

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03094

研究課題名（和文）海洋微生物由来の糖質分解酵素に特徴的なダブル吸着ドメイン構造の1分子機能解析

研究課題名（英文）Single molecule analysis of carbohydrate degrading enzyme with double binding domains from marine bacterium

研究代表者

中村 彰彦（Nakamura, Akihiko）

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：20752968

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：海洋性バクテリア由来のキチン分解酵素は、陸上バクテリア由来の酵素のC末端側に追加の吸着ドメインが付加している。そこでビブリオ菌由来キチン分解酵素の全長と追加ドメインを削除した変異体で生化学的活性を比較したところ、全長酵素はキチンへの高い親和性を示した。1分子蛍光計測で計測した2つの酵素の脱着速度を比較すると、吸着速度定数はほとんど変化がなかったのに対し、全長酵素では非常に長くキチンへの吸着をすることがわかった。また追加の吸着ドメインのみでもキチンへの特異的な吸着が計測できた。2つの吸着ドメインによるキチンへの長い吸着は、酵素の解離拡散を防ぎ、海洋中での反応に有利であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海中には大量の微細甲殻類が生息しており、その殻としてキチンの年間生産量は14億トンと推計されている。この大量のキチンは海洋性バクテリアによって分解され、海洋中での炭素循環が成り立っている。本研究で海洋中バクテリアに特異的なキチン分解酵素はキチンに吸着する部位を1つ多く持つことで、海洋中でもキチンから離れにくくなり効率的な分解が行えることを明らかにした。この海洋環境での結晶キチン分解システムは、薄い基質濃度化での固体バイオマス分解や海洋環境中に散らばっている微細プラスチック片の分解除去に有用な知見となる。

研究成果の概要（英文）：Chitinases from marine bacteria have an additional adsorption domain on the C-terminal side of enzymes from terrestrial bacteria. Comparison of the biochemical activities of the full-length *Vibrio* chitinase and a mutant enzyme with the additional domain removed showed that the full-length enzyme has a high affinity for chitin. The full-length enzyme adsorbed on chitin for a very long time, while the binding rate constants of the two enzymes were similar. The long adsorption on chitin with two adsorption domains may prevent dissociation and diffusion of the enzyme, which may be advantageous for reactions in the ocean.

研究分野：生物物理学

キーワード：キチン加水分解酵素 ビブリオ菌 1分子計測 糖質吸着ドメイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

キチンは甲殻類の外骨格や真菌細胞壁に含まれる多糖であり、植物が生産しているセルロースに次ぐ、生体由来資源である。ただしキチンはセルロースと同様に分子鎖が規則正しく並んだ結晶構造を取り、物理化学的に非常に安定である。そのためキチン栄養源として生育可能な菌はキチン加水分解酵素を生産し、効率的に結晶構造を分解する。最も良く研究されているキチン分解酵素は陸上のバクテリア *Serratia marcescens* 由来キチナーゼ A (SmChiA) であり、分子鎖を加水分解しながら、還元末端側から非還元末端側へ結晶性キチン表面で 1 方向性の運動を行うことが知られている。またその運動メカニズムは burnt-bridge ブラウニアンラチェット機構であることも判明している。その一方で、海洋中では多数生息する微細甲殻類由来のキチンが最も多い生体由来資源であり、キチン資化性バクテリアがその分解を担っていることが知られている。特にビブリオ属の細菌は多くの場所で発見されており、またキチン分解物の認識機構やそれによるキチン分解酵素遺伝子の発現誘導機構などの研究が報告されている。しかしビブリオ菌の生産するキチン分解酵素の特性については報告例が少ない。

