

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450099

研究課題名(和文) Paenibacillus属細菌による真菌類捕食機構の解明と産業への応用

研究課題名(英文) Elucidation of fungal predation mechanism by Paenibacillus species and its application to industry

研究代表者

木元 久 (Kimoto, Hisashi)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：70283166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Paenibacillus属細菌による抗真菌メカニズムを詳細に解析した。その結果、Paenibacillus属細菌は、種々の細胞壁分解酵素だけでなく、異なる種類の抗菌物質も産生していた。本研究の成果は、難分解性バイオマスの有効利用に関する分子基盤技術の確立に貢献する。また、その分解産物である機能性オリゴ糖は、バイオ農薬や健康食品、抗真菌薬への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, the antifungal mechanism by Paenibacillus species was analyzed in detail. As a result, Paenibacillus species produced not only various cell wall degrading enzymes but also different types of antifungal substances. The results of this research contribute to the establishment of molecular basis technology on effective utilization of persistent biomass. Functional oligosaccharides, which are degradation products, are also expected to be applied to biopesticides, health foods and antifungal drugs.

研究分野：生化学・分子生物学・応用微生物学

キーワード：Paenibacillus キチン キトサン グルカン キチナーゼ キトサナーゼ グルカナーゼ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

*Paenibacillus* 属細菌の中には、真菌類細胞壁の溶解酵素や抗真菌活性を有する抗生物質を産生するグループが存在する。このようなグループの細菌は、細胞壁溶解酵素と抗生物質を併用して自分よりも大きな真菌類を捕食していると考えられる。しかしながら、*Paenibacillus* 属細菌に限らず、細胞壁分解酵素と抗生物質は、これまで別の研究分野として研究が行われてきた。本研究では、“どのようにして細菌が自分よりも大きな真菌類を捕食しているのか？”という観点から、総合的に研究を行うことを特徴としている。

### 2. 研究の目的

*Paenibacillus* 属細菌は、*Collimonas* 属細菌よりも増殖が速く細胞壁分解能力も高い。生きた菌類を捕食する細菌は、化学農薬とは異なり薬剤耐性菌出現の心配がない次世代の微生物農薬として期待されている。また、キチンやキトサンの分解産物であるグルコサミン類には、抗炎症効果や変形性関節症改善効果が確認されている。さらに、グルコサミン類のオリゴ糖には、植物の生体防御機構を活性化するエリシター活性やヒトの免疫能を増強する効果（免疫賦活）があり注目されている。本研究の目的は、*Paenibacillus* 属細菌の真菌類捕食機構を分子レベルで明らかにし、微生物農薬や健康機能性食品、医薬分野へ応用することである。

### 3. 研究の方法

真菌類の細胞壁分解活性は、キチナーゼ活性および $\beta$ -1,3-グルカナーゼ活性、キトサナーゼ活性を指標に測定した。それぞれの酵素活性に使用した基質は、キチナーゼ活性では合成発色基質 ( $\beta$ -N-アセチル-D-グルコサミンおよび $\beta$ -N-アセチルキトオリゴ糖の

-ニトロフェニル誘導体) およびコロイダルキチン、 $\beta$ -1,3-グルカナーゼ活性は 1,3-Beta Glucosylase HS tablets (Megazyme)、キトサナーゼ活性は、可溶性のグリコールキトサンを用いた。

抗菌活性は、シデロフォアおよびシアン化水素、抗菌物質の産生を調べた。シデロフォアの産生は、Fe-CAS Indicator により測定した(参考文献①)。Chrome Azurol S-鉄錯体は青色に呈色するが、シデロフォアにより鉄が奪われると呈色は消失する。寒天培地上で *Paenibacillus* 属細菌を培養して、Chrome Azurol S-鉄錯体由来する青色の消失を指標にシデロフォアの産生を評価した。シアン化水素の産生を評価するための検定紙は、0.5% (w/v) Picric Acid (2,4,6-Trinitrophenol)水溶液に、2% (w/v) になるように Sodium Carbonate を加えてフィルター滅菌し、Whatman Filter Paper (No.1) に含浸・風乾することで作成した(参考文

献②)。この検定紙を寒天培地上に形成したコロニーの上に置き、黄色から褐色への変化を指標に HCN 産生を評価した。抗菌活性は、植物病原菌類を中心に対峙培養を行い確認した。

