

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 6 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21570119

研究課題名（和文）

X線結晶解析・溶液散乱・MD計算の統合によるマルチドメインキチナーゼの構造と機能
研究課題名（英文）

Elucidation of structure and function relationship in multiple-domain chitinases probed by a combination of X-ray crystallography, solution scattering, and molecular dynamics simulation

研究代表者

野中 孝昌 (NONAKA TAKAMASA)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：30242457

研究成果の概要（和文）：

糖質加水分解酵素ファミリー19に属するモジュラーキチナーゼである Cht2 および ChiC のキチン結合ドメインと結晶性 α -キチンの結合モデルを構築し、2つのキチナーゼの結合特異性の違いを示した。また、いずれのキチナーゼにおいても、ドメイン間リンカーにより、全長構造の伸長やドメイン配置への自由度がもたらされることが考えられた。これらの結果より、キチン結合ドメインによりキチンに結合し、活性ドメインがリンカーの長さにより許容される範囲内のキチン鎖を切断するという分解機構が予想された。

キチナーゼ D 活性ドメイン単独および阻害剤との複合体構造を決定、精密化した。阻害剤の結合により基質結合部位のループに構造変化が起こることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We suggest a hypothetical binding model of chitin-binding domains of Cht2 and ChiC, members of glycoside hydrolase family 19, against crystalline α -chitin. This model indicates the difference in the binding specificity of two chitinases. In both chitinases, the conformational flexibility of the interdomain linker can be considered to cause the conformational extension and the variability of the domain arrangement. These results tempt us to speculate the following mechanism of chitin degradation. While ChBD binds to chitin chain and acts as an anchor, CatD degrades chitin chains within a defined region of the radius depending on linker length.

We determined and refined the crystal structures of the catalytic domain of chitinase D and its inhibitor complex. It is shown that conformational change of a substrate-binding loop is induced by the inhibitor binding.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：構造生物化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物科学

キーワード：タンパク質、X線構造解析

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の多くは、複数のドメインからなり（モジュラータンパク質）、それらが協奏的に働くことで機能を発揮している。タンパク質機能を詳細に解明するためには、原子レベルの構造を得ることが不可欠であり、これを達成するための最も強力な手段は、X線結晶構造解析である。しかしながら、モジュラータンパク質は、ドメインを繋ぐリンカーの高い柔軟性が妨げとなり、現在の技術では結晶化させることが困難であることが多い。そういった場合、ドメイン単位に分割し、立体構造を個別に解析するのが常套手段であるが、ドメインの集合体としての全長タンパク質のインタクテナ構造情報を得ることはならない。幸運にも、全長タンパク質の結晶化に成功した場合でも、得られる構造は結晶中の静的な構造であり、生理条件下での機能的な立体構造を反映しているかどうかという点においては、判断が難しいことが多い。これに対し、X線溶液散乱法は、低分解能であるため得られる情報こそ少ないが、結晶化を必要とせず、溶液状態で分子レベルの構造解析が可能である。

キチナーゼは、*N*-アセチルグルコサミンがβ-1,4結合で連結したポリマーであるキチンを分解する。菌類の細胞壁や甲殻類の甲殻などに存在する不溶性で強固な結晶構造を持つキチンを効率的に分解するために、キチナーゼは活性ドメインに加え、基質結合に関わる基質結合ドメインを併せ持っていることが多い。多くの場合、ドメインは柔軟なリンカーで結ばれている。この様なタイプの糖質加水分解酵素（キチナーゼの他セルラーゼ等も含む）の全長のX線結晶構造解析は、リンカーの柔軟性の問題のため極めて難しく、X線溶液散乱法による解析例も少ない。例えばキチンと共通の基本骨格を持つセルロースを分解するセルラーゼのうち、マルチドメインからなり、かつ、柔軟なリンカーを持つタイプの全長構造となると、国外の同一グループによりX線溶液散乱法を用いて解析された例が5つあるだけである。研究代表者らは、すでに4種類のマルチドメインキチナーゼに対して、3種類の全長構造をX線結晶構造解析あるいはX線溶液散乱法により決定し、残り1種類も全長と活性ドメインの結晶化に成功していた（表1）。

表1 研究代表者らによるマルチドメインキチナーゼ群の構造研究の進行状況（研究開始当初）

キチナーゼ	由来	解析対象	進行状況
キチナーゼ A1 (ChiA1)	<i>Bacillus cirulans</i>	活性ドメイン	構造決定 (X線結晶解析)
		全長	構造決定 (X線溶液散乱)
キチナーゼ D (ChiD)	<i>Bacillus cirulans</i>	活性ドメイン	結晶化
キチナーゼ C (ChiC)	<i>Streptomyces griseus</i>	全長	結晶化
		全長	構造決定 (X線結晶解析)
		基質結合ドメイン	構造決定 (核磁気共鳴)
キチナーゼ 2 (Chi2)	<i>Oryza sativa</i>	基質結合ドメイン	基質結合機構の提唱 (MD)
		全長	結晶化
		全長	構造決定 (X線結晶解析)

