

平成 21年 5月 1日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580084
 研究課題名（和文） 立体構造に基づく植物および微生物ファミリー19キチナーゼの比較機能解析
 研究課題名（英文） Comparative functional analysis based on the 3D-structures of plant and microbial family 19 chitinases.
 研究代表者
 氏 名：渡邊 剛志 (WATANABE TAKESHI)
 所 属：新潟大学・自然科学系・教授
 研究者番号：10201203

研究成果の概要：

イネクラス I キチナーゼ Cht2 からループ II を削除した欠失変異キチナーゼを構築し、野生型 Cht2 とその性質を比較した結果、ループ II が + 3 サブサイトを形成していることが明らかとなった。また、ループ II は顕著な生理活性を持つ 4 糖以上の長鎖キチンオリゴ糖の生成に重要な役割を果たしていることがわかり、植物クラス I キチナーゼがキチンエリシター産生において中心的役割を果たしていることが強く示唆された。また、放線菌ファミリー 19 キチナーゼ ChiC のキチン吸着には、吸着に重要であることがわかっている Trp59 と Trp60 に加えて、その周辺に存在する Thr43, Glu64, Gln62, Asp70 が関与していることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000 円	720,000 円	3,120,000 円
2008年度	1,200,000 円	360,000 円	1,560,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000 円	1,080,000 円	4,680,000 円

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物機能

1. 研究開始当初の背景

キチナーゼは、アミノ酸配列に基づく糖質分解酵素の分類において、ファミリー 18 と 19 に分類されている。当初、ファミリー 19 キチナーゼは高等植物にのみ認められていたため、高等植物特有のキチナーゼと考えられていた。筆者らは、放線菌 *Streptomyces griseus* HUT6037 のキチナーゼ C がファミリー 19 キチナーゼであることを見だし、ファミリー 19 キチナーゼが植物以外に存在することをはじめて明らかにした。そして、その

後の研究によってさらに以下のことを明らかにしてきた。

1) キチナーゼ C は顕著な抗真菌活性を有し、抗真菌活性発現にキチン吸着ドメインが重要である。2) キチナーゼ C 遺伝子の導入により、イネのいもち病抵抗性を向上させることができる。3) *Streptomyces* 属の放線菌がほぼ普遍的にファミリー 19 キチナーゼ遺伝子を持ち、さらに *Actinobacteria* 綱に広く分散して分布する。4) 放線菌のファミリー 19 キチナーゼ

は、高等植物のクラスIVキチナーゼと特に近い系統的關係にある。5)微生物のファミリー19キチナーゼではじめて、キチナーゼCの立体構造解析に成功した。

一方、高等植物のキチナーゼは病原性真菌類に対する生体防御機構の一部を形成すると考えられ、特にファミリー19キチナーゼが重要である。生体防御に働く植物のファミリー19キチナーゼと、微生物のファミリー19キチナーゼを比較しながら様々な解析を行うことを目的として、イネ(日本晴れ)由来のファミリー19キチナーゼCht2の大腸菌による発現系を構築し、キチン吸着ドメインを含む形で最近構造解析を終了した。これによって、本研究の基盤となる高等植物と放線菌のファミリー19キチナーゼの立体構造をベースにした比較解析が可能になった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「微生物と植物のファミリー19キチナーゼを立体構造をもとにして比較解析し、非常に興味深い特徴を持っているファミリー19キチナーゼの機能と役割を解明するとともに、応用への足がかりをつくること」である。そのために、次の2点をより具体的な目標とした。

1) 植物と放線菌のファミリー19キチナーゼ(Cht2とChiC)の活性ドメインにみられる局所構造の違いとその機能を解明する。

2) 植物と放線菌のファミリー19キチナーゼ(Cht2とChiC)のキチン吸着ドメインの違いと、酵素機能への影響を解明する。

3. 研究の方法

1) イネのファミリー19キチナーゼCht2の活性ドメインには、放線菌 *Streptomyces griseus* HUT6037キチナーゼC (ChiC) にない3つのループ構造(ループI, II, III)がある。その中で特にループIIに着目し、イネキチナーゼCht2からループIIを削除した欠失変異キチナーゼをコードする遺伝子を構築し、大腸菌で発現生産した。ループ構造の削除は、タンパク質表面のアミノ酸残基の置換などに比べて大きな構造変化である。そこで、キチナーゼ分子全体への影響を最小限にするために、キチナーゼCの対応する部分との置換の形でループIIを削除した。

得られたループII欠失Cht2と、野生型Cht2およびもともと3つのループ構造を持たないChiCを用いて、キチンオリゴ糖を基質とした場合の反応生成物の分析、抗真菌活性の測定をおこなった。さらに、高分子のキチンや実際の病原性真菌類の細胞壁などから生成するキチンオリゴ糖をHPLCにより分析し、3つの