細胞壁分解酵素遺伝子の同定およびクローニングは、次世代シーケンサによるゲノム解析から得られた遺伝情報や酵素の N 末端アミノ酸配列情報を利用して行った。

### <参考文献>

- D. B. Alexander\* and D.A. Zuberer: Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fertil Soils*, 1991, 12, 39-45  
Vaikuntapu PR, Dutta S, Samudrala RB, Rao VR, Kalam S, Podile AR.: Preferential Promotion of *Lycopersicon esculentum* (Tomato) Growth by Plant Growth Promoting Bacteria Associated with Tomato. *Indian J Microbiol.* 2014, 54, 403-12

### 4. 研究成果

**FPU-7 株**: 本菌は真菌類細胞壁の分解能力が高く、両者のコロニーが接触する領域では、菌類が溶解する様子を確認できる。キチンだけでなく、グルカンやキトサンも分解できるが、特にキチン分解能力が高く、7種類ものキチナーゼを産生していた。その中でも細胞表層に発現しているキチナーゼ (ChiW) は、分子内に触媒ドメインが2つあり、高分子キチンの分解能力に極めて優れていた。ChiW は細菌における細胞表層発現型キチナーゼとしても最初の例であり、その立体構造を明らかにした。その結果、両ドメインとも深い基質結合クレフトの底部に位置しており、このような構造が非晶質である真菌類細胞壁キチンを効率よく切断するために重要な構造であることが示唆された。

**IK-5 株**: 本菌の特徴は、優れた運動能力と高いキトサナーゼ活性・グルカナーゼ活性・キチナーゼ活性を有していることである。本菌株が産生するキトサナーゼはグルカン分解活性も有しており、その構造解析の結果から、グルカナーゼからキトサナーゼに分子進化したことが示唆された。真菌類の細胞壁にはキトサンだけでなくグルカンも多く含まれていることから、グルカナーゼ活性を保持したままキトサナーゼ活性を獲得する方向へ進化したと考えられ、本酵素は高機能型の細胞壁分解酵素である。さらに本キトサナーゼ-グルカナーゼには、CBM32 に分類される糖質結合モジュールが存在しており、世界で初めてキトサンに特異的な糖質結合モジュールであることを証明した。また、本菌株は4種類の分泌型キチン分解系酵素を産生しているが、たい

へん興味深いことに、お互いが集合して高分子複合体を形成していることを発見し、“キチナソーム”と命名した。糖質分解酵素の高分子複合体としては、セルロソーム (Doi and Kosugi, *Nature Reviews*

*Microbiology*, 2004) に続く 2 例目である。

キチナソームを構成する各因子の大量発現は困難を極めたが、鋭意検討した結果、低温でゆっくり発現させたり、大腸菌のペリプラズム空間に発現させたりすることで、活性型の遺伝子組換え酵素として大量発現させることに成功した。実際に酵素活性を測定したところ、ChiA および ChiB は糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 18 キチナーゼ活性、ChiC はキチンモノオキシゲナーゼ活性、ChiD は GH19 キチナーゼ活性を確認した。また、ChiA および ChiB は同じ GH-18 キチナーゼであるが、両者はゲノム上でオペロンを形成しており、キチンの分解において同時に作用させることで相乗効果を発揮することを確認した。

キトビアーゼに関しては、GH-20 に分類される細胞表面提示型の酵素遺伝子がゲノム上にコードされていた。実際に IK-5 株で発現しているキトビアーゼ活性の局在を調べたところ、培養上清には検出されなかったが、菌体画分において明確な活性を検出した。さらに、大腸菌で遺伝子組換え酵素として発現させて基質特異性を調べたところ、二糖であるキトビオースだけでなく、少なくとも四糖までは分解可能であったことから、*-N-アセチルヘキソサミニダーゼ* であることが明らかとなった。これまでにキトビアーゼ活性とキチナーゼ活性を合わせ持つ酵素は、自身の細胞壁成分であるキチンの代謝酵素として担子菌を中心に数例しか報告されていない。