2. 研究の目的

1. 研究開始当初の背景で述べた研究代表者らが得ていた成果をさらに発展させて、MDシミュレーションを含めた立体構造の観点から解析する。これにより、多様なドメイン構造を持つマルチドメインキチナーゼの全長構造としての（ドメイン相互の作用を踏まえて）、原子および分子レベルの動的な情報を引き出し、多角的にキチナーゼ全長構造およびキチン分解機構を解明する。

3. 研究の方法

個別のドメインの立体構造が既知でないキチナーゼについては、X線結晶構造解析を進める（ChiDのみ）。キチナーゼの全長構造解析については、X線溶液散乱法を適用する。立体構造から理論的な溶液散乱曲線を計算することが可能である。したがって、それぞれのキチナーゼについて、全長構造モデルを、各ドメインの構造を組み合わせて構築し、これから計算される理論上の散乱曲線が実測の溶液散乱データと矛盾しない配置を持つものを選抜する。この際、ドメイン間リンカーによる接続が物理的に可能であるかどうかを注意するとともに、機能面に関する情報も参考にする。適切な全長キチナーゼの構造モデルを初期モデルとし、MDシミュレーションにより動的解析を行う。実験に必要なタンパク質試料はいずれも大腸菌による大量発現が可能であり、ミリグラムオーダーで高純度にまで精製することのできる系が確立されている。

4. 研究成果

(1) Cht2 の X 線溶液散乱

X線溶液散乱実験を、高エネルギー加速器研究機構のビームラインBL15Aにおいて行い、いずれのキチナーゼにおいてもタンパク質濃度 6 点において散乱データを収集することができた。散乱データの解析を行い、慣性半径 R_g (22.9 Å) と最大長 D_{max} (86 Å) を得た。これらは、研究代表者らによって決定された結晶構造から計算された理論上の R_g および D_{max} より大きい値を示した (Kezuka *et al.*, *Proteins* 2010)。また、距離分布関数 $p(r)$ には、活性ドメイン内ベクトルおよび2つのドメイン間ベクトルに相当するピークが得られた (図 1)。以上より、Cht2 は溶液中においては、より伸びた全体構造を取っており、それはドメイン間のリンカーの高い柔軟性によりもたらされることが考えられた。

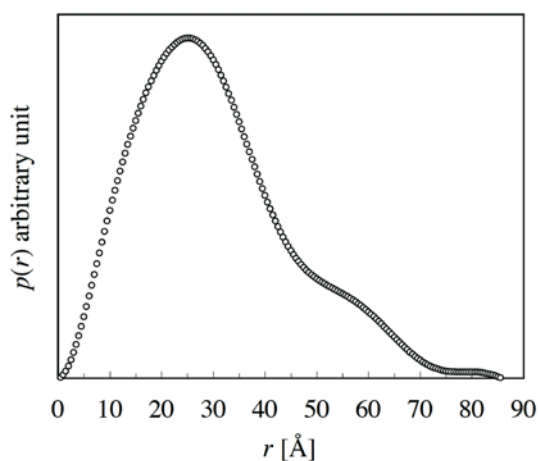


図 1 Cht2 の距離分布関数

(2) ChiC の X 線溶液散乱

高エネルギー加速器研究機構のビームラインBL15AにおいてChiCのX線溶液散乱データを収集した。解析の結果、慣性半径 R_g (21.6 Å) と最大長 D_{max} (75 Å) を得た。すでに研究代表者らが決定しているChiCの結晶構造 (Kezuka *et al.*, *J. Mol. Biol.* 2006) から計算された R_g および D_{max} の理論値はそれぞれ 24.7Åと 79 Åであった。ChiCは溶液中では、これまで解析に使用してきた結晶中とは、異なるドメイン配置を取ることが分かった。また、距離分布関数 $p(r)$ には、Cht2 同様、活性ドメイン内ベクトルおよび2つのドメイン間ベクトルに相当するピークが得られた (図 2)。ドメイン間のリンカーにより2つのドメインの配置に自由度がもたらされることが考えられた。

