

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 17 日現在

機関番号：33803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450086

研究課題名(和文) 二糖類に着目した土壌での多糖分解過程のケミカルエコロジー研究とその応用

研究課題名(英文) Processes of degradation of mono-, di- and poly-saccharides in soil

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：土壌微生物の多くは、多糖を細胞外で二糖にまで分解し、生じた二糖は多糖分解酵素の生産を誘導する。しかしながら、二糖を多糖分解の鍵物質とすることの生態的意義は不明である。本研究は、土壌での多糖分解における二糖生成・消失の意義を解明し、利用することを目的として行った。具体的には、キチンをモデル多糖とし、キチンやその分解物である単糖や二糖を土壌に添加し、物質動態と微生物群集構造や土壌酵素活性の変化を調べた。その結果、添加する糖質の鎖長(単糖、二糖、多糖)によって、土壌中のアンモニア窒素濃度、微生物数、および土壌酵素活性の増減パターンが異なることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Many of soil bacteria assimilating polysaccharides hydrolyzes the polysaccharides into corresponding disaccharides as major products by extracellular enzymes. To clarify the importance of the disaccharides in soil ecosystems, we investigated the effects of mono- and di-saccharides on the number of soil microorganisms, the activities of polysaccharide degrading enzymes, the amounts of inorganic nitrogens, and the structures of soil microbiome. The results clearly demonstrated that the alteration patterns of ammonium contents, the bacterial and fungal counts, and the soil enzymatic activities differs according to the chain length of the saccharides (i.e. monosaccharide, disaccharide, and polysaccharides).

研究分野：土壌微生物学

キーワード：糖質 微生物 酵素

1. 研究開始当初の背景

土壌環境の維持において、生物遺骸に含まれる生体高分子の分解は欠かせない。生体高分子の分解過程を解明することで土壌管理の技術向上や環境負荷低減が期待される。しかしながら、土壌での生体高分子分解メカニズムは未だ不明な点が多い。近年の DGGE 法や DNA-SIP 法などの DNA 情報に基づく微生物群集解析により、放線菌や糸状菌の他、多くの微生物が土壌での生体高分子分解に関わることが示されてきた。一方、未利用バイオマスの有効利用の観点から、個々の土壌微生物での生体高分子分解機構が分子レベルで研究されてきた。セルラーゼなどの多糖分解酵素については、立体構造に基づく詳細な反応触媒機構や、それらの遺伝子の構造や発現制御機構の他、酵素生産の誘導物質が解明されてきた。本研究は、これらの多糖分解に関する「土壌生態系研究」と「純粋培養研究」をつなぐ研究として位置づけられる。同様の位置にある研究として、多糖分解酵素遺伝子の塩基配列情報を分子生態学的手法に適用した報告が複数ある。しかしながら、多糖分解酵素遺伝子の塩基配列情報は多様であるため、PCR を介した従来の分子生態学的手法では一定範囲のターゲット遺伝子しか解析できない。次世代型の大規模塩基配列解析も含め、DNA 情報に基づく解析では、個々の微生物の機能や、物質を介した微生物間の相互作用を詳細に観察・解明することは難しい。本研究では、微生物分離と物質動態解析を起点とした多面的研究を展開し、DNA 情報の解析だけでは得難い、生物・化学情報に基づいて総合的に土壌での多糖分解過程を観察・解明し、その利用を図る。

2. 研究の目的

自然環境で生じる生態遺骸の成分の一つにキチンがある。キチンはセルロースに次いで自然界で大量に生成する生体高分子であり、放線菌は土壌での主要なキチン分解微生物でとされている。放線菌はキチンを細胞壁に含む植物病原性糸状菌の生物制御への利用も検討されている。研究代表者らは、早くから放線菌のキチナーゼに着目し、放線菌が基質特異性の異なる構造的にも多様性に富んだ多数のキチナーゼ遺伝子を有することを明らかにした。また、キチナーゼがキチンを分解することによって生じる *N,N'*-ジアセチルキトビオース (以下、キチン 2 糖) が、その膜輸送系タンパク質遺伝子群とキチナーゼ遺伝子群の発現を誘導することなどの発現制御機構を明らかにした。他のグループによる研究成果も合わせると、放線菌は、キチンだけでなく多糖全般について細胞外で二糖にまで分解してから、細胞内に取り込んで代謝することが推定される。また、グラム陰性の土壌細菌セラチア菌も、細胞外で生じるキチン 2 糖がキチナーゼ生産を誘導することが知られている。土壌微生物がなぜ、多