IK-5 株が植物生長促進作用を持つ根圏土壌細菌であることから、キチナーゼの本来の基質は、カビやキノコなどの真菌類細胞壁を構成しているキチンであると推測される。キチンの部分分解産物である“キチンオリゴ糖”には、植物の病害抵抗性誘導活性や生長促進効果が確認されており、化学農薬や化学肥料の削減に貢献する環境調和型の有機農業資材として注目されている。植物病原菌類の約 8 割はカビなどの真菌類であり、植物の根から排出される老廃物を栄養源として利用している IK-5 株は、植物病原菌類を排除し、さらに細胞壁キチンの分解産物が植物の耐病性向上や生長を促進させることにより、うまく共生関係を構築していると考えられる。

**FPU-37 株:** 一般的な抗真菌物質産生菌と同じように、植物病原菌の菌糸は FPU-37 株を滴下した濾紙には近づけないが、長期間培養すると IK-5 株と同様に寒天培地上を移動して菌糸を取り囲む。生きた菌糸を栄養源とする細菌としては *Collimonas fungivorans* (Wieste et al., *Int J Syst Evol*

*Microbiol.* 2004) が唯一知られており、*Paenibacillus* 属細菌は 2 例目となる。本菌株は高い抗菌活性を有していることが特徴で、シデロフォア・シアン化水素・抗菌物質を産生しており、農業上重要な植物病原菌である、オオムギ赤かび病菌、イネばか苗病菌、サトイモ乾腐病菌、トマト萎凋病菌、トマト葉かび病菌、イチゴ炭疽病菌、ダイズ紫斑病菌、スイカ炭疽病菌、スイカつる枯病菌、インゲンマメ病原菌、キュウリ病原菌に対して、いずれも強い抗菌活性を示すことを確認した。

このように FPU-37 株はカビなどの真菌類に対して強い抗菌活性を有しており、真菌類の細胞壁が不溶性の高分子多糖であるキチンや  $\beta$ -1,3-グルカン、キトサンを主成分として構成されていることから、これらの糖に対する FPU-37 株の分解活性を調べたところ、キチンおよびキトサンの分解活性は検出されなかったが、高い  $\beta$ -1,3-グルカン分解活性を確認した。細菌が産生する不溶性の  $\beta$ -1,3-グルカンであるカードランを用いて FPU-37 株が培養液中に分泌した  $\beta$ -1,3-グルカンナーゼのアフィニティー精製を行い、その N 末端アミノ酸配列から  $\beta$ -1,3-グルカンナーゼ遺伝子を同定した。本遺伝子は、3,003 塩基対からなる ORF で、1,001 アミノ酸残基、推定のシグナルペプチドが 51 アミノ酸残基から構成されており、シグナルペプチドが切断された分泌型成熟酵素の分子量は 103 kDa と算出され、アフィニティー精製した酵素の SDS-PAGE 結果と一致した。さらに、InterProScan によるモチーフ・ドメイン検索を行った結果、本酵素は糖質分解酵素ファミリー 81 に分類される典型的なグルカンナーゼであった。大腸菌による大量発現では、コールドショック発現系により封入体を回避して活性型酵素として発現させることに成功した。本酵素活性の至適条件は、pH8.0 および 40 °C であった。また、 $\beta$ -1,3-グルカンのオリゴ糖は、高等植物の基礎的抵抗性を誘導することが知られていることから、 $\beta$ -1,3-グルカンを主成分とする酵母細胞壁を本酵素により部分分解してコマツナに与えたところ、病害防御応答関連遺伝子として知られている植物由来グルカンナーゼの発現上昇が認められた。

本研究の成果は、キチンやキトサン、グルカン (セルロースや澱粉を含む) という難分解性バイオマスの有効利用に関する分子基盤技術の確立や分解産物であるオリゴ糖の生理機能を活用した健康機能性食品の開発、微生物農薬・抗真菌薬・抗腫瘍薬への応用などが期待される。

## 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 10 件)

H. Kusaoka, S. Shinya, T. Fukamizo, H. Kimoto, Biochemical and biotechnological trends in chitin, chitosan, and related enzymes produced by *Paenibacillus* IK-5 Strain., Int J Biol Macromol., 査読有, 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.118.

T. Itoh, T. Hibi, F. Suzuki, I. Sugimoto, A. Fujiwara, K. Inaka, H. Tanaka, K. Ohta, Y. Fujii, A. Taketo, and H. Kimoto, Crystal Structure of Chitinase ChiW from *Paenibacillus* sp. str. FPU-7 Reveals a Novel Type of Bacterial Cell-Surface-Expressed Multi-Modular Enzyme Machinery., PLOS ONE, 査読有, 2016, DOI: 10.1371/journal.pone.0167310. eCollection 2016.

