

令和元年5月31日現在

機関番号：63903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18429

研究課題名(和文) 高速高精度一分子観察による結晶性糖質分解機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of degradation mechanism of crystalline carbohydrates by high speed and precision single molecule observation

研究代表者

中村 彰彦 (Nakamura, Akihiko)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・助教

研究者番号：20752968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：キチン加水分解酵素は甲殻類や昆虫の外骨格を構成する結晶性キチンを効率的に分解する酵素である。結晶性キチンを効率的に分解する酵素は、結晶表面を運動することが知られていたが運動機構は不明であった。本研究の1分子計測の結果、キチン加水分解酵素はキチン分子鎖を短く切断する事により後退運動を抑制し熱的揺らぎによる運動の方向性を制御していることがわかった。この成果により運動機構ベースの酵素改変が可能となると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの運動する酵素は細胞内でATPなどの高エネルギー化学物質をエネルギー源として運動することが知られている。しかし今回の研究で、キチン加水分解酵素は細胞外で長いキチン分子鎖を短い2糖単位に切断し可溶化する際の変化で運動していることが明らかとなった。これは分子の運動メカニズムの解明に非常に有意義な成果である。また運動機構を考慮するとキチン分解酵素での反応で生成物を取り除くことが効率的な分解に重要であると考えられ、分解反応系の効率化にも有意義な結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Chitin hydrolase (Chitinase) degrade the chitin crystal which is the main component of outer shell of insects or crabs. Chitinase which has a good activity to crystalline chitin moves on the surface, but moving mechanism is still unknown. In this research, we revealed that chitinase move forward due to the destabilization of backward state by the hydrolysis of molecular chain. Our findings will be helpful to design the better mutants.

研究分野：酵素学

キーワード：キチナーゼ セルラーゼ バイオマス 1分子計測

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カビ、キノコやバクテリアが主に生産する糖質加水分解酵素で、植物の細胞壁や昆虫の外骨格を形成するセルロースやキチンを分解する酵素(セルラーゼ及びキチナーゼ)は生物由来資源からの有用物質の生産の観点で注目を集めている(Ragauskas A.J. et al, Science, 2006, Yan N. et al. Nature, 2015)。これらの酵素は溶媒中から固体のセルロースやキチンの表面へ吸着して分解反応を行う、不均一系で反応する酵素である。その為バルク状態での生化学測定では実際に分解反応を行っている酵素の定量ができず詳細な解析に限界があった。そして近年、高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)を用いた 1 分子測定技術によりこれらの酵素が分子モーターである事が明らかとなり、ATP などの外部からのエネルギー源を必要とせずに運動する珍しいモーター酵素であることが分かった(Igarashi K. et al, Science, 2011, Nat. commun. 2014)。主要生成物であるセロビオース又はキトビオースの大きさが 1 nm で有る事から、これらの酵素は 1 nm 程度の歩幅(ステップ幅)で運動を行うと考えられている。しかしその運動においてどのような律速段階が存在するかなど、運動特性の詳細は明らかにされていない。その理由として、酵素 1 分子の 1 nm の運動の観測と解析が難しい事がある。それに加えセルラーゼの運動速度が 10 nm/sec 程度であるのに対し、キチナーゼの運動速度は 80 nm/sec と非常に速い。同じく生化学的活性もキチナーゼの方が高い事から、この違いの理由を明らかにする事で高活性のセルラーゼの設計に有用な知見が得られると考えられる。

2. 研究の目的

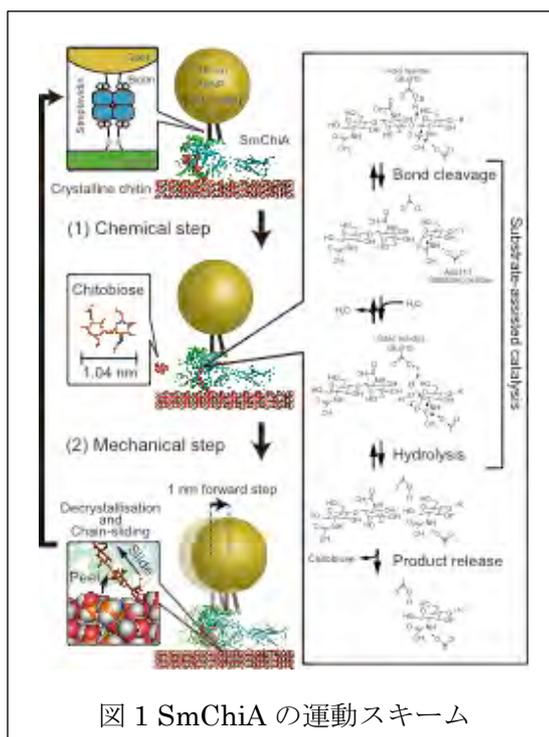
本研究では金コロイドでラベルしたセルラーゼ及びキチナーゼの酵素 1 分子の運動を、全反射暗視野顕微鏡と高速カメラを用いて高い位置決定精度とフレームレートで観測する。これにより 1nm と予想されるキチナーゼのステップ運動を直接計測し、ステップ運動の反応素過程の時定数を解析する。セルラーゼやキチナーゼの運動メカニズムを解明し、運動の律速段階や固体基質の表面で効率的に反応する為に必要な酵素の性質とは何かを明らかにすることで、高活性を有するセルラーゼ、キチナーゼや自発的に運動できる省エネルギー型新規人工モーター酵素の設計指針を得る事を目指した。