糖類を細胞外で単糖まで分解せず、二糖にまでしか分解しないのか？その生態的意義は不明である。

3. 研究の方法

風乾して篩いにかけて畑土壌にキチン粉末、キトサン粉末、キチン単糖、あるいはキチン 2 糖を添加し、25℃で保温して継時的に土壌を採取し、細菌および糸状菌数、細菌および糸状菌の群集構造、キチン分解関連酵素の活性、全窒素・全炭素量、および無機態 (アンモニウム、亜硝酸、硝酸) 態窒素濃度を調べた。キチンおよびキトサン量の変化も調べた。

4. 研究成果

(1) キチンおよびキトサン添加後 11 日後までの解析

畑土壌にキチン粉末あるいはキトサン粉末を添加して培養したところ、細菌数と糸状菌数は、キチン・キトサン粉末を添加して 11 日後に 10 倍以上に増加した。PCR-DGGE 法によって細菌群集構造を継時的に調べた結果、キチンあるいはキトサン粉末を添加した場合には、細菌群集構造が大きく変化した。また、キチンやキトサンの添加によって大きく増加する細菌属を知ることができた。キチン分解関連酵素であるキチナーゼ活性と *N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性は、予想通り、キチン粉末の添加によって上昇した。キチナーゼ活性と *N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性の消長が異なることも示すことができた。また、土壌中のアンモニア態窒素濃度もキチン添加によって大きく増加した。一方、全炭素量と全窒素量は、キチン添加 11 日後まで大きく変化しなかった。

(2) キチン添加後 90 日後までの解析

畑土壌にキチン粉末を加えて保温し、0~90 日間の土壌を採取して各種解析を行った結果、0 日目に添加したキチンは、90 日目まで指数関数的に減少し、90 日目にはほとんど検出されなかった。キチン添加土壌では、全炭素量も減少したが、著しい減少は 20 日目までであり、その後は緩やかに減少していった。全窒素量 (無機態窒素と有機態窒素量の合計) は、0~90 日間でほぼ一定であった。土壌中のアンモニア態窒素量は、15 日後程度までの間に増加し、その後ほぼ一定であった。亜硝酸態窒素と硝酸態窒素は数 $\mu\text{g N/g soil}$ で微量であった。酢酸は検出されなかった。キチナーゼ活性と *N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性 (以下、GlcNAcase 活性とする) を測定したところ、キチナーゼ活性がキチン添加後 5~10 日後に最大となって急激に減少したのに対し、GlcNAcase 活性は 20 日後まで増加し、その後緩やかに減少した。

(3) キチン単糖あるいはキチン 2 糖を畑土壌に添加した場合の解析

畑土壌にキチン単糖、キチン 2 糖、あるいはキチン粉末を加えて培養し、継時的に採取した土壌について、微生物数、無機態窒素濃

度, キチン分解酵素活性, および, 細菌と糸状菌の群集構造を調べた。

土壌中のキチナーゼ活性は, キチン単糖添加で変化しなかったが, キチン2糖あるいはキチンの存在下で上昇した。キチン2糖を添加した場合の方がキチンを添加した場合よりも, キチナーゼ活性の上昇時期が早かった。一方, *N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性はキチン単糖, キチン2糖, キチンのいずれの添加によっても上昇した。キチン単糖や2糖を添加した場合の方が, キチンを添加した場合よりも早い時期に活性の上昇が認められた。これらの結果から, キチン2糖は, キチンと同様に土壌中のキチナーゼと*N*-アセチルグルコサミニダーゼの活性を高める効果があることがわかった。また, その効果はキチン添加時よりも短時間で現れることが明らかとなった。一方, キチン単糖は試験土壌中の*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性は高めるが, キチナーゼ活性は高めないことがわかった。細菌数は, キチン単糖やキチン2糖を添加した場合, キチン添加時よりも早い時期に増加した。キチン単糖や2糖は, キチンよりも速やかに微生物分解を受けたと考えられる。糸状菌数はいずれの糖質を添加しても大きく変化しなかった。キチン単糖や2糖は, キチン同様, 糸状菌増殖低減効果をもつことが期待される。

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)

Tomita M, Kikuchi A, Kobayashi M, Yamaguchi S, Ifuku S, Yamashoji S, Ando A, Saito A (2013) Characterization of antifungal activity of the GH-46 subclass III chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*. 104:737-748.(査読あり)DOI: 10.1007/s10482-013-9982-5

Kouzai Y, Saito A (2013) Organ- and stage-specific expression of the lectin gene in tomato. *静岡理工科大学紀要*. 26: 27-33. (査読なし)

Saito A, Ebise H, Orihara Y, Murakami S, Sano Y, Kimura A, Sugiyama S, Ando A, Fujii T, Miyashita K. (2013) Biochemical and genetic characterization of the DasD protein possessing *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiology Letters*. (査読あり) 340: 33-40. DOI: 10.1111/1574-6968.12069

Nazari B, Kobayashi M, Saito A, A Hassaninasab, Miyashita K, Fujii T (2013) Chitin induces gene expression in secondary metabolic pathways in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. (査読あり)

29: 707-713. DOI: 10.1128/AEM.02217-12.

Dohi H, Kanazawa T, Saito A, Sato K, Uzawa H, Seto Y, Nishida Y (2014) Bis(b-lactosyl)-[60] fullerene as novel class of glycolipids useful for detection and decontamination of biological toxins in *Ricinus communis* family. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 10:1504-1512. (査読あり) DOI: 10.3762/bjoc.10.155. 齋藤明広 (2014) キチン分解の分子生物学と土壌微生物学. 土と微生物. (査読なし) 68: 79-80.

Sawaguchi A, Ono S, Oomura M, Inami K, Kumeta Y, Honda K, Sameshima-Saito R, Sakamoto K, Ando A, Saito A (2015) Chitosan degradation and associated changes in bacterial community structures in two contrasting soils. *Soil Science and Plant Nutrition*. 61: 471-480. (査読あり) DOI: 10.1080/00380768.2014.1003965.

Viens P, Dubeau M-P, Kimura A, Desaki K, Shinya T, Shibuya N, Saito A, Brzezinski R (2015) Uptake of chitosan-derived D-glucosamine oligosaccharides in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiology Letters*. (査読あり) 362: 1-9. DOI: 10.1093/femsle/fnv048.

[学会発表](計16件)

増田航, 齋藤明広 「ナタマメ根粒からの微生物の分離と同定」日本土壌微生物学会大会, 東京農工大学府中キャンパス, 2013年6月20日.

須山奈月, 藤田実加子, 田澤健太, 中島政哉, 齋藤明広, 西田芳弘, 土肥博史 「放線菌 ABC 輸送体の基質特異性解明に向けたキトビオース型二糖類の合成」日本糖質学会, 大阪国際交流センター, 2013年8月6日.

菊地彩美, 安藤昭一, 齋藤明広 「キトサン検出用タンパク質プローブの開発と糸状菌の細胞壁構造の解析への利用」第44回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会 (浜松), 静岡大学工学部, 2013年11月3日.

Akihiro Saito, Masayo Tomita, Ayami Kikuchi, Masashi Yamaguchi, Shinsuke, Ifuku, Akikazu Ando. Characterization of antifungal activity of the GH-46 subclass III chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1. 10th Asia-Pacific Chitin Chitosan Symposium, 米子コンベンションセンター, 2013年10月13日.

小野翔太, 本田一馬, 大村大, 澤口亜美, 坂本一憲, 鮫島(齋藤)玲子, 安藤昭一, 齋藤明広 「土壌でのキトサンの分解と微生物群集構造の変化」日本微生物生態学会, 鹿児島大学, 2013年11月23日.

齋藤明広 「キトサン分解酵素の抗菌作用とキトサン検出用プローブの開発」第25

回静岡ライフサイエンスシンポジウム（招待講演），静岡理工科大学，2014年3月8日。

岩堀昂平，山本広也，内田泰，関清彦，光富勝，齋藤明広「『蟹漬』からのキチン分解微生物の分離」日本キチン・キトサン学会，順天堂大学，2014年8月7日。

小野翔太，糸田佑太，本田一馬，石丸梢，山崎誠志，鮫島（齋藤）玲子，齋藤明広「キチン添加が畑土壌の微生物とキチン分解関連酵素に及ぼす影響」日本土壌肥料学会，東京農工大学小金井キャンパス，2014年9月10日。

増田航，畠中雄佑，岡崎伸，上村桂一，齋藤明広「ナタマメ根粒菌から分離された細菌株のDNA-DNA交雑法とMALDI-TOF/MSによる類別」環境微生物系学会合同大会2014，アクトシティ浜松，2014年10月23日。

飯野藤樹，ナザリベナム，齋藤明広，王勇，藤井毅「土壌環境下における放線菌キチナーゼ遺伝子群と抗生物質生産関連遺伝子群の発現誘導」環境微生物系学会合同大会2014，アクトシティ浜松，2014年10月23日。

増田航，畠中雄佑，齋藤明広「ナタマメ根粒菌の分類と収穫量への影響」日本土壌微生物学会，つくば国際会議場，2015年5月23日。

齋藤明広「*Streptomyces* 属放線菌のキチン分解物トランスポーター」日本キチン・キトサン学会（招待講演），東海大学熊本キャンパス，2015年8月21日。

井浪かおり，小野翔太，糸田佑太，樽松愛理，大塚恵巳，鮫島（齋藤）玲子，齋藤明広「畑土壌でのキチン分解とそれに伴う微生物群集構造と酵素活性の変化」日本キチン・キトサン学会，東海大学熊本キャンパス，2015年8月21日。

鈴木道彦，齋藤明広，小林麻理子，横山知史，大宮祥子，栗剣，杉田慶，三木邦夫，齋藤純一，安藤昭一「MH-K1 キトサナーゼの構造と反応機構」日本キチン・キトサン学会，東海大学熊本キャンパス，2015年8月21日。

井浪かおり，糸田佑太，鮫島（齋藤）玲子，齋藤明広「キチン添加が畑土壌のキチン分解関連酵素と微生物に及ぼす影響—キチン添加90日後までの影響」日本途上肥料学会，京都大学，2015年9月10日。

Akihiro Saito, Chibaru Inuma, Takayuki Ohnuma, Tomonori Shinya, Yusuke Kimura, Yuzusa Aoki, Liu Feng, Yoshitake Desaki, Naoto Shibuya, Tamo, Fukamizo, Akikazu Ando, Takeshi Fujii, Kiyotaka Miyashita “Uptake of a chitin-degradation product via the constitutive

N-acetylglucosamine/*N,N*-diacetylchitobiose binding protein NgcE^{SCO} of an ABC transporter in *Streptomyces coelicolor* A3(2)”, 日本微生物生態学，土浦亀城プラザ，2015年10月19日。

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

鮫島（齋藤）玲子
(SAMESHIMA-SAITO, REIKO)
静岡大学・農学部・准教授
研究者番号：0037722
土肥博史 (DOHI, HIROFUMI)
千葉大学大学院園芸学研究科・准教授
研究者番号：10345928

(3) 連携研究者

なし