H. Katano, M. Takakuwa, H. Hayakawa, and H. Kimoto, Determination of Chitin Based on the Colorimetric Assay of Glucosamine in Acidic Hydrolysate., Anal. Sci., 査読有, 32 巻, 2016, 701-703, DOI: 10.2116/analsci.32.701.

S. Shinya, S. Nishimura, Y. Kitaoku, T. Numata, H. Kimoto, H. Kusaoka, T. Ohnuma, and T. Fukamizo, Mechanism of chitosan recognition by CBM32 carbohydrate-binding modules from a *Paenibacillus* sp. IK-5 chitosanase/glucanase., Biochem. J., 査読有, 473 巻, 2016, 1085-1095, DOI: 10.1042/BCJ20160045.

H. Katano, H. Kimoto, S. Taira, and T. Tsukatani, Physicochemical Properties and Antimicrobial Performance of Benzyltrimethylammonium Bis (2-ethylhexyl) Phosphate., Sensors and Materials., 査読有, 27 巻, 2015, DOI: 10.18494/SAM.2015.1074

T. Itoh, I. Sugimoto, T. Hibi, F. Suzuki, K. Matsuo, Y. Fujii, A. Taketo, H. Kimoto, Overexpression, purification, and characterization of *Paenibacillus* cell surface-expressed chitinase ChiW with two catalytic domains. Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有, 78 巻, 2014, 624-634, DOI: 10.1080/09168451.2014.891935.

D. Isogawa, H. Morisaka, K. Kuroda, H. Kusaoka, H. Kimoto, S. Suye, M. Ueda, Evaluation of chitosan-binding amino acid residues of chitosanase from *Paenibacillus fukuinensis*., Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有, 78 巻, 2014, 1177-1182, DOI:10.1080/09168451.2014.917263.

T. Itoh, T. Hibi, I. Sugimoto, F. Suzuki, Y. Fujii, A. Taketo, H. Kimoto, Crystallization and preliminary X-ray analysis of the catalytic domains of

*Paenibacillus* sp. str. FPU-7 cell surface-expressed chitinase ChiW. Acta Crystallographica Section F, 査読有, F70 巻, 2014, 350-353, DOI: 10.1107/S2053230X14002325.

H. Katano, A. Fujiwara, H. Kimoto, Separation and Purification of Oligochitosan Based on Precipitation with Bis (2-ethylhexyl) phosphate Anion, Re-dissolution, and Re-precipitation as the Hydrochloride Salt., J. Chitin Chitosan Sci., 査読有, 2 巻, 2014, 75-78, DOI: 10.1166/jcc.2014.1041

木元 久, 伊藤貴文, 日比隆雄, 藤井豊, 草桶秀夫, *Paenibacillus* 属細菌のキチン分解機構, 応用糖質科学, 査読有, 4 巻, 2014, 113-120

〔学会発表〕(計 16 件)

吉見 僚太, 藤井 豊, 田端 和仁, 野地 博行, 木元 久, FPU-37 株における 180-kDa 糖タンパク質遺伝子のクローニングと発現, 日本農芸化学会 2017 年度(平成 29 年度)大会, 2017 年 03 月 19 日, 京都女子大学(京都市) 石田瑠美, 吉見僚太, 笠原康一, 藤井豊, 奥 直也, 木元 久, 植物生育促進根圏細菌(PGPR) *Paenibacillus* sp. FPU-37 株は植物の感染特異的タンパク質を誘導する, 日本農芸化学会 2017 年度(平成 29 年度)大会, 2017 年 03 月 19 日, 京都女子大学(京都市) 伊藤 貴文, 日比 隆雄, 藤井 豊, 武藤 明, 木元 久, *Paenibacillus* 属細菌由来細胞表面キチナーゼ ChiW の立体構造, 日本農芸化学会 2017 年度(平成 29 年度)大会, 2017 年 03 月 19 日, 京都女子大学(京都市) 石田瑠美, 吉見僚太, 横山佳菜子, 笠原康一, 藤井 豊, 木元 久, 植物生長促進細菌(PGPB) FPU-37 株による病害抵抗性誘導の解析および農業利用, 第 9 回北陸合同バイオシンポジウム, 2016 年 11 月 04 日, 金津創作の森(あわら市)