3. 研究の方法

直径 40nm の金ナノ粒子の表面を、チオール基を介して PEG で修飾した。またその一部にビオチン修飾されている PEG を混合し表面のビオチン化を行った。更にビオチンに対してストレプトアビジンを結合させることで観測用のプローブとした。セラチア菌由来キチナーゼ(SmChiA)は 2つのフリーシステイン残基を導入し、マレイミド基を介してビオチン修飾を行った。修飾金ナノ粒子とキチナーゼを混合して結合させた後に、ガラス表面にキチン結晶を固定化したフローセルに導入し運動分子の観測を行った。運動している分子については、画像に対して 2次元のガウスフィットを行い各フレームでの中心位置を決定してその時間移動を解析した。得られたトラジェクトリーに対してステップ検出アルゴリズムを適用してステップ運動の検出をおこない、ステップサイズとステップ前の停止時間の分布を解析した。また基質酵素複合体構造を不安定化させた変異体の結晶を作成し、キチンオリゴ糖をソークした X 線結晶構造を解析した。

4. 研究成果

直径 40 nm の金コロイドをガラス表面に固定化し、532 nm レーザーを導入した全反射暗視野顕微鏡を用いてその位置決定精度を計測したところ 0.5 ms で 0.3 nm 程度であった。すなわちこのシステムであれば SmChiA の 1 nm ステップ運動を計測可能であると考えられた。そこで実際に金ナノ粒子で標識した SmChiA の運動計測を行った(図 1)。一方向に運動する分子が観測できたため、その運動軌跡を解析した(図 2)。酵素自身のゆらぎに由来するノイズの低減のため 2 ミリ秒分の中央値を計算し解析に用いた。運動を分類すると大きく 3 つに分けられた。一つは最も多く観測された連続的な前進運動であり、また他の 2 つとして前進運動とは逆方向に動く後退運動と後退状態から再び連続的な前進状態に戻る復帰運動が観測された(図 3)。これらの運動について別々にステップサイズと停止時間の分布を解析した。まずステップサイズの分布は前進方向と後退方向にどちらも 1.1 nm にピークを示した。すなわち主生成物であるキトビオース単位を認識して運動していることが確認できた(図 4)。面積値から計算された前進運動と後退運動の割合は



83.5% : 16.5%であり前進方向に偏っていることが分かった。次に前進運動の停止時間分布は一つのピークを持つ指数関数的減衰の差で回帰することができた(図5)。得られた時定数がどのような反応と対応しているのか調べるため、重水中での計測も行った。その結果 2.9 ミリ秒の時定数が 3.5 倍長くなり、反応速度論的同位体効果が強く出た。よって短い時定数が加水分解反応を含んでいると考えられた。また後退運動と復帰運動についてはどちらも同程度の時定数であった。すなわち前進状態と後退状態では系全体の自由エネルギーが同程度であることが示唆された。すなわち SmChiA の運動は安定な前進状態に向かって進んでいるわけではないことが分かった。そこで前進運動が可能な理由を探るため得られた反応時定数をまとめて比較すると、触媒反応と後退運動が基質酵素複合体状態からの競合反応であることが分かった。この場合反応の比率は反応速度定数の比となる。計算された触媒反応の割合は 86.3%であり、前進運動の割合と同じであった。すなわち分解反応が起こると前進運動につながると考えられる。しかし後退運動と復帰運動が加水分解と関係なく起こること考えると、加水分解時に得られるエネルギーで前進しているわけではない事がわかる。実際に運動中間状態の SmChiA の X 線結晶構造では酵素自身の形は基質がない状態と同じであった。つまり SmChiA はパワーストロークメカニズムのように加水分解のエネルギー等によって構造変化を誘起して運動しているわけではなく、熱的ゆらぎで運動するブラウニアンラチェットであることを示唆している。SmChiA の加水分解反応後にはキトビオース単位が末端から取り除かれる。すなわち後退状態と同じ結合状態に変化する。これは次の前進状態と新たな平衡状態と考えられ、無理なく前進運動が可能となる。すなわちキチン分子鎖を短くすることで後退運動を阻害し、結果として前進方向にバイアスを生み出している。これらの結果から SmChiA が Burnt-bridge ブラウニアンラチェットモーターであることを明らかにできた。

