya, Katsuhisa Yamada, Katsuhiko Minoura, Katsushiro Miyamoto, Yoshihide Usami, Takeshi Kobayashi, Naoko Hamada-Sato, Chiaki Imada, and Hiroshi Tsujibo. Purification and determination of the chemical structure of the tyrosinase inhibitor produced by *Trichoderma viride* strain H1-7 from a marine environment. *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1618-1620 (2008).
- 3) Shigeo Suzuki, Eiyu Nakanishi, Keiko Furihata, Katsushiro Miyamoto, Hiroshi Tsujibo, Takeshi Watanabe, Yasuo Ohnishi, Sueharu Horinouchi, Hiromichi Nagasawa, and Shohei Sakuda. Chitinase inhibitor allosamidin promotes chitinase production of *Streptomyces* generally. *Int. J. Biol. Macromol.*, **43**, 13-19 (2008).
- 4) Kiho Seike, Junji Sato, Koji Tomoo, Toshimasa Ishida, Akihito Yamano, Sadao Ikenishi, Katsushiro Miyamoto, and Hiroshi

Tsujibo. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of BxIE, a xylobiose transporter from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **63**, 560-562 (2007).

- 5) Akihiro Saito, Tomonori Shinya, Katsushiro Miyamoto, Tomofumi Yokoyama, Hanae Kaku, Eiichi Minami, Naoto Shibuya, Hiroshi Tsujibo, Yoshiho Nagata, Akikazu Ando, Takeshi Fujii, and Kiyotaka Miyashita. The *dasABC* gene cluster, adjacent to *dasR*, encodes a novel ABC transporter for the uptake of *N*, *N*-diacetylchitobiose in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 3000-3008 (2007).
  - 6) Katsushiro Miyamoto, Mina Okunishi, Eiji Nukui, Takahiro Tsuchiya, Takeshi Kobayashi, Chiaki Imada, and Hiroshi Tsujibo. The regulator CdsS/CdsR two-component system modulates expression of genes involved in chitin degradation of *Pseudoalteromonas piscicida* strain O-7. *Arch. Microbiol.*, **188**, 619-628 (2007).
  - 7) Shunji Aoki, Yasuo Watanabe, Daiki Tanabe, Masayoshi Arai, Hideaki Suna, Katsushiro Miyamoto, Hiroshi Tsujibo, Kazutake Tsujikawa, Hiroshi Yamamoto, and Motomasa Kobayashi. Structure-activity relationship and biological property of cortistatins, anti-angiogenic spongian steroidal alkaloids. *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 6758-6762 (2007).
  - 8) Takahiro Tsuchiya, Eriko Mitsuo, Nahoko Hayashi, Yuuko Hikita, Hiroshi Nakao, Shigeo Yamamoto, Katsushiro Miyamoto, and Hiroshi Tsujibo. *Vibrio vulnificus* damages macrophages during the early phase of infection. *Infect. Immun.*, **75**, 4592-4596 (2007).
  - 9) 土屋孝弘、宮本勝城、辻坊 裕 海洋環境より分離された糸状菌培養液の美白素材への応用研究 日本化粧品技術者会誌, **41**, 254-261 (2007).
- [学会発表] (計36件)
- 1) 宮本勝城、土屋孝弘、辻坊 裕 *Pseudoalteromonas piscicida* O-7株のキチン分解機構 日本キチン・キトサン・シンポジウム 2009年8月(佐賀)。
  - 2) 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 微生物シンポジウム 2009年9月(福山)。
  - 3) 西田光希、波多野千織、矢部倫子、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 2009年3月(名古屋)。
  - 4) 中尾紀文、土屋孝弘、宮本勝城、辻坊 裕 *Acinetobacter baumannii*の呼吸器感染時にお

ける浸潤細胞の役割 日本細菌学会総会  
2009年3月(名古屋)。

5)小林大哲、宮本勝城、土屋孝弘、辻坊 裕  
*Vibrio vulnificus* の鉄欠乏ストレスに關与する  
遺伝子欠損株の作製 日本細菌学会関西  
支部総会 2009年11月(大阪)。

