

## 第5章 総合考察

本研究では、土壌中の主要なキチン分解細菌である*Streptomyces*属放線菌のキチン分解機構を明らかにすることを目的として、キチナーゼ遺伝子の構造と発現制御について研究を行った。第2章では、*S. lividans*を対象として、発現制御機構を解明するために、キチナーゼ生産変異株の取得とそれらの株の解析を行った。第3章では、*S. lividans*の近縁種であり、染色体整列ライブラリーが作成された*S. coelicolor*を対象として、1株の*Streptomyces*属放線菌の有するキチナーゼ遺伝子の全貌を明らかにするために、キチナーゼ遺伝子のクローニングと解析を行った。また、第4章では、*S. coelicolor*の有するキチナーゼ遺伝子の発現誘導の解析をノーザンハイブリダイゼーションによって転写レベルで行った。それらの解析から得られた知見をまとめると以下ようになる。

(1) *S. lividans* TK24株のキチナーゼ生産におけるグルコース抑制は、キチナーゼ遺伝子の転写のレベルで行われており、キチナーゼ遺伝子の転写のグルコース抑制にはグルコースキナーゼ遺伝子 (*glkA*) が関与する。しかし、*S. coelicolor* J1501株のキチナーゼ生産におけるグルコース抑制には*glkA*は関与しない。(第2、3、4章)

(2) *S. coelicolor* M145株は、異なった7つのキチナーゼ遺伝子を有し、これらの7つのキチナーゼ遺伝子は、*Streptomyces*属放線菌を通じて、広く分布する。  
(第3章)

(3) *S. coelicolor* M145株の有するキチナーゼ遺伝子のうち、少なくとも*chiA*、*chiB*、*chiC*、*chiD*、*chiF*の5つの遺伝子は、コロイダルキチンの存在下で転写が誘導される。また、遺伝子の発現時期は、これら5つの遺伝子で同一で、コロイ

ダルキチンの添加後4時間後に最大となる。コロイダルキチンの添加による発現誘導が確認されたこれらの5つのキチナーゼ遺伝子は、キトビオースによっても転写が誘導される。(第4章)

#### 5-1 キチン分解のメカニズムについて

*S. coelicolor*は、異なった7つのキチナーゼ遺伝子を有し、このうち、2つはファミリー19キチナーゼ遺伝子であり、残りの5つはファミリー18キチナーゼ遺伝子である。また、これらの両ファミリーに属するキチナーゼ遺伝子は、*Streptomyces*属放線菌を通じて広く分布する。ファミリー18キチナーゼとファミリー19キチナーゼは、進化的に全く異なるものとされており、キチン分解における切断部位にも相違がある。すなわち、ファミリー18キチナーゼは、GlcNAc-GlcN間を切断できるが、GlcN-GlcNAc間を切断できない。逆に、ファミリー19キチナーゼは、GlcN-GlcNAc間を切断できるが、GlcNAc-GlcN間を切断できない。自然界に存在するキチンは、様々な程度で脱アセチル化され、糖鎖の中にGlcNを含んでいる。*Streptomyces*属放線菌は、ファミリー18とファミリー19キチナーゼを生産することによって、様々な程度に脱アセチル化されているキチンを効率よく完全に分解しているものと考えられる。

また、*S. coelicolor*は、基質結合ドメインをもつキチナーゼをコードする遺伝子(ChiA、ChiB、ChiC、ChiE、ChiF)と基質結合ドメインをもたないキチナーゼをコードする遺伝子 (ChiD、ChiG)を有する。*Bacillus circulans*のChiA1に関する研究から、基質結合ドメインは、キチナーゼのコロイダルキチンの効率的な分解に重要であることが示されている(Watanabeら、1994)。*S. coelicolor*の有する基質結合ドメインをもたないキチナーゼChiDやChiGは、キチン分解において、主にキチンの親水的な部分や、キチンオリゴ糖の分解に関わっていると考え