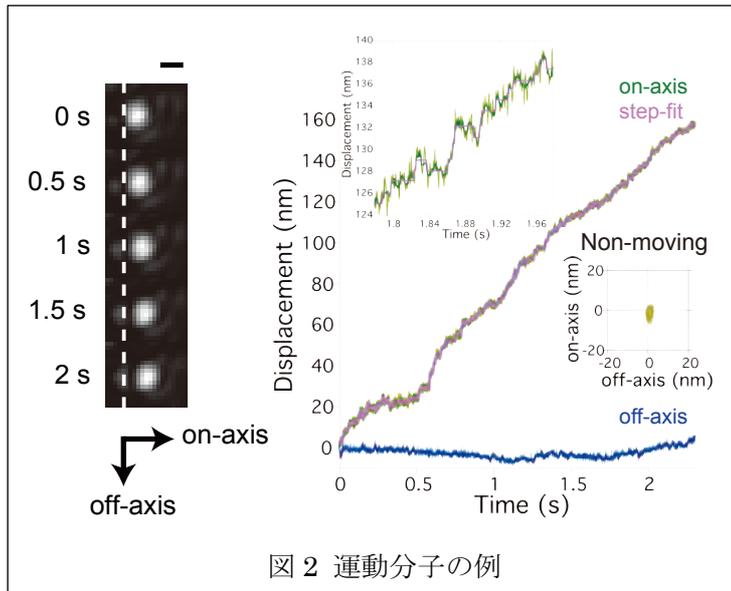


図2 運動分子の例

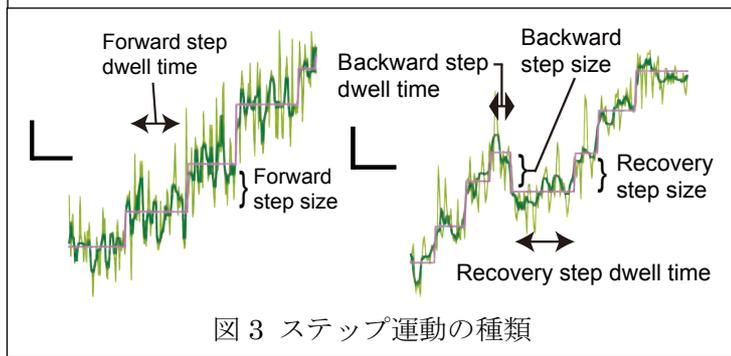


図3 ステップ運動の種類

同じであった。すなわち分解反応が起こると前進運動につながると考えられる。しかし後退運動と復帰運動が加水分解と関係なく起こること考えると、加水分解時に得られるエネルギーで前進しているわけではない事がわかる。実際に運動中間状態の SmChiA の X 線結晶構造では酵素自身の形は基質がない状態と同じであった。つまり SmChiA はパワーストロークメカニズムのように加水分解のエネルギー等によって構造変化を誘起して運動しているわけではなく、熱的ゆらぎで運動するブラウニアンラチェットであることを示唆している。SmChiA の加水分解反応後にはキトビオース単位が末端から取り除かれる。すなわち後退状態と同じ結合状態に変化する。これは次の前進状態と新たな平衡状態と考えられ、無理なく前進運動が可能となる。すなわちキチン分子鎖を短くすることで後退運動を阻害し、結果として前進方向にバイアスを生み出している。これらの結果から SmChiA が Burnt-bridge ブラウニアンラチェットモーターであることを明らかにできた。