6)土屋孝弘、中尾紀文、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 日本細菌学会関西  
支部総会 2009年11月(大阪)。

7)三橋慶子、宮本勝城、土屋孝弘、辻坊 裕 日  
和見感染菌 *Acinetobacter baumannii*  
ATCC19606 株の遺伝子ノックアウトライブ  
ラリーの作製 日本細菌学会関西支部総会  
2009年11月(大阪)。

8)浅田恵美、今岡寛美、山英男、土屋孝弘、  
宮本勝城、辻坊 裕 *Trichoderma viride* H1-7  
株の産生するチロシナーゼ阻害物質の単離  
精製 日本薬学会第129年会 2009年3月(京  
都)。

9)市橋裕康、宮本勝城、土屋孝弘、辻坊 裕  
*Pseudoalteromonas piscicida* O-7 株由来 *nagC*  
ホモログの解析 日本キチン・キトサン・シ  
ンポジウム 2008年8月(新潟)。

10)中村俊之、杉江真理子、宮本勝城、土屋孝  
弘、辻坊 裕 *Pseudoalteromonas piscicida* O-7  
株由来 *glmS* 遺伝子の解析 日本キチン・キ  
トサン・シンポジウム 2008年8月(新潟)。

11)杉江真理子、宮本勝城、土屋孝弘、辻坊 裕  
海洋細菌 *Pseudoalteromonas piscicida* O-7 株由  
来 *glmS* 遺伝子の解析 日本農芸化学会大会  
2008年3月(名古屋)。

12)土屋孝弘、光尾恵理子、中尾紀文、宮本勝  
城、辻坊 裕 *Vibrio vulnificus* の感染メカニ  
ズムの解析 第6回感染症沖繩フォーラム  
2008年2月(沖繩)。

13)西田光希、小坂井一考、水口由章、宮本勝  
城、土屋孝弘、辻坊 裕 臨床分離株 *Vibrio*  
*vulnificus* の鉄欠乏条件下におけるプロテ  
オーム解析 4 日本細菌学会総会 2008年3月  
(京都)。

14)中尾紀文、土屋孝弘、宮本勝城、辻坊 裕  
*Vibrio vulnificus* の感染メカニズムの解析 日  
本細菌学会総会 2008年3月(京都)。

15)西田光希、波多野千織、矢部倫子、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 日本細菌学会関西支部総会 2008年11月  
(京都)。

16)中尾紀文、大西加奈、土屋孝弘、宮本勝  
城、辻坊 裕 *Acinetobacter baumannii* 感染時  
の宿主免疫応答の解析 日本細菌学会関西  
支部総会 2008年11月(京都)。

17)土屋孝弘、朝日 洋、中尾紀文、宮本勝城、  
辻坊 裕 *Vibrio vulnificus* の感染メカニ  
ズムの解析 微生物シンポジウム 2008年9月(岐  
阜)。

18)西田光希、宮本勝城、土屋孝弘、辻坊 裕  
*Vibrio vulnificus* の鉄欠乏条件下におけるプロ  
テオーム解析 微生物シンポジウム 2008年9  
月(岐阜)。

19)土屋孝弘、朝日 洋、中尾紀文、宮本勝城、  
辻坊 裕 *Vibrio vulnificus* の感染メカニ  
ズムの解析 第2回細菌学・若手コロッセウム  
2008年8月(湘南)。

20)江頭 成、宮本勝城、土屋孝弘、辻坊 裕 海  
洋細菌 *Pseudoalteromonas* sp. O-7 株由来 *pilA*  
遺伝子の解析 日本キチン・キトサン・シ  
ンポジウム 2007年7月(神戸)。

21)杉江真理子、宮本勝城、土屋孝弘、辻坊 裕  
海洋細菌 *Pseudoalteromonas* sp. O-7 株由来  
*glmS* 遺伝子の解析 日本キチン・キトサン・  
シンポジウム 2007年7月(神戸)。

22)土屋孝弘、光尾恵理子、疋田裕子、宮本勝  
城、辻坊 裕 *Vibrio vulnificus* の病原性発現メ  
カニズムの解析 第5回感染症沖繩フォーラ  
ム 2007年2月(沖繩)。