吉見僚太, 米田祐貴, 田中優紀, 藤井豊, 木元 久, *Paenibacillus* 属細菌 FPU-37 株における遺伝子操作系の構築, 第 9 回北陸合同バイオシンポジウム, 2016 年 11 月 04 日, 金津創作の森(あわら市)

木元久, 平修, 植松宏平, 片野肇, *Paenibacillus* sp. FPU-37 株由来アミラーゼ遺伝子のクローニングと解析, 日本応用糖質科学会 平成 27 年度大会(第 64 回)・応用糖質科学シンポジウム, 2015 年 09 月 16 日, 奈良春日野国際フォーラム(奈良県・奈良市) 新家粧子, 西村重徳, 北奥喜仁, 木元久, 草桶秀雄, 沼田倫征, 大沼貴之,

深溝 慶、溶液 NMR 法と X 線結晶解析によるキトサン結合モジュールとキトサンの相互作用解析、日本応用糖質科学会 平成 27 年度大会(第 64 回)・応用糖質科学シンポジウム、2015 年 09 月 18 日、奈良春日野国際フォーラム(奈良県・奈良市)

西岡健太、藤井 豊、石田瑠美、吉見僚太、早川 祝、木元 久、*Paenibacillus* sp. FPU-37 株由来  $\beta$ -1,3-グルカナーゼ遺伝子のクローニングと大量発現系の構築、第 8 回北陸合同バイオシンポジウム、2015 年 10 月 30 日、山中温泉「山中座」(石川県加賀市)

吉見僚太、木元 久、*Paenibacillus* 属細菌 FPU-37 株が産生する澱粉誘導タンパク質の機能解析、第 8 回北陸合同バイオシンポジウム、2015 年 10 月 30 日、山中温泉「山中座」(石川県加賀市)

伊藤貴文、日比隆雄、横内佳奈、高宮杏奈、藤井 豊、武藤 明、木元 久、*Paenibacillus* 属細菌由来細胞表層キチナーゼ ChiW の組換えタンパク質発現と細胞表層結合ドメインの応用、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 03 月 26 日、岡山大学(岡山県、岡山市)

木元 久、動物・植物の生体防御機構を活性化する動物性繊維キチンに期待を込めて ~その可能性と技術的課題の解決を探る~、多糖の未来フォーラム、九州大学(福岡県、福岡市)

木元 久、笠原康一、加藤久晴、伊藤貴文、日比隆雄、“越前がに”のブランドイメージを活用した次世代型農業資材、北陸合同バイオシンポジウム、2014 年 11 月 28 日、八尾ゆめの森 ゆゆう館(富山県、富山市)

新家粧子、西村重徳、木元 久、草桶秀夫、大沼貴之、深溝慶、*Paenibacillus* sp. IK-5 キトサナーゼに存在するキトサン結合モジュール(DD1)の NMR 溶液構造とキトサン結合に関するアミノ酸残基、日本応用糖質科学会、2014 年 09 月 25、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター(新潟県、新潟市)

木元 久、平 修、植松宏平、片野肇、澱粉糖化菌およびセルロース糖化菌の単離、日本応用糖質科学会、2014 年 09 月 25、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター(新潟県、新潟市)

新家粧子、尾井宏美、大沼貴之、木元久、草桶秀夫、深溝 慶、オリゴ糖結合がキトサン結合モジュールの熱安定性へ及ぼす影響、第 28 回キチン・キトサンシンポジウム、2014 年 08 月 20 日、順天堂大学本郷キャンパス・センチュリータワー(東京都、文京区)

新家粧子、尾井宏美、大沼貴之、西村重徳、木元 久、草桶秀夫、深溝 慶、*Paenibacillus* sp. IK-5 キトサナーゼの CBM 32 キトサン結合モジュール-リガンド結合に関するアミノ酸残基-、関西グライコサイエンスフォーラム、2014 年 05 月 16 日、大阪市立大学 学術情報総合センター(大阪府、大阪市)

〔図書〕(計 1 件)

木元 久 他、建帛社、人と食と自然シリーズ 4 『食べ物とくすり -食の薬効を探る-』第 4 章 グルコサミン類の機能と新しい製造方法、2014、85

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

木元 久(KIMOTO, Hisashi)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：70283166