ビブリオ菌の中で、腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) についてはキチン分解酵素の遺伝子発現プロファイルの報告がある。特にキチン分解酵素遺伝子の中で、恒常的に発現しておりかつキチン分解物を認識した際に発現量が上昇するキチナーゼ 1 遺伝子 (VpChi1) が見つかっている。この遺伝子発現量の動きから、VpChi1 はキチンの初期分解及び主要なキチン分解に関わっていると考えられる。しかしそのキチン分解特性については不明であった。そこで VpChi1 について、そのアミノ酸配列を解析したところ SmChiA よりも C 末端側が長いことが判明した。そこでその構造を予測したところ、VpChi1 では SmChiA と同じ糖質加水分解酵素ファミリー 18 に分類されるキチン分解ドメインとキチン吸着ドメインに加え、C 末端側にフィブロネクチン Type3-like (FN3) ドメイン 2 つと糖質吸着モジュールファミリー 5 に分類される吸着ドメインが付加していることが判明した。すなわち VpChi1 にはキチン吸着ドメインが 2 つ存在している可能性が判明し、SmChiA とはキチンへの吸脱着特性が異なっていると考えられた。

2. 研究の目的

海洋性キチン資化細菌由来 VpChi1 と陸上キチン資化細菌由来 SmChiA で最も異なっている、追加の吸着ドメインがキチンへの吸着及び脱着に対して与える影響の調査を目標とした。それにより生息環境の異なる 2 つの微生物由来の酵素の機能の違い、及び特に海洋環境中でのキチン分解に求められる酵素の性質について明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

まず VpChi1 類縁酵素と SmChiA 類縁酵素を NCBI のブラスト検索で探索した。これにより VpChi1 特異的な配列を有する酵素遺伝子と、それを持たない陸上バクテリア由来酵素により似ている酵素遺伝子配列の収集を行なった。アミノ酸配列に変換後、シグナル配列の報告されている酵素についてはその情報を用い、情報のない酵素については SignalP サーバーでの予測に基づきシグナル配列部分の削除をおこなった。収集した配列について Clustal Omega サーバーを用いてマルチプルアライメントを行い、その結果に基づき系統樹を作成した。

次に VpChi1 の全長及び C 末端の追加吸着ドメインを削除した変異体 (VpChi1-del) について、大腸菌を宿主として発現させ精製を行なった。精製した VpChi1 と VpChi1-del について結晶性キチン分解活性の基質濃度依存性を比較した。VpChi1-del については X 線結晶構造解析を行った。

分解活性の違いについて理解するために、VpChi1、VpChi1-del については高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) を用いてキチン結晶上での運動速度の解析を行なった。また VpChi1、VpChi1-del 及び C 末端の FN3 ドメインと吸着ドメインについてフリーシステインを導入した変異体を作成し位置特異的に蛍光色素で標識した。表面をアルカリ洗浄したスライドガラス上にキチン結晶をスピコートし、全反射蛍光顕微鏡にセットした。ガラス上に希釈した標識酵素 (20-40 pM) を滴下し、酵素分子 1 つ 1 つの蛍光シグナルの録画をおこなった。その後 10 nM の酵素液を滴下することでキチン表面を酵素で覆い、キチン結晶の蛍光像を取得した。蛍光シグナルの動画とキチン結晶染色像を重ね合わせ、キチンに吸着していた酵素分子のシグナルについて、単位時間及び単位キチン長さ辺りの吸着分子数とそれぞれのシグナルの持続時間の解析を行なった。吸着速度定数はガウス分布の重ね合わせとして回帰し、最も小さい値を取る分布についてキチン結晶一つあたりに対する吸着速度として定義した。また吸着時間の分布は指数関数的減衰の重ね合わせとして回帰し、減衰速度から解離速度定数を求めた。

4. 研究成果

SmChiA 及び VpChi1 と類似している GH18 ファミリーキチナーゼ配列は 303 個集めることができた。これに Outgroup として同じ GH18 ファミリーに分類されているが運動方向が逆である *Serratia marcescens* 由来キチナーゼ B (SmChiB) を加え、マルチプルアライメントを作成した。作成したアライメントをもとに系統樹を作成したところ、VpChi1 を含む海洋バクテリア由来の

グループと SmChiA を含む陸上バクテリア由来のグループに明確に分かれることがわかった(図1)。すなわち VpChi1 に見られた C 末端側の FN3 ドメインと糖質吸着ドメイン(図2)は海洋性バクテリアのキチン分解酵素に特異的な構造であり、陸上バクテリア由来のキチン分解酵素には存在しないことが明らかになった。