23)小坂井一考、宮本勝城、土屋孝弘、辻坊 裕  
*Vibrio vulnificus* の鉄過剰、鉄欠乏条件下にお  
けるプロテオーム解析 3 日本細菌学会総会  
2007年3月(大阪)。

24)水口由章、宮本勝城、土屋孝弘、辻坊 裕  
*Vibrio vulnificus* の鉄欠乏ストレスに關与する  
タンパク質の遺伝子欠損株の作製 日本細  
菌学会総会 2007年3月(大阪)。

25)光尾恵理子、土屋孝弘、宮本勝城、辻坊 裕  
*Vibrio vulnificus* の病原性発現メカニ  
ズムの解析 日本細菌学会総会 2007年3月(大阪)。

26)田中裕介、三橋慶子、宮本勝城、土屋孝弘、  
辻坊 裕 *Acinetobacter baumannii* ATCC19606  
株由来 *glmS* 遺伝子の解析 日本細菌学会関  
西支部総会 2007年11月(大阪)。

27)小坂井一考、宮崎菜穂、宮本勝城、土屋孝  
弘、辻坊 裕 *Vibrio vulnificus* の鉄欠乏条件  
下におけるプロテオーム解析 日本細菌学会  
関西支部総会 2007年11月(大阪)。

28)光尾恵理子、中尾紀文、土屋孝弘、宮本勝  
城、辻坊 裕 *Vibrio vulnificus* の病原性発現メ  
カニズムの解析 日本細菌学会関西支部総  
会 2007年11月(大阪)。

29)水口由章、宮本勝城、土屋孝弘、辻坊 裕  
*Vibrio vulnificus* の鉄欠乏ストレスに關与する  
タンパク質の遺伝子欠損株の作製 日本細  
菌学会関西支部総会 2007年11月(大阪)。

30)土屋孝弘、光尾恵理子、疋田裕子、宮本勝  
城、辻坊 裕 *Vibrio vulnificus* の病原性発現メ  
カニズムの解析 日本薬学会第127年会  
2007年3月(富山)。

31)小坂井一考、宮崎菜穂、宮本勝城、土屋孝  
弘、辻坊 裕 *Vibrio vulnificus* の鉄欠乏条件  
下におけるプロテオーム解析 日本薬学会近  
畿支部総会 2007年10月(大阪)。

32)光尾恵理子、中尾紀文、廣瀬 翔、和田淳  
史、池田優美、阪田敏聖、土屋孝弘、宮本勝

城、辻坊 裕 *Vibrio vulnificus* の病原性発現メカニズムの解析 日本薬学会近畿支部総会 2007年10月(大阪)。

33)小坂井一考、宮本勝城、土屋孝弘、辻坊 裕 *Vibrio vulnificus* の鉄欠乏条件下におけるプロテオーム解析 微生物シンポジウム 2007年9月(東京)。

34)土屋孝弘、光尾恵理子、疋田裕子、宮本勝城、辻坊 裕 *Vibrio vulnificus* の病原性発現メカニズムの解析 微生物シンポジウム 2007年9月(東京)。

35)小坂井一考、宮崎菜穂、宮本勝城、土屋孝弘、辻坊 裕 *Vibrio vulnificus* の鉄欠乏条件下におけるプロテオーム解析 ファーマ・バイオフィオーラム 2007年12月(大阪)。

36)光尾恵理子、中尾紀文、土屋孝弘、宮本勝城、辻坊 裕 *Vibrio vulnificus* の病原性発現メカニズムの解析 ファーマ・バイオフィオーラム 2007年12月(大阪)。

〔図書〕(計1件)

1)辻坊 裕. 海洋細菌のキチン分解機構とその遺伝子. キチン・キトサン開発技術. シーエムシー出版(平野茂博編)。

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称:5-ヒドロキシ-3-イソシアノ-5-ビニルシクロペント-2-エノン、チロシナーゼ阻害剤及びこれを配合した美白化粧品

発明者:辻坊 裕、土屋孝弘、箕浦克彦

権利者:

種類:特願

番号:2008-135936

出願年月日:21年5月

国内外の別:国内

〔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: