

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450097

研究課題名(和文) Small RNAによる細菌のキチン分解利用系の連動的な制御機構

研究課題名(英文) Coordinated regulation of the chitin-degradation and utilization system by small RNA in bacteria

研究代表者

鈴木 一史 (Suzuki, Kazushi)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：00444183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Serratia marcescensのキチン分解酵素群発現に必須な転写因子ChiRは、ChiXによりその発現が抑制されている。chiRの発現抑制は、キチン分解産物の取り込みによって発現するキチン分解産物の取り込み系遺伝子のmRNAにChiXが塩基対形成することによって解除され、その結果、キチン分解酵素群が発現することが明らかとなった。ChiXはキチン分解酵素群とキチン分解産物の取り込み系の発現を連動的に制御するsmall RNAである。

研究成果の概要(英文)：Small RNA ChiX was expressed constitutively and repressed the translational initiation of chiR mRNA, encoding the transcriptional factor for the expression of chitin-degrading enzymes, by base pairing in Serratia marcescens. When the chiPQ-ctb operon, encoding chitoporin and chitinase, was fully expressed by degradation products of chitin, ChiX bound to the chiP mRNA. Base pairing between ChiX and the chiP mRNA relieved repression on the translational initiation of the chiR mRNA. Thus, the expressed ChiX activated the production of chitin-degrading enzymes. ChiX coordinates the synchronized expression of chitin-degrading enzymes and the system for incorporating chitin degradation products.

研究分野：応用微生物学

キーワード：遺伝子発現 small RNA キチナーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 未利用バイオマス・キチンの分解細菌と分解酵素キチナーゼ及び遺伝子発現調節機構の研究

N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) のポリマーであるキチンは、甲殻類、真菌、昆虫、その他様々な生物に存在し、地球上に最も豊富に存在する未利用バイオマス資源である。我々は基礎的及び応用的観点からキチン分解能に優れた *Serratia marcescens* や *Bacillus circulans* などによる細菌のキチン分解利用機構の解明を目的に研究を行ってきた。これによって、不溶性で結晶性のキチンを効率よく分解するためにキチナーゼが持つ特殊な機能 (キチン結合ドメイン、キチン鎖を捕らえた状態での連続的な分解など) を明らかにし、複数のキチナーゼによる相乗効果、新規キチン結合タンパク質 (CBP21) の発見など、多くの重要な発見をしてきた。さらに、*S. marcescens* のキチナーゼ発現調節機構の研究に取り組み、転写調節因子 ChiR が 3 種すべてのキチナーゼ (ChiA, ChiB, ChiC) 及び CBP21 の発現に必須であり、また、ジ-N-アセチルキトビオース [(GlcNAc)₂] の取り込みが関与していることを明らかにした。これらのことから、PTS (リン酸基転移機構) によって取り込まれリン酸化された (GlcNAc)₂ が ChiR のアロステリックエフェクターであり、すべてのキチナーゼ及び CBP21 の発現に関わっているという制御機構を予測した。

(2) Small RNA の発見とその重要性: *S. marcescens* キチン分解利用系制御機構の新展開

タンパク質をコードしない機能性小分子 RNA は、全ての生命に存在し、遺伝子の発現調節において重要な役割を果たしている。多くの細菌 small RNA は、mRNA の 5' 非翻訳領域 (5' UTR) のリボソーム結合部位と 10~20 塩基程度の短い塩基対を形成し、翻訳を阻害する。大腸菌には 80 程度の sRNA が存在しているといわれているが、全てが明らかになったわけではない。また、sRNA に小分子タンパク質がコードされている例など、今まで予想もしなかった新たなメカニズムが明らかになりつつあり、細菌 sRNA 研究は最先端の非常に重要な分野となっている。

その small RNA が *S. marcescens* のキチン分解利用機構に関与していることを発見した。(GlcNAc)₂ 及びキチンオリゴ糖のポリンと予測される外膜タンパク質 ChiP (YbfM) の遺伝子において、リボソーム結合部位を含む 5' UTR の発現が、キチナーゼの発現に必要であることがわかった¹⁾。塩基配列解析の結果、*chiP* (*ybfM*) mRNA の 5' UTR には small RNA である ChiX (MicM) が結合すると予想され、さらに ChiX は *chiR* mRNA の 5' UTR にも結合すると予測された (図 1)。よって、*chiR* 5' UTR に結合し翻訳を抑制していた ChiX が、*chiP* 5' UTR に結合することで、*chiR* の翻訳抑制が解

除され、キチナーゼが発現したと考えられた。つまり、キチナーゼの発現は ChiX を介した *chiP* の発現に連動していると考えられた。

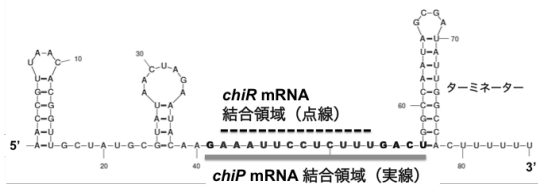


図1 ChiX の二次構造予測と結合領域

2. 研究の目的

本研究の目的は、small RNA によって細菌のキチン分解利用系 (キチン分解酵素及びキチン結合タンパク質の生産、分解産物の取り込み、分解産物の代謝) が連動して制御される新たな遺伝子発現調節機構を解明することである。そこで、モデル細菌として *S. marcescens* を用い研究を行うこととした。菌体外酵素であるキチナーゼの発現調節は従来考えられていた機構よりも複雑かつ巧妙であり、キチン分解産物であるキチンオリゴ糖の取り込みと分解に関わる遺伝子の発現が、small RNA を介し、キチナーゼの発現に必須な転写調節因子の発現に連動していると考えられた。さらに、当初予想されていたキチン分解産物ジ-N-アセチルキトビオースの取り込みによるキチナーゼ発現とは異なる機構の存在が示唆された。これらの現象のメカニズムを明らかにすることで、細菌におけるキチン分解利用系の新たな遺伝子発現調節機構の全体像を解明する。

3. 研究の方法

Small RNA が関与して連動的に制御される細菌における新たなキチン分解利用系の制御機構の解明のため、以下の方法により研究を実施した。

(1) ChiX の *chiP* 5' UTR 及び *chiR* 5' UTR への結合と発現調節機構の解明

① ChiX による *chiP* 及び *chiR* の発現調節: *chiX* 破壊株を (GlcNAc)₂ などの炭素源を用いて培養し、得られた培養上清中のキチナーゼ及びキトビアーゼの生産性及び活性を調べるとともに、*chiR*、*chiP* 等の遺伝子の発現を RT-PCR によって調べた。さらに、*chiX* をクローン化したプラスミドで野生株及び *chiX* 破壊株を形質転換した。これら形質転換体を (GlcNAc)₂ などの炭素源を用いて培養し、得られた培養上清中のキチナーゼ及びキトビアーゼの生産性及び活性を SDS-PAGE とザイモグラムにより調べるとともに、*chiR*、*chia*、*chiB*、*chiC*、*cbp* の発現を RT-PCR によって調べた。

② *chiP* 5' UTR 発現の影響: *chiP* 5' UTR をプラスミドにクローン化し、野生株や *chiP* 5' UTR にトランスポゾンが挿入されたキチナーゼ及びキトビアーゼ欠損株 (TT327) に導入した。これら形質転換体を (GlcNAc)₂ やグリセロールを炭素源として培養し、得られた培養

上清中のキチナーゼ及びキトビアーゼの生産性及び活性を調べた。

③ ChiX への変異導入とその影響：ChiX と *chiP* 5' UTR の塩基対形成が *chiR* の発現に影響を及ぼすことを確認するため、ChiX 上の *chiP* 5' UTR 及び *chiR* 5' UTR の相補配列の塩基を置換した変異 ChiX を発現するプラスミドを構築し、*chiX* 破壊株に導入した。これら形質転換体を (GlcNAc)₂ などの炭素源を用いて培養し、得られた培養上清中のキチナーゼ及びキトビアーゼの生産性及び活性を調べるとともに、*chiR*、*chiP* 等の各種遺伝子の発現を RT-PCR によって調べた。

④ ChiX、*chiP* 5' UTR、*chiR* 5' UTR の安定性及び結合機構：RNA 間の塩基対形成による安定性の変化を調べるため、ChiX、*chiP* mRNA、*chiR* mRNA の半減期をノーザンブロットや RT-PCR によって測定した。

(2) *chiP* 発現調節機構及び *chiPQ-ctb* オペロンの機能

① ChiP 及び ChiQ の機能：*chiP* または *chiQ* (*ybfN*) 遺伝子を破壊した変異株を構築し、キチンオリゴ糖などを炭素源とする培地での生育状況及びキチナーゼ活性を調べ、ChiP 及び ChiQ のキチン分解利用系への関与を調べた。

② *nagC* の関与：*NagC* は GlcNAc の取り込みと代謝に関する *nag* オペロンを制御するリプレッサーである。*NagC* 結合配列が *chiP* のプロモーター領域に存在することから、*nagC* 破壊株を構築して *chiP* の転写レベルやキトビアーゼ活性を測定し、*NagC* による *chiPQ* (*ybfMN-ctb*) オペロンの発現調節を調べた。

③ (GlcNAc)₂ による *chiP* の発現と ChbR の関係：*chb* オペロン中の (GlcNAc)₂ の PTS をコードする *chbC* の破壊株はキチナーゼを生産せず、キチン分解酵素系の発現に関連していることが明らかになっている。大腸菌の研究から、*chb* オペロンの転写調節因子 ChbR はリン酸化 (GlcNAc)₂ と結合して活性型になると考えられている。そこで、ChbR に着目し、*chbR* 破壊株を構築して *chiP* の発現を調べるとともに、*chiR* や *chiX* 発現への影響を調べた。

(3) ChiR による *chiA*、*chiB*、*chiC*、*cbp* の発現メカニズム

① *chiR* 欠損株の 2D-DIGE 解析：転写調節因子 ChiR は全てのキチナーゼ及び CBP21 の発現を間接的に調節している可能性が高い。よって、(GlcNAc)₂ を炭素源とした培地で野生株と *chiR* 欠損株を培養し、菌体内タンパク質の 2D-DIGE (2 Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis) 法による解析を行った。

4. 研究成果

(1) ChiX の *chiP* 5' UTR 及び *chiR* 5' UTR への結合と発現調節機構の解明

① Small RNA ChiX をコードする *chiX* 遺伝子の破壊株の構築と *chiX* 遺伝子のプラスミドへのクローン化を行った。*chiX* 破壊株と *chiX*

発現株を (GlcNAc)₂ などの炭素源を用いて培養してキチナーゼ及びキトビアーゼの生産性及び各種遺伝子の発現を解析した。*chiX* 破壊株を様々な炭素源を用いて培養した結果、本来ならばキチナーゼが誘導されない炭素源であるグルコースやグリセロールにおいてもキチナーゼ遺伝子の転写活性化因子をコードする *chiR* が発現し、キチナーゼが誘導されることが明らかになった。一方、野生株において ChiX は炭素源にかかわらず常に発現していた。*chiX* をプラスミド上で発現させた場合、キチナーゼ及びキトビアーゼの発現が抑制された。これらの結果に加え、各種遺伝子発現の解析結果から、ChiX がキチナーゼ及びキトビアーゼの生産を抑制し、*chiR*、*chiP*、3 種のキチナーゼや CBP21 遺伝子の発現を抑制していることが明らかとなった。

② ChiX と相補配列をもつ *chiP* 5' UTR をプラスミドにクローン化し、TT327 株で発現させたところ、通常はキチナーゼが生産されないグリセロールを炭素源とした場合でも 3 種のキチナーゼと CBP21 の生産が認められ、*chiP* 5' UTR の発現がキチナーゼ及び CBP21 の生産に必須であることが明らかとなった。さらに、*chiP* 及び *chiR* 5' UTR と翻訳領域の一部を含む領域をプラスミドにクローン化して細胞内で発現させた結果、*chiP* 5' UTR の発現はキチナーゼの発現抑制を解除できるのに対し、*chiR* 5' UTR の発現はキチナーゼの発現抑制を解除することができなかった。よって、ChiX による *chiR* 翻訳抑制の解除は、単なる相補配列を有する RNA の発現ではなく、*chiP* 5' UTR の特殊性が関与していると考えられた。

③ ChiX の *chiP* 及び *chiR* mRNA との塩基対形成に関与すると考えられる領域のうち、1 塩基の置換を *chiX* 遺伝子に導入して変異 ChiX を発現する複数のプラスミドを構築した。これらプラスミドを *chiX* 破壊株に導入した結果、ChiX のターゲットである *chiP*、*chiR* の発現抑制がかからず、キチナーゼ及びキトビアーゼが生産された。よって、ChiX は *chiP* 及び *chiR* mRNA と塩基対を形成して制御していると考えられた。*chiP* mRNA との相補配列領域は *chiR* mRNA よりも長い。そこで、*chiR* mRNA 相補配列以外の塩基を置換し、同様に細胞内で発現させたが、変異 ChiX の機能に大きな変化は認められなかった。

④ *chiPQ-ctb* mRNA の各領域を RT-PCR によって検出した結果、*chiP* 5' UTR の領域は他の領域よりも多く存在しており、ChiX が塩基対形成をすることによってこの領域が安定化している可能性が示唆された。

(2) *chiP* 発現調節機構及び *chiPQ-ctb* オペロンの機能

① *chiP* 遺伝子が存在する *chiPQ-ctb* オペロンの機能を明らかにするため、*chiP* 及び *chiQ* の遺伝子破壊株を構築し、キチンオリゴ糖などを炭素源とする培地での生育状況及びキチナーゼ活性を調べたところ、ChiP は比較的

長鎖のキチンオリゴ糖の取り組みに必要なキトポリンであることが明らかとなった。

② *chiP* の発現には GlcNAc の PTS 発現制御を行う転写因子 NagC の関与が示唆されたため、*nagC* 破壊株を構築し解析を行ったところ、NagC は *chiP* 発現を抑制していることが明らかとなった。GlcNAc の PTS をコードする *nagE* の破壊株を GlcNAc で培養した際、全てのキチナーゼ及び CBP21、さらには *chiP*、*chiR* の発現に影響を及ぼすことが明らかとなった。

③ *chiP* の発現制御メカニズムを解析するため、*chb* オペロンの転写因子をコードする *chbR* の破壊株を構築し、相補性試験を行った結果、ChbR は *chiP* 発現に関与していないことが示唆された。

(3) ChiR による *chiA*、*chiB*、*chiC*、*cbp* の発現メカニズム

① 転写調節因子 ChiR による全てのキチナーゼ及び CBP21 の発現機構解明のため、2D-DIGE 解析を行った結果、*chiR* 欠損株で発現が変化するタンパク質数とその変化量は少ないことが明らかとなり、ChiR のターゲットはタンパク質をコードする遺伝子のみならず、small RNA などの他の因子である可能性も考えられた。

(4) まとめ

S. marcescens のキチン分解酵素群発現に必須な転写因子 ChiR は、ChiX によりその発現が抑制されているが、キチン分解産物 (GlcNAc)₂ の取り込みによってキトポリン及びキトビアーゼをコードする *chiPQ-ctb* オペロンが発現し、大量に存在する *chiP* mRNA に ChiX が塩基対形成することによって、*chiR* の抑制が解除され、キチン分解酵素群が発現することが明らかとなった (図2)。ChiX はキチン分解酵素群とキチン分解産物の取り込み系を連動的に制御する small RNA である。

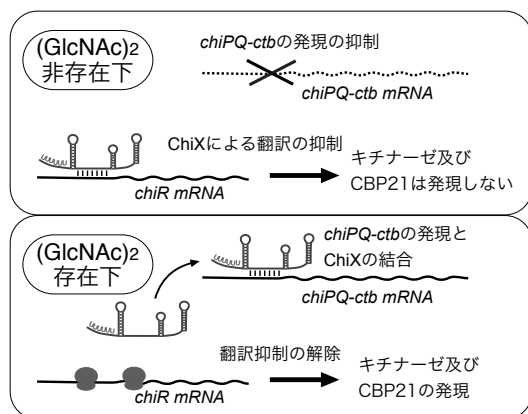


図2 ChiX による *chiR* 発現抑制とその解除機構モデル

<引用文献>

① T. Toratani, K. Suzuki, M. Shimizu, H. Sugimoto, and T. Watanabe (2012) Regulation of chitinase production by the 5'-untranslated region of the *ybfM* in *Serratia marcescens* 2170. Biosci.

Biotechnol. Biochem. 76(10):1920-1924.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

① Kazushi Suzuki, Mari Shimizu, Naomi Sasaki, Chisana Ogawa, Haruka Minami, Hayuki Sugimoto, and Takeshi Watanabe. (2016) Regulation of the chitin degradation and utilization system by the ChiX small RNA in *Serratia marcescens* 2170. Biosci. Biotechnol. Biochem. 80(2):376-385. 査読有
DOI:10.1080/09168451.2015.1083399

② Shinya Takano, Syouta Honma, Takuma Miura, Chisana Ogawa, Hayuki Sugimoto, Kazushi Suzuki, and Takeshi Watanabe. (2014) Construction and basic characterization of deletion mutants of the genes involved in chitin utilization by *Serratia marcescens* 2170. Biosci. Biotechnol. Biochem. 78(3):524-532. 査読有
DOI:10.1080/09168451.2014.882755

③ 渡邊剛志、杉本華幸、鈴木一史. (2014) *Serratia marcescens* のキチン分解利用機構. キチン・キトサン研究 Vol. 20 No. 1, pp. 4-15. 総説 査読無

[学会発表] (計16件)

① 鈴木一史、南晴香、山岸拓矢、小川知佐奈、佐々木直美、杉本華幸、渡邊剛志. 小分子 RNA・ChiX による *chiR* 発現抑制とその解除. 日本農芸化学会 2016 年度大会 3/29, 2016. 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

② 南晴香、鈴木一史、佐々木直美、山岸拓矢、杉本華幸、渡邊剛志. Small RNA ChiX による 2 種の標的 mRNA の発現制御機構. 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会. 3/4-5, 2016. 東京工業大学 (東京都目黒区)

③ Kazushi Suzuki, Haruka Minami, Chisana Ogawa, Naomi Sasaki, Mari Shimizu, Shinya Takano, Hayuki Sugimoto, and Takeshi Watanabe. Role of small RNA in chitin degradation and utilization system of *Serratia marcescens*. The 5th Asian Conference on Green Technology in Agriculture. 7/20, 2015. Chiang Mai (Thailand).

④ 鈴木一史、南晴香、小川知佐奈、佐々木直美、杉本華幸、渡邊剛志. *Serratia marcescens* における小分子 RNA ChiX を介した *chiR* 及び *chiPQ-ctb* の発現制御. 第 17 回日本 RNA 学会年会. 7/15, 2015. ホテルライ

フォート札幌（北海道札幌市）

⑤ Takeshi Watanabe, Takuma Miura, Haruka Minami, Chisana Ogawa, Syouta Honma, Hayuki Sugimoto, and Kazushi Suzuki. Chitin degradation and utilization system of *Serratia marcescens* 2170. ---Role and regulation of the *chiPQ-ctb* operon--- MIE BIOFORUM 2014 -Lignocellulose Degradation and Biorefinery-, 11/19-20, 2014. Nemuno Sato Hotel & Resort (三重県志摩市)

⑥ 渡邊剛志、杉本華幸、鈴木一史。細菌のキチナーゼとキチン分解利用機構。第 28 回キチンキトサンシンポジウム。8/7, 2014. 順天堂大学（東京都文京区）

⑦ 三浦拓馬、本間祥太、杉本華幸、鈴木一史、渡邊剛志。 *Serratia marcescens* 2170 のキチン分解利用機構 -*chiPQ-ctb* オペロンの機能解析-。第 28 回キチンキトサンシンポジウム 8/7-8, 2014. 順天堂大学（東京都文京区）

⑧ 鈴木一史、小川知佐奈、南晴香、杉本華幸、渡邊剛志。 *Serratia marcescens* におけるキチン分解産物の取り込みと small RNA によるキチナーゼ発現制御。第 28 回キチンキトサンシンポジウム。8/8, 2014. 順天堂大学（東京都文京区）

⑨ 鈴木一史、南晴香、小川知佐奈、佐々木直美、杉本華幸、渡邊剛志。 Small RNA ChiX が制御する *Serratia marcescens* キチン分解利用系の解析。第 16 回日本 RNA 学会年会。7/23-24, 2014. ウィンクあいち（愛知県名古屋市）

⑩ Kazushi Suzuki, Mari Shimizu, Chisana Ogawa, Naomi Sasaki, Shinya Takano, Hayuki Sugimoto, and Takeshi Watanabe. Coordinate regulation of the chitin degradation and utilization system by small RNA in *Serratia marcescens*. American Society for Microbiology 113th General Meeting. 5/19, 2013 Denver, Colorado (USA)

⑪ Kazushi Suzuki, Naomi Sasaki, Chisana Ogawa, Mari Shimizu, Shinya Takano, Hayuki Sugimoto, and Takeshi Watanabe. Regulation of chitin degradation and utilization system by ChiX small RNA in *Serratia marcescens*. 10th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium / 27th Japanese Chitin and Chitosan Symposium. 10/5, 2013. 米子コンベンションセンター（鳥取県米子市）

⑫ Takeshi Watanabe, Hayuki Sugimoto, and

Kazushi Suzuki. Chitin degradation and utilization system of *Serratia marcescens* 2170. 10th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium / 27th Japanese Chitin and Chitosan Symposium . 10/5, 2013. 米子コンベンションセンター（鳥取県米子市）

⑬ 鈴木一史、小川知佐奈、南晴香、杉本華幸、渡邊剛志。 small RNA を介した *Serratia marcescens* キチン分解利用系制御への NagC 及び ChbR の関与。日本農芸化学会 2014 年度大会。03/28, (2014) 明治大学生田キャンパス（神奈川県川崎市）

⑭ 三浦拓馬、今井裕也、小川知佐奈、杉本華幸、鈴木一史、渡邊剛志。 *Serratia marcescens* 2170 のキチン分解利用機構 - *chiPQ-ctb* オペロンの機能 -。日本農芸化学会 2014 年度大会。03/28, (2014) 明治大学生田キャンパス（神奈川県川崎市）

[その他]
ホームページ等
新潟大学農学部 応用微生物学研究室ホームページ
<http://www.agr.niigata-u.ac.jp/~ksuzuki/AppMicro/Welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木一史 (SUZUKI, Kazushi)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号：00444183

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

渡邊剛志 (WATANABE, Takeshi)
新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号：10201203

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