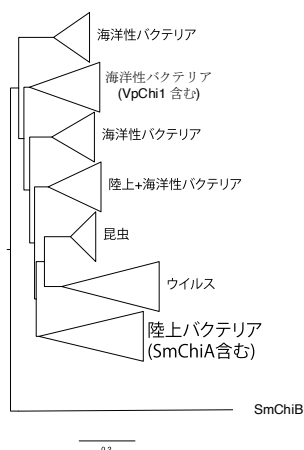


図1 VpChi1 及び SmChiA

類縁酵素系統樹

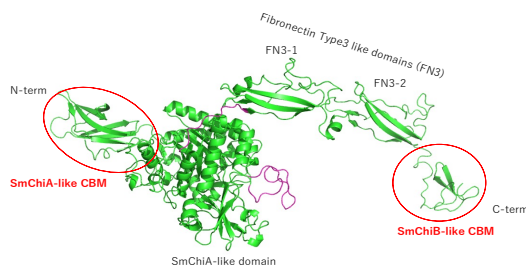


図2 VpChi1 の予測構造

VpChi1 と VpChi1-del はどちらも大腸菌で可溶タンパク質として生産できた。VpChi1 は N 末端側と C 末端側の両方にキチン吸着ドメインが存在しており、精製用のタグを付加すると吸着に影響を及ぼすと考えられたため、天然のシグナルペプチドを使用し、大腸菌培養液の培地に分泌されてくる酵素を濃縮して精製した。疎水性相互作用カラム、陰イオン交換カラム及びサイズ排除クロマトグラフィーカラムにより精製することができた。VpChi1-del は C 末端側に TEV プロテアーゼ認識サイト及び His-tag を付加し、Ni-NTA カラムで精製したのちに脱塩を行い、TEV プロテアーゼで His-tag を除去して Ni-NTA に未吸着となったタンパク質を回収した。その後サイズ排除クロマトグラフィーにより精製することができた。2つの酵素についてキチン分解活性の基質濃度依存性を比較したところ、VpChi1 は低濃度基質で高い分解活性を示し、高基質濃度では分解活性の低下を示した。対して VpChi1-del は基質濃度に依存して分解活性の上昇が見られた(図3)。

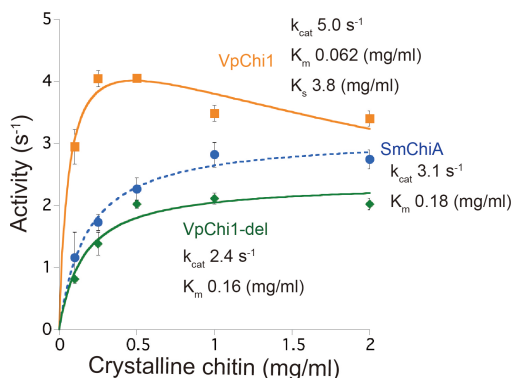


図3 キチン分解活性比較

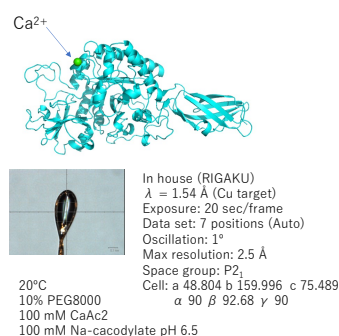


図4 VpChi1-del の X 線結晶構造

分解活性の違いについて知見を得るために VpChi1 の結晶構造解析を試みたが、結晶を得ることはできなかった。VpChi1-del については結晶を得ることができたため、構造を解析したところ、SmChiA と比較して、生成物を結合する部位を覆うループ構造が長いこと、カルシウムイオン結合サイトが存在していることが分かった(図4)。また VpChi1 と VpChi1-del について高速 AFM を用いてキチン結晶上での運動速度を比較したところ、VpChi1 は平均 51.5 nm/s、VpChi1-del は平均 47.9 nm/s であり、ほとんど違いはなかった(図5)。また平均運動時間についても VpChi1 は 1.1 s、VpChi1-del では 1.0 s であり、こちらについても違いは見出せなかった。

そこで VpChi1, VpChi1-del 及び C 末端の追加ドメイン(Cter-CBD)について、蛍光標識した酵素を作成し、1分子蛍光計測によりキチン結晶への吸着速度定数と解離速度定数を比較した(図6)。VpChi1 のキチン結晶1本に対する見掛けの吸着速度定数は $5.5 \times 10^8 / \mu\text{m/s/M}$ であり、VpChi1-del の $4.5 \times 10^8 / \mu\text{m/s/M}$ と非常に近い値であった。Cter-CBD については 2.8×10^8

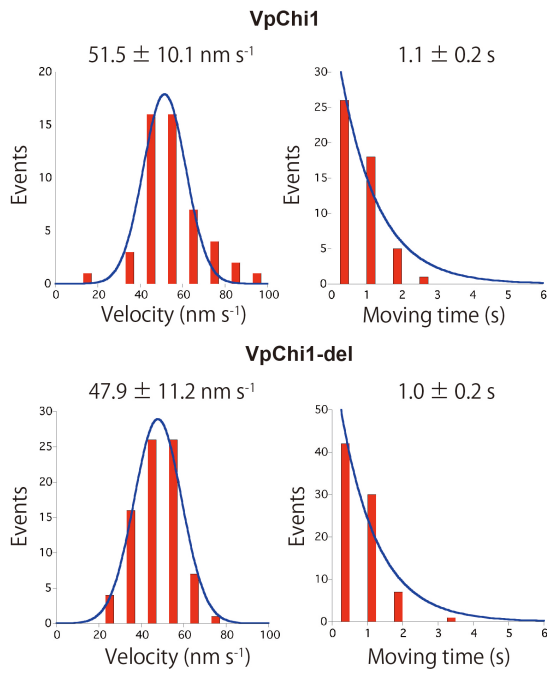


図 5 運動速度と運動時間の比較

/um/s/M で VpChi1 の約半分程度であった。VpChi1 の解離速度定数は少なくとも $0.84 /s$ (25%) と $0.042 /s$ (75%) の 2 つであった。VpChi1-del では $2.1 /s$ (70%) と $0.25 /s$ (30%)、Cter-CBD では $3.0 /s$ (56%) と $0.47 /s$ (44%) であったことから、VpChi1 は吸着時間が長く、また離れにくい吸着の割合が非常に高いことが判明した。見掛けの吸着速度定数は離れやすい吸着と離れにくい吸着の両方を含んでいるため、解離速度定数に対応する面積比からそれぞれの吸着状態に対する吸着速度定数を推定すると、VpChi1 は離れやすい吸着の吸着速度定数が $1.4 \times 10^8 /um/s/M$ 、離れにくい吸着の吸着速度定数が $4.1 \times 10^8 /um/s/M$ となる。同様に VpChi1-del の離れやすい吸着の吸着速度定数が $3.2 \times 10^8 /um/s/M$ 、離れにくい吸着の吸着速度定数が $1.3 \times 10^8 /um/s/M$ 、Cter-CBD の離れやすい吸着の吸着速度定数が $1.6 \times 10^8 /um/s/M$ 、離れにくい吸着の吸着速度定数が $1.2 \times 10^8 /um/s/M$ となった。吸着速度定数と解離速度定数の比から、解離定数を計算すると。VpChi1 の離れやすい吸着の解離定数は $6.0 \times$

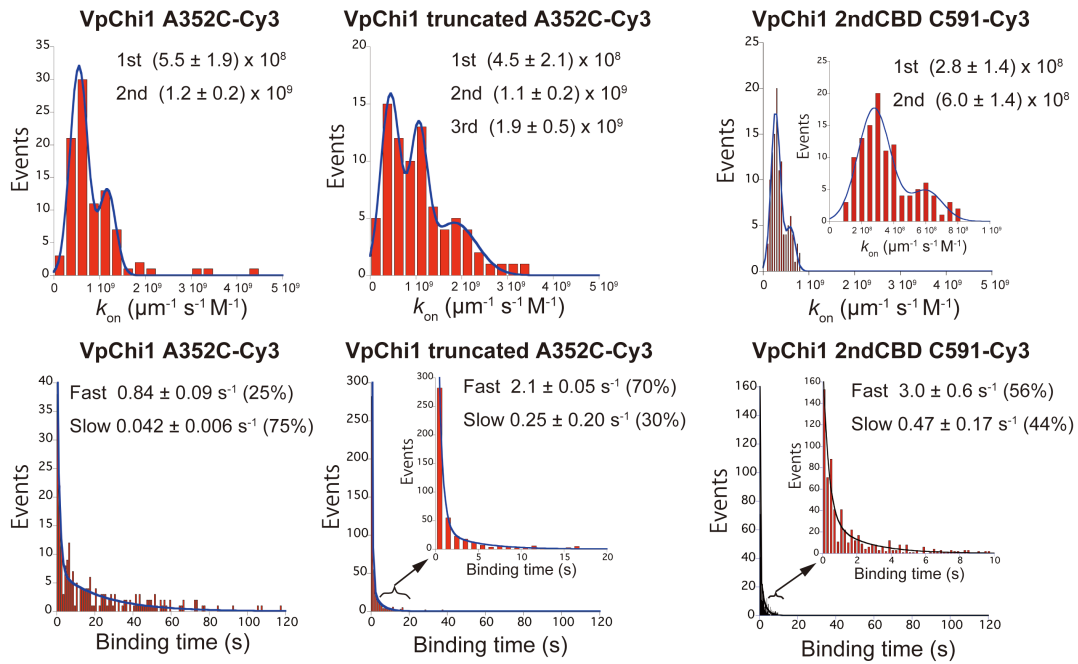


図 6 吸着速度定数と脱着速度定数の比較

10^{-9} um M 、離れにくい吸着の解離定数は $1.0 \times 10^{-10} \text{ um M}$ 、VpChi1-del の解離定数はそれぞれ $6.5 \times 10^{-9} \text{ um M}$ と $1.9 \times 10^{-9} \text{ um M}$ 、Cter-CBD の解離定数は $1.9 \times 10^{-8} \text{ um M}$ と $3.3 \times 10^{-9} \text{ um M}$ であることが分かった。VpChi1 と VpChi1-del を比較すると、離れやすい吸着の解離定数は、2 つの酵素でほとんど同じであるにもかかわらず、VpChi1 の離れにくい吸着の解離定数は VpChi1-del の 19 分の 1 であった。すなわち生化学計測で VpChi1 のキチン親和性が高い原因は離れにくい吸着にあると考えられた。キチン加水分解酵素はその表面に疎水性残基の並んだ平らな吸着面を持ち、キチンの疎水面に吸着すると考えられる。キチン結晶の疎水面はキチン分子鎖 1 本を結晶表面から剥がすことが可能な面であり、親水面は上下を他の分子鎖に挟まれているため分解を行うことは難しい。よって疎水面への吸着特異性の向上が分解活性の向上に寄与しているものと思われた。一方で低基質濃度では VpChi1 のキチンへの高い吸着親和性は効果的に働くが、高基質濃度では阻害反応が確認された。2 つの基質が同時に一つの酵素に吸着する場合に分解活性を失うとして活性データの回帰を行うと比較的説明可能なフィッティングが得られる。ここで Cter-CBD のみに注目すると、単独でもキチンへの吸着が可能である。すなわちキチン結晶が多数存在している高濃度条件下では、VpChi1-del と C-ter-CBD で別のキチン結晶に吸着し、分解活性が阻害される可能性が考えられる。Cter-CBD の吸着時間は離れやすい吸着で 0.33 秒、

離れにくい吸着では 2.1 秒である。一方で VpChi1 の平均運動時間は 1.1 秒であり、運動速度が 51.5 nm/s であることを考慮すると、その間に 56 nm ほど移動する。すなわち、もし VpChi1-del と Cter-CBD が別のキチンに離れにくい吸着をしている場合、VpChi1-del の運動可能範囲が制限されてしまうため、分解活性が低下すると考えられる。

VpChi1 は VpChi1-del と Cter-CBD を合わせた構造をしている。VpChi1-del と Cter-CBD の離れやすい吸着の吸着時間は 0.5 秒と 0.3 秒であり、合計 0.8 秒と推計される。VpChi1 の離れやすい吸着の吸着時間は 1.2 秒であり、さほど大きなズレはない。しかし VpChi1-del と Cter-CBD の離れにくい吸着の吸着時間合計は 6 秒で有るのに対し、VpChi1 の離れにくい吸着の吸着時間は 24 秒と、4 倍の差がある。つまり 2 つのドメインが同時に存在するときには、共同的な吸着が起こることを示している。吸着ドメインが 2 つある場合、酵素全体が基質から解離するには両方のドメインが解離状態となる必要がある。これにより全体として非常に長い吸着を達成している。この現象は、キチン濃度が薄い際は VpChi1-del と Cter-CBD が同じキチン結晶上に吸着していることも示唆している。VpChi1-del ドメインが運動する上で、やはり Cter-CBD が邪魔となると考えられるが、HS-AFM の計測結果を考慮すると、むしろ Cter-CBD が存在している VpChi1 は運動速度が早く運動時間も少しだけ長い。これは少なくとも同じキチン上に吸着している Cter-CBD は分解運動を阻害していないことを示している。なぜ Cter-CBD が別のキチン結晶に吸着している際は阻害がかかり、同じキチン結晶に吸着している際は運動を阻害しないのかは不明であるが、同じキチンに吸着している場合、Cter-CBD は強制的に曲げられた状態となるため何らかの影響があるものと考えられる。Cter-CBD と VpChi1 ドメインを別々の色素で染色し、VpChi1 中での 2 つのドメイン間ダイナミクスを計測するなどによりその秘密が明らかにできるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakamura Akihiko, Kanazawa Takashi, Furuta Tadaomi, Sakurai Minoru, Saloheimo Markku, Samejima Masahiro, Koivula Anu, Igarashi Kiyohiko	4. 巻 68
2. 論文標題 Role of Tryptophan 38 in Loading Substrate Chain into the Active-site Tunnel of Cellobiohydrolase I from <i>Trichoderma reesei</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Glycoscience	6. 最初と最後の頁 19 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5458/jag.jag.JAG-2020_0014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Visootsat Akasit, Nakamura Akihiko, Wang Tak-Wai, Iino Ryota	4. 巻 5
2. 論文標題 Combined Approach to Engineer a Highly Active Mutant of Processive Chitinase Hydrolyzing Crystalline Chitin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 26807 ~ 26816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.0c03911	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Akihiko, Ishiwata Daiki, Visootsat Akasit, Uchiyama Taku, Mizutani Kenji, Kaneko Satoshi, Murata Takeshi, Igarashi Kiyohiko, Iino Ryota	4. 巻 295
2. 論文標題 Domain architecture divergence leads to functional divergence in binding and catalytic domains of bacterial and fungal cellobiohydrolases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14606 ~ 14617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.ra120.014792	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ando Jun, Kawagoe Hiroyuki, Nakamura Akihiko, Iino Ryota, Fujita Katsumasa	4. 巻 146
2. 論文標題 Label-free monitoring of crystalline chitin hydrolysis by chitinase based on Raman spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 4087 ~ 4094
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1an00581b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村彰彦, 石渡大貴, Akasit Visootsat, 内山拓, 水谷健二, 金子哲, 村田武士, 五十嵐圭日子, 飯野亮太
2. 発表標題 バクテリア及びカビ由来 GH6 セロピオヒドロラーゼのドメイン機能の違い
3. 学会等名 日本応用糖質科学会 2020 年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------