キチナーゼのデータを比較し、ループIIの機能解明を試みた。

2) Cht2とChiCのキチン吸着ドメインはアミノ酸配列が全く異なる。その違いをもたらすキチナーゼの機能の違いを解明するためには、キチン吸着ドメインを単独で精製する必要がある。ChiCのキチン吸着ドメインの発現はすでに成功しているため、Cht2キチン吸着ドメインの単独の発現系構築を試みた。Cht2は植物起源であるが、分子全体では大腸菌で発現に成功しているため、大腸菌のpColdシステムを用いた発現系を中心に検討した。

ChiCのキチン吸着ドメインは、よく研究されているセルロース結合ドメインなどと異なり、表面に露出している芳香族アミノ酸残基を2つだけ持つユニークなキチン吸着ドメインである。この2つの芳香族アミノ酸残基(Trp59とTrp60)がキチンへの吸着に重要であることは既にわかっている。そこで、Trp59とTrp60の周辺のアミノ酸残基に着目し、部位特異的変異により他のアミノ酸残基に置換し、吸着活性への影響を分析した。

4. 研究成果

イネと放線菌のファミリー19キチナーゼ(Cht2とChiC)の活性ドメインおよびキチン吸着ドメインの構造を詳細に比較し、その違いが酵素機能に与える影響の解析し、次のような成果を得た。

1) Cht2からループIIを削除した欠失変異キチナーゼを構築し、Cht2, ループII欠失Cht2, ChiCを用いて、各種の基質に対する分解活性、生成物、抗真菌活性などを分析したところ、ループIIの欠失は、オリゴ糖の切断位置を還元末端側にシフトさせ、+3サブサイトの親和性を大幅に低下していることがわかった。このことからループIIが+3サブサイトを形成していることが明らかとなった。

次に、Cht2のループIIがキチン分解生成物の鎖長に与える影響を解析した。ループIIの欠失により4糖以上のキチンオリゴ糖が顕著に減少し、ループIIは生理活性が顕著な4糖以上の長鎖キチンオリゴ糖の生成に重要な役割を果たしていることがわかった。また、ループIIと活性クレフトの反対側に存在するループIVも同様な機能を果たしていることが強く示唆された。これらの結果は、植物クラスIキチナーゼがキチンエリター産生において中心的役割を果たしていることを示唆する非常に重要な成果である。

2) Cht2とChiCのキチン吸着ドメインはアミノ酸配列も立体構造も全く異なっており、この違いがそれぞれのキチナーゼの機能に重

要であると予想される。ChiCのキチン吸着ドメイン表面に露出し、吸着に重要であることがわかっているTrp59とTrp60の周辺残基の関与を調べるために、周辺残基を部位特異的変異によってAlaに置換し、吸着への影響を調べた、その結果、Trp59とTrp60に加えてThr43, Glu64, Gln62, Asp70が吸着に関与する事がわかり、これらが協調してキチン吸着に働いていることが明らかとなった。一方、Cht2のキチン吸着ドメインについては残念ながらまだ発現系構築に成功していない。

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)

T. Toratani, T. Shoji, T. Ikehara, K. Suzuki and T. Watanabe, The importance of chitinase and *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) uptake in *N,N'*-diacetylchitinose [(GlcNAc)₂] utilization by *Serratia marcescens* 2170. *Microbiology*, 154, 487-495 (2008). 査読有り

R. Mizuno, T. Fukamizo, S. Sugiyama, Y. Nishizawa, Y. Kezuka, T. Nonaka, K. Suzuki and T. Watanabe, Role of the loop structure of the catalytic domain in rice class I chitinase. *J. Biochem.*, 143, 893-895 (2008). 査読有り

R. Mizuno, Y. Itoh, Y. Nishizawa, K. Suzuki, and T. Watanabe, Purification and characterization of recombinant chitinase from *E. coli* carrying the cDNA of family 19 chitinase from rice (*Oryza sativa* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 893-895 (2008). 査読有り

M. Kawada, C.-C. Chen, A. Arihiro, K. Nagatani, T. Watanabe and E. Mizoguchi, Chitinase 3-like-1 enhances bacterial adhesion to colonic epithelial cells through the interaction with bacterial chitin-binding protein. *Lab. Invest.* 88, 883-895 (2008). 査読有り

M. Kojima, Y. Kezuka, T. Nonaka, Y. Hiragi, T. Watanabe, K. Kimura, K. Takahashi, S. Yanagi and H. Kihara, *SaxsMDView*: a three-dimensional graphics program for displaying force vectors. *Journal of Synchrotron Radiation*. 15, 535-537 (2008). 査読有り

C. Peter, C. Scholz, H. Wessner, G. Hansen, P. Henklein, T. Watanabe and W. Hohne, Phage display screening for peptidic chitinase inhibitors. *J. Mol. Recogn.*, 21, 401-409 (2008). 査読有り

S. Suzuki, E. Nakanishi, K. Furihata, K. Miyamoto, H. Tsujibo, T. Watanabe, Y. Ohnishi, S. Horinouchi, H. Nagasawa, S. Sakuda, Chitinase inhibitor allosamidin promotes chitinase production of *Streptomyces* generally. *Int. J. Biol. Macromol.*, 43, 13-19 (2008). 査読有り

M. Muto, A. Ohara, K. Azuma, K. Suzuki, and T. Watanabe, The role of exposed tryptophan and tyrosine residues on the surface of chitinase B from *Serratia marcescens* 2170. *Proceeding of MIE BIOFORUM 2008*. CD-ROM (2008). 査読無し

[学会発表](計13件)

T. Watanabe, Y. Kezuka, T. Nonaka, T. Ikegami, Y. Nishizawa, M. Mitsutomi, and T. Fukamizo, Structure and function of family 19 chitinases. 8th International Conference of the European Chitin Society (2007.9.8-11トルコ アンタルア).