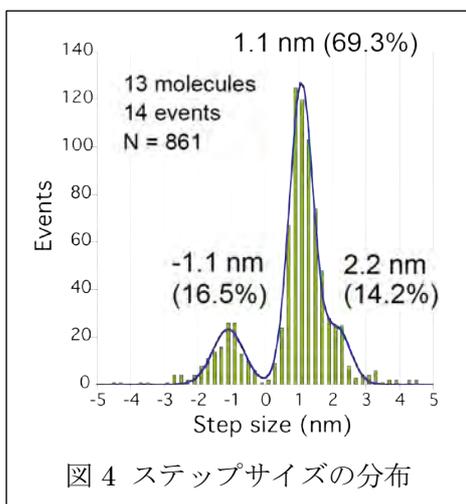


図4 ステップサイズの分布

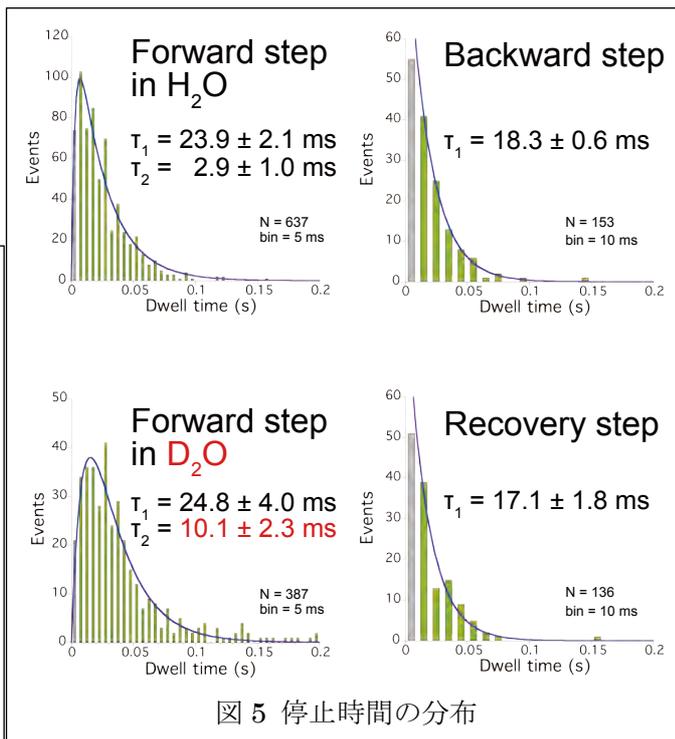


図5 停止時間の分布

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- ① ***A. Nakamura**, *R. Iino (他 3 名, 1 番目), Processive chitinase is Brownian monorail operated by fast catalysis after peeling rail from crystalline chitin, *Nature Communications*, 9, 3814 (2018), doi: 10.1038/s41467-018-06362-3, 査読あり.
- ② **A. Nakamura**, *R. Iino (他 11 名, 1 番目), Rate constants, processivity, and productive binding ratio of chitinase A revealed by single-molecule analysis, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20, 3010-3018 (2018), doi: 10.1039/c7cp04606e, 査読あり.
- ③ ***Akihiko Nakamura**, Ryota Iino, Visualization of functional structure and kinetic dynamics of cellulases, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1104, 201-217 (2018), doi: 10.1007/978-981-13-2158-0_10, 査読あり.

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ① **中村 彰彦**, キチン加水分解酵素は ATP を使わずに運動するブラウンアンラチェットである分子モーター討論会, (2018)
- ② **Akihiko Nakamura**, Processive chitinase is Brownian ratchet moving unidirectionally by fast catalysis, Sendai Molecular Motor Meeting 2018, (2018).
- ③ **中村 彰彦**, キチン加水分解酵素は速い加水分解でブラウン運動を制御する, 多糖の未来フォーラム, (2018)
- ④ **Akihiko Nakamura**, Direct observation of 1 nm steps of a “burnt - bridge” Brownian ratchet SmChiA on crystalline chitin with gold nanoprobe, The 79th Okazaki Conference Synthetic, Biological, and Hybrid Molecular Engines, (2018)
- ⑤ **Akihiko Nakamura**, Resolving 1 nm steps of a Brownian-ratchet chitinase with gold nano particle, International Symposium on Molecular Science - Physical Chemistry / Theoretical Chemistry, Chemoinformatics, Computational Chemistry - Cosponsored by Japan Society for Molecular Science, (2018)
- ⑥ **中村彰彦**, 1 分子解析によりセルラーゼ/キチナーゼの何が見えるのか, セルラーゼ研究会, (2017)
- ⑦ **Akihiko Nakamura**, Direct Observation of 1 nm Steps of Chitinase A Molecules with Gold Nano Probes, Gordon Research Conference Cellulosomes, Cellulases & Other Carbohydrate Modifying Enzymes, (2017)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：岡崎 圭一

ローマ字氏名：(Okazaki, Kei-ichi)

研究協力者氏名：飯野 亮太

ローマ字氏名：(Iino, Ryota)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。