

「*Bacillus cereus* CH のキチナーゼ誘導時における

- シグナル伝達因子探索に関する研究」

生態環境科学専攻 環境分子生物学講座

博士課程 1 年 佐藤 禅 (指導教官: 荒木 義雄)

背景

節足動物や甲殻動物の外骨格として利用されているキチン・キトサンは地球環境にセルロースに次いで豊富に存在するバイオマスとして知られている。海洋そして土壌環境ではキチン・キトサンがバクテリアの分泌する加水分解酵素であるキチナーゼによって比較的容易に分解され、その分解産物が炭素・窒素源として多くの生物に利用されているが、その詳細は明らかにされていない。

加えて、キチン・キトサンは生難分解性の性質を併せ持つ物質として知られている。現在多量に廃棄されるカニ殻を埋め立て処理などで、処分しているがその残渣から腐敗臭を発生させるなどの新たな問題を生じさせており、より効率的な分解方法の開発が望まれる。

そこで強い非活性を有するユニークなキチナーゼを細胞外に分泌するバクテリア (*Bacillus cereus* CH)^{1, 2)}に着目し、効率的にキチンを分解したいと考えた。一過性のキチナーゼの生産ではなく、持続的でより効率的にキチナーゼを大量に生産する系を構築するために、今回は *B. cereus* CH におけるキチナーゼの誘導制御機構、特にシグナル伝達系に着目しそのシグナル伝達因子を検索する事を主たる目的とした。

方法

各種阻害剤を用い、カニ殻由来のキチン (コロイダルキチン) の分解阻害およびキチナーゼのシグナル伝達経路を確認した。その後、シグナル伝達に関与すると考えられる因子に対して特異的なプライマー - を設計し、RT-PCR を用い *mRNAs* の発現を確認し、シグナル伝達因子を検索した。

結果・考察

多量に廃棄されるカニ殻を実際に *Bacillus cereus* CH (以下、本菌) を用いて分解するためには、まず初めに本菌の分泌するキチナーゼによってカニ殻由来のキチンが分解されているか、否か確認する必要がある。そこでキチナーゼの誘導時に転写調節因子を阻害し、キチナーゼの分泌を阻害した後にキチンの分解に抑制が生じるか検討した。0.2% (w/v) のキチンのみを加えた寒天培地に本菌を接種すると細胞外にキチナーゼが分泌され、バクテリアの周囲にキチンを分解した時に生じるクリアゾーン (黒色部分) が観てとれる。一方キチンと共に阻害剤 (0.25 $\mu\text{g/ml}$) を加えたところ、クリアゾーンが形成されずキチンの分解が強く阻害された (図 1. 左および中央)。これらの結果から本菌の分泌するキチナーゼ

は、カニ殻由来のキチンを効率的に分解する事が示唆された。次に他のバクテリアでキチナーゼの誘導を制御する一つの経路として考えられている二分子制御系を、本菌において阻害してみた。キチンと共に二分子制御系の阻害剤(0.08 ug/ml)を加えたプレートでは、先程と同様にキチンの分解が強く阻害され、本菌のキチナーゼの誘導に二分子制御系が関与している可能性が考えられた(図 1. 右)。

さらに、その詳細を調べるため上述の阻害剤(0.08 ug/ml)を、0.2% (w/v)のキチンを加えた培養上清に加えキチナーゼの誘導に阻害が生じるか検討した。培養液にキチンのみを加えた上清では誘導が確認された(図 2. 左: 120, 144 h, バンドあり)が、阻害剤を共に加えた系では誘導が阻害された(図 2. 右: 120, 144 h, バンドなし)。図 1 および図 2 の結果から、本菌のキチナーゼの誘導は二分子制御系によって制御されている可能性が示唆された。

そこで、キチナーゼの誘導時に二分子制御系の *mRNAs* が発現しているのか、否かを確認する事で、この系の関与を確認した。他の異なるバクテリアで、キチナーゼの誘導時にその関与が報告されているレセプター遺伝子配列を鋳型に用い、相同性検索を行い、多数の結果を得た、その配列中でキチンオリゴ糖を認識する *Bacillus cereus* の遺伝子配列を選び出した。またシグナル伝達時にレセプター (ChiS like) と相互作用するレギュレーター (ChiR like) について、同様の作業を行なった。選び出したそれぞれの遺伝子配列に対して特異的なプライマ - を設計し、本菌の DNA を鋳型に用いプライマ - の特異性を確認した(図 3.)。増幅した遺伝子産物は、当初の予定通り約 0.5 kbp 付近に特異的なバンドが得られた事から、設計したプライマ - は特異的であると判断し、以下の RT-PCR で *mRNAs* の発現を確認した。

本研究では種々の誘導剤を用いたが、キチナーゼ B *mRNA* と共に、ある二分子制御系のレセプターおよびレギュレーター *mRNAs* を発現させた物は N-アセチルキトビオシドそしてコロイダルキンであった(図 4. 上段および下段)。以上の誘導剤ではキチナーゼ *mRNA* と平行して、ある二分子制御系の *mRNAs* が発現している事から、これらの *mRNAs* がキチナーゼ遺伝子の発現を制御している可能性が考えられた。

成果および今後の展望

本年度の目標である「シグナル伝達因子の検索」は、阻害剤を用いた実験および RT-PCR を用いた *mRNAs* の発現を確認する事によって、十分に達成されたと考えている。今後、本菌のキチナーゼの誘導機構が明らかにされれば、ユニークな特性を示す *Bacillus cereus* CH のキチナーゼを効率的生産する系を確立する事が可能であると考えられる。さらに、本研究によって示唆された、キチナーゼの二分子制御系による誘導制御機構を詳しく検討する事はキチナーゼの大量生産のみに寄与するだけでなく、地球環境における炭素・窒素循環の解明にも寄与できると思われる。今後、キチナーゼの誘導を制御していると考えられるこの系の遺伝子をクローニングし、その機能を確認後、多量に排出され新たな問題を引き起こしているカニ殻の効率的な分解を行なう系を検討していきたい。

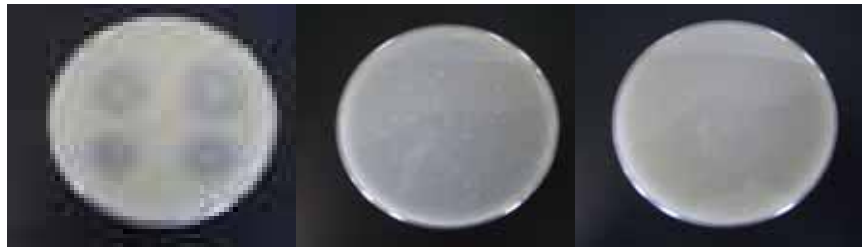


図1. 阻害剤によるキチン(コロイダルキチン)の分解阻害

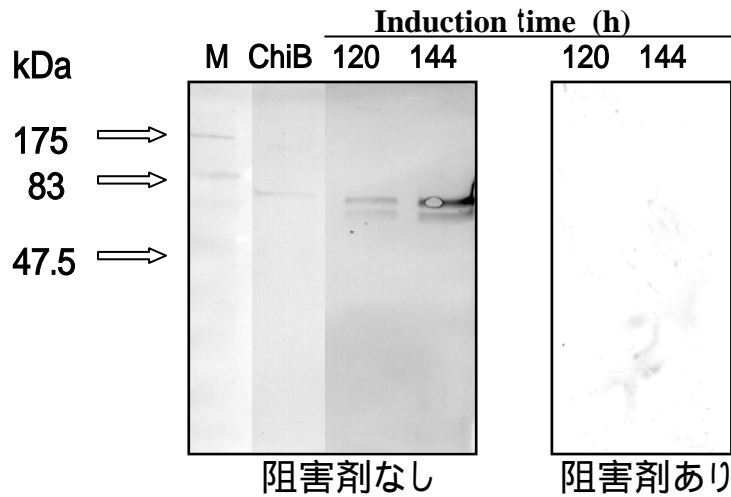


図2. 培養上清のキチナーゼの免疫染色

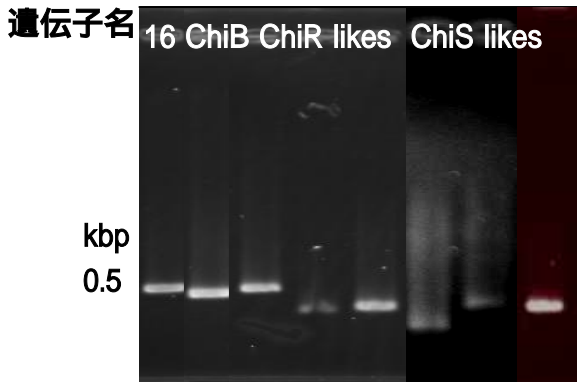


図3. プライマ - の特異性の確認

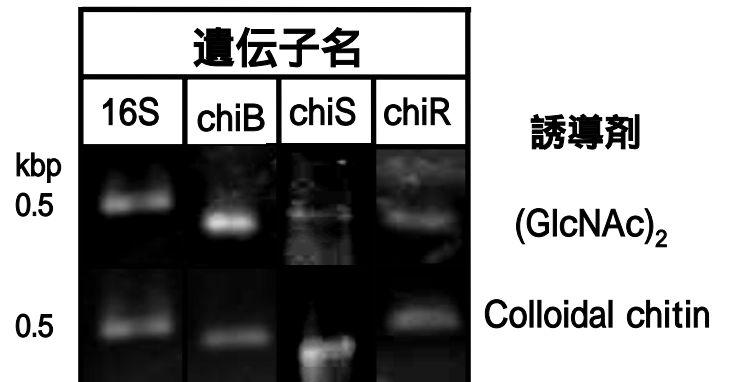


図4. 誘導開始後48 hのmRNAsの発現

学会発表

Yuzuru Sato, Yoshio Araki., Studies on expression levels of *mRNAs* related to the regulatory function in chitinase induction of *Bacillus cereus* CH. The 77th annual meeting of Japanese Biochemical society.

参考文献

- 1) Mabuchi, N., Hashizume, I., and Araki, Y., Characterization of chitinase exerted by *Bacillus cereus* CH. *Can. J. Microbiol.*, 46, 370-375 (2000).
- 2) Mabuchi, N., and Araki, Y., Cloning and sequencing of two genes encoding chitinase A and B from *Bacillus cereus* CH. *Can. J. Microbiol.*, 47., 895-902 (2001).