T. Watanabe, R. Mizuno, K. Suzuki, Y. Kezuka, T. Nonaka, and Y. Nishizawa, Antifungal chitinases: structure, function and possible application to biocontrol. 1st international meeting for development of IPM in Asia and Africa (2007.11.26-28, タイ チェンマイ).

虎谷忠幸・庄司俊裕・鈴木一史・渡邊剛志, *Serratia marcescens* 2170のキチン分解利用に関わるオペロンの機能解析. 第21回キチン・キトサンシンポジウム (2007.7.26-27 福井市).

水野亮二・大橋大輔・鈴木一史・渡邊剛志, *Vibrio fischeri* MKT20由来ファミリー19キチナーゼの機能解析. 第21回キチン・キトサンシンポジウム (2007.7.26-27 福井市).

庄司俊裕・虎谷忠幸・宮本勝城・辻坊裕・鈴木一史・渡邊剛志, 転写因子 *chiR* を破壊した *Serratia marcescens* のプロテオーム解析. 日本農芸化学会 2008年度大会

(2008.3.26-29 名古屋市).

武藤亜紀子・大原麻子・吾妻香織・鈴木一史・渡邊剛志, *Serratia marcescens* 2170 由来キチナーゼ B の表面に露出したトリプトファンおよびチロシン残基の機能. 日本農芸化学会 2008 年度大会 (2008.3.26-29 名古屋市).

虎谷忠幸・鈴木一史・渡邊剛志, *Serratia marcescens* のキチナーゼ発現における ybfM 5' -UTR の重要性. 日本農芸化学会 2008 年度大会 (2008.3.26-29 名古屋市).

吉田優・菅丈司・水野亮二・毛塚雄一郎・野中孝昌・池上貴久・鈴木一史・渡邊剛志, *Streptomyces griseus* HUT6037 由来キチナーゼ C の構造と機能の解明. 第 22 回キチン・キトサンシンポジウム (2008.8.5-6 新潟市コンベンションセンター).

武藤亜紀子・大原麻子・吾妻香織・鈴木一史・渡邊剛志, *Serratia marcescens* 2170 由来キチナーゼ B の表面に露出したトリプトファン及びチロシン残基の機能. 第 22 回キチン・キトサンシンポジウム (2008.8.5-6 新潟市コンベンションセンター).

虎谷忠幸・山内友恵・鈴木一史・渡邊剛志, *Serratia marcescens* のキチナーゼ発現における ybfM 5' -UTR の重要性. 第 22 回キチン・キトサンシンポジウム (2008.8.5-6 新潟市コンベンションセンター).

吉田優・水野亮二・菅丈司・毛塚雄一郎・野中孝昌・池上貴久・鈴木一史・渡邊剛志, *Streptomyces griseus* HUT6037 由来キチナーゼ C の構造と機能の解明. 第 22 回キチン・キトサンシンポジウム (2008.8.5-6 新潟市コンベンションセンター).

杉山真一・水野亮二・西澤洋子・深溝慶・毛塚雄一郎・野中孝昌・鈴木一史・渡邊剛志, イネクラス I キチナーゼ活性ドメインのループ II の機能解析, 第 31 回日本分子生物学会年会 (2008.12.9-12 神戸ポートピアアイランド).

M. Muto, A. Ohara, K. Azuma, K.

Suzuki, and T. Watanabe, The role of exposed tryptophan and tyrosine residues on the surface of chitinase B from *Serratia marcescens* 2170. MIE BIOFORUM 2008 (2008.9.1-5 三重県志摩市).

〔図書〕(計 3 件)

渡邊剛志他、「酵素ハンドブック」、八木達彦・福井俊郎・一島英治・鏡山博行・虎谷哲夫 編、朝倉書店、(2008 年)

渡邊剛志他、「産業用酵素の応用技術と最新動向」井上國世監修、シーエムシー出版、28 章：キチナーゼ P.285-298 (2009 年)

渡邊剛志他、「キチン・キトサン開発技術」平野茂樹監修、シーエムシー出版、第 6 章 2：微生物のファミリー 19 キチナーゼ p.135-142, 第 7 章 4：キチナーゼによる結晶性キチン分解 p. 192-202 (2009 年)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.niigata-u.ac.jp/profile/watanabe/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 剛志 (Watanabe Takeshi)

所属 新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：10201203

(2) 研究分担者

無し。

(3) 連携研究者

無し。