られる。また、基質結合ドメインを有するキチナーゼは、キチンの疎水的な部分や、構造の強固な部分の分解に関わっていると考えられる。

以上のように、*S. coelicolor*は、触媒ドメインの一次構造やドメイン構造が全く異なる複数のキチナーゼを生産することによって、効率的にキチン分解を行っていると考えられる。これらの多様なキチナーゼのキチン分解におけるそれぞれの役割を酵素学的に明らかにしていくことは、今後の課題であり、*S. coelicolor*のキチナーゼの多重性の重要性を指摘していくうえで重要である。

これまでに知られている*Streptomyces*属放線菌由来のキチナーゼは、ファミリー18および19のいずれも、キチン分解における最終産物は、二量体であるキトビオースであり、副産物として若干量のGlcNAcが生じる。*S. coelicolor*をはじめとする*Streptomyces*属放線菌は、多様なキチナーゼを生産することによって、キチンを完全に分解し多量の二糖類〔主としてGlcNAc-GlcNAc (キトビオース)〕と、若干量の単糖 (主としてGlcNAc) が生じるものと考えられる。

## 5-2 キチンの代謝経路とキチナーゼ生産の誘導

*Streptomyces*属放線菌によるGlcNAcの代謝系は、大腸菌の場合と同様に考えると、細胞内に取り込まれた後、リン酸化、脱アセチル化、および脱アミノ化され、フルクトース-6-リン酸となって、解糖系によって代謝されることが予想される。*S. lividans*のキチンおよびGlcNAc資化能欠損変異株G017は、これらの想定されるGlcNAc代謝系のうち、GlcNAcリン酸化酵素、あるいは、GlcNAc-6-リン酸脱アセチル化酵素が欠損していると考えられる (Fig. 5-1)。*Streptomyces*属放線菌のキトビオース代謝は、キチン分解細菌である*Vibrio furnisi*と同様に考えると、細胞内に取り込まれた後、加水分解酵素、キトビアーゼによってGlcNAcに分解され、以後は、上記の通りの変換を受けた後、解糖系によって代

謝されると考えられる (Fig. 5-1)。

Miyashitaら (1998) は、*S. lividans*のキチナーゼ遺伝子のうちの1つである *chiA*の発現誘導の直接的な誘導物質は、キトビオースであることを示している。*S. coelicolor* では、コロイダルキチンの存在下で同時期に転写が確認された *chiA*、*chiB*、*chiC*、*chiD*、*chiF*の5つのキチナーゼ遺伝子の転写がキトビオースによって誘導されることから、これら5つのキチナーゼ遺伝子についても、直接的な発現誘導物質がキトビオースであると考えられる。

*S. coelicolor*の *chiE*、*chiG*および *chiG*の上流に存在するORF (キチン結合タンパク質遺伝子に相同性を示す) の転写産物は検出されなかったが、それらのプロモーター配列に相同性が高いプロモーターを有する *S. olivaceoviridis*の *chi01*および *cpb1*に関する研究から、*chiE*や *chiG*の上流に存在するORF、ならびに *chiG*も、発現レベルは低いものの、コロイダルキチンやキトビオースによって、発現が誘導される可能性が考えられた。

### 5-3 キチナーゼ遺伝子発現のグルコース抑制

*S. lividans*のキチナーゼ生産は、キチンの存在下で誘導され、グルコースの共存下で抑制される (Miyashitaら、1991)。本研究では、*S. lividans* のキチナーゼ生産変異株G015を解析した結果、G015株は、グルコースキナーゼ遺伝子 (*glkA*) 変異株であり、*S. lividans*のキチナーゼ生産のグルコース抑制には、*glkA*遺伝子が関与することが示された。また、*S. coelicolor*の *chiA*、*chiB*、*chiC*、*chiD*、*chiF*をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションの結果、*S. lividans* は、それらの5つの遺伝子のホモログを有していることが示された。さらに、*S. coelicolor*のそれら5つのキチナーゼ遺伝子のアンチセンスRNAプローブを用いて、*S. lividans* G015株および親株TK24についてノーザンハイブリダイゼーションに

よる解析を行った結果、*glkA*変異株におけるキチナーゼ生産のグルコース抑制の解除が転写のレベルで起こっていることが、発現が確認された5つのキチナーゼ遺伝子で確かめられた。

これに対し、*S. coelicolor*の*glkA*変異株のキチナーゼ生産を調べた結果から、*S. coelicolor*のキチナーゼ生産のグルコース抑制には、*glkA*が関与しないことが示唆された。*S. coelicolor*と*S. lividans*は、16S rRNA遺伝子の塩基配列に基づく系統においても極めて近縁であり（Kataokaら、1997）、また、極めて相同性の高いキチナーゼ遺伝子（*chiA*、*chiB*、*chiC*）を有する。この点を考えると、キチナーゼ生産のグルコース抑制における*glkA*遺伝子の関与に関して、*S. coelicolor*と*S. lividans*で相反する結論が得られたことは、非常に興味深い点である。

#### 5-4 キチナーゼ遺伝子の発現制御のモデル

本研究と、これまでに*Streptomyces*属放線菌由来のキチナーゼに関する研究で得られた知見をもとに考えられる、キチナーゼ遺伝子の発現制御についてのモデルをFig. 5-1に示した。菌体外にキチンが存在する場合、構成的に低いレベルで生産されるキチナーゼによって、キチンが分解され、キトビオースが生成し、それによって、触媒ドメインの一次構造およびドメイン構造において多様である複数のキチナーゼ遺伝子の発現が誘導されることが考えられる。発現したキチナーゼは、菌体外に分泌され、キチンに吸着し、それぞれのキチナーゼの基質特異性を相補しつつ、効率的にキチンを分解し、キトビオース（GlcNAc-GlcNAc）とN-アセチルグルコサミン（GlcNAc）を最終産物として生成する。これらのキトビオースとGlcNAcは、細胞内で代謝され、炭素源あるいは窒素源として資化される。一方、培養液中に、キチンとともにグルコースが存在する場合、*S. lividans*では、GlcAタンパク質が関与するメカニズムによって、キチナーゼ遺伝子の発現

は抑制される。*S. coelicolor*では、キチンとともにグルコースが存在する場合、GlcAタンパク質が関与しない*S. lividans*とは異なるメカニズムによって、キチナーゼ遺伝子の発現が抑制される。

#### 5-5 キチナーゼの生理的機能について

一般に、細菌のキチナーゼは、細胞外に存在するキチンを栄養源として資化することを目的として、キチンを加水分解することがその機能であるとされている。細菌がキチンを生体成分としてもつことを明確に示した例がこれまでに存在しないことは、キチナーゼが、その他の生理的機能を有することを考えにくくしている一つの大きな要因である。

*S. coelicolor*の有する7つのキチナーゼ遺伝子のうち、5つの遺伝子に関しては、コロイダルキチンの存在下で、転写が誘導されたことから、それらの産物は、キチンの分解、資化に関与していることが推定される。その他の2つのキチナーゼ遺伝子については、コロイダルキチンの存在下での転写誘導は確認されなかったが、プロモーター領域の塩基配列から、やはり、キチンの分解、資化に関与している可能性が考えられた(4-3-1参照)。

しかし、その一方で、これらのキチナーゼ遺伝子の産物が、その他の生理的機能も有する可能性も考えられる。Smuckerら(1978)は、*S. coelicolor*の胞子の外壁成分として、キチンが含まれていることを示唆している。したがって、*S. coelicolor*の胞子の発芽においてキチナーゼが、重要な役割を果たしている可能性が考えられ、それを確認することは、キチナーゼの生理的機能を知るうえで、極めて重要であり、興味深い点である。

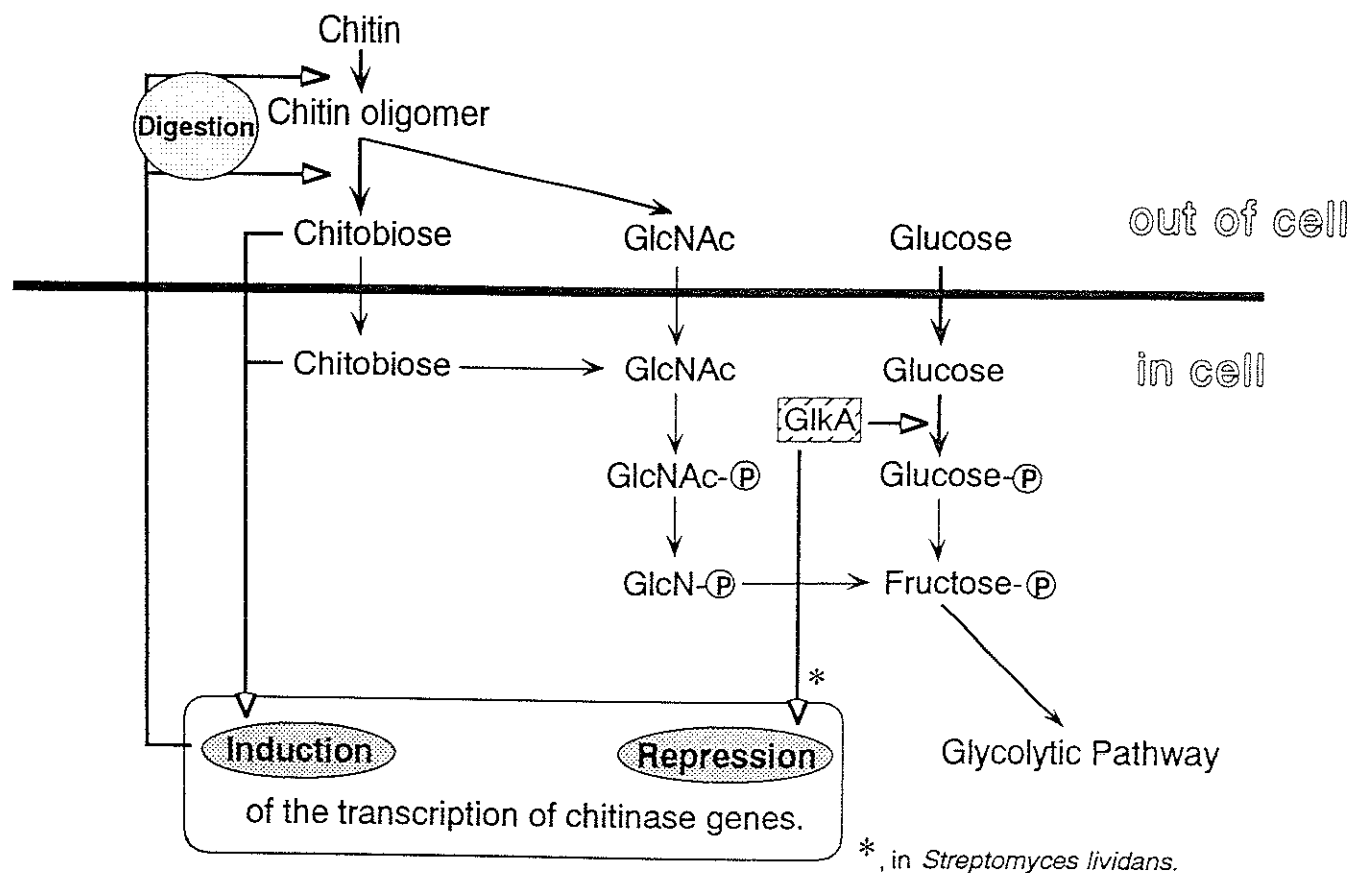


Fig. 5-1. Proposed model of chitin metabolism and transcriptional regulation of chitinase genes in *Streptomyces*. GlcNAc, GlcN, and P indicate *N*-acetylglucosamine, glucosamine, and phosphoryl group, respectively. When chitin is present in medium, chitin is degraded into chitobiose and GlcNAc by chitinases. The chitobiose then induces the transcription of chitinase genes. Chitinases are secreted and digest chitin to chitobiose and GlcNAc. In *Streptomyces lividans*, when glucose coexists with chitin, the transcription of chitinase genes is repressed by a mechanism involving GlkA protein.