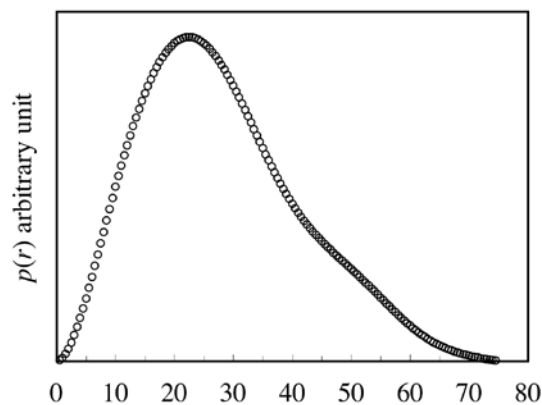


図 2 ChiC の距離分布関数

(3) Cht2 および ChiC の結晶性 α -キチンに対する結合モデル

Cht2 および ChiC の活性ドメイン (C 末端) は互いに共通のフォールドを持つが、N 末端のキチン結合ドメインのフォールドは大きく異なる。まず、ドッキングシミュレーションにより Cht2 の結合ドメインに対する N-アセチルキトトリオースの結合を検証し、得られた複合体モデルをもとに α -キチンへの結合モデルを作製した。ChiC については、研究代表者らが提唱した既存のモデル (Kezuka *et al.*, *J. Mol. Biol.* 2006) をもとに α -キチンに対する結合モデルを作製した。Cht2 の結合ドメインは α -キチン表面に露出していると考えられる(100)あるいは(200)面の双方と立体障害を生じた (図 3a、3b)。一方、ChiC の結合ドメインは(100)面に相補性が高い構造をしていることが分かった (図 3c)。これは、非結晶性基質より結晶性基質に対して結合特異性の高い ChiC の性質 (Itoh *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002) と矛盾しないものであった。Cht2 はキチンの非結晶性領域、ChiC は結晶性領域への結合に適していることが推察された。抗真菌活性には、基質結合ドメインの寄与が大きいことが知られている。ここで得られた、異なるタイプのドメインを持つ ChiC および Cht2 のキチン結合機構は、これらが属するファミリー19 キチナーゼの抗真菌活性解明につながるものと期待される。

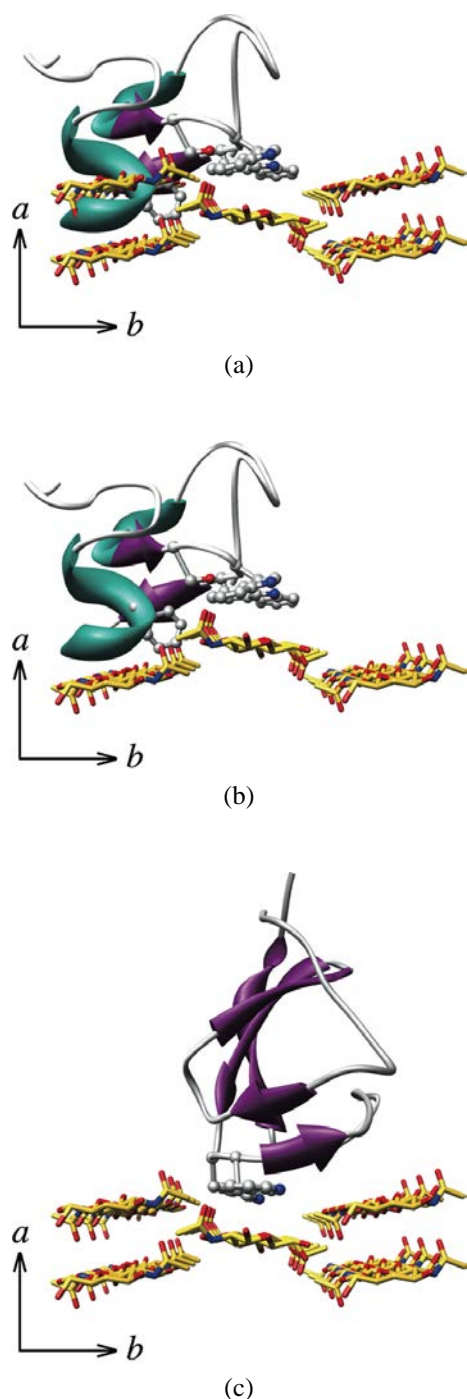


図2 結晶性 α -キチンに対する結合モデル (a) Cht2 (100)面、(b) Cht2 (200)面、(c) ChiC (100)面

(4) ChiD 活性ドメインの構造精密化

キチナーゼDの活性ドメイン (CatD_{ChiD}) について構造精密化を行った。これにより、CatD_{ChiD} 単独とキチナーゼDの属する糖質加水分解酵素ファミリー18のキチナーゼに対する阻害剤であるアロサミジンとの複合体の結晶構造を得た。最終的なR-factorとFree R-factorは、CatD_{ChiD} 単独に対しては、

それぞれ 14.6%と 18.2%、複合体に対しては、15.4%、18.9%であった。アロサミジンは疑似三糖構造を有しており、基質が結合すると予想される浅いクレフトに結合していた。これにより、クレフトの一部を構成するループが触媒残基の方へ 3.0 Åシフトする構造変化が観測された。このような構造変化は、CatD_{ChiD}と 53%のアミノ酸配列のアイデンティティを持つ *Bacillus cereus* キチナーゼ (ChiNCTU2) においても基質結合により起こることが報告されている (Hsieh *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2010)。しかしながら、両者には、以下のような相違点も見つかった。1)基質あるいは阻害剤の結合によるループのシフトの度合いは、ChiNCTU2の方が 4.5 Åと大きい、2)このループ上に位置するChiNCTU2のGln109は、基質結合に極めて重要であることが示されているが、CatD_{ChiD}においては、このアミノ酸が保存されていない (Ala266がこれに相当する)。これらの相違が、キチナーゼDの基質結合や触媒活性にどのように関与するのかは興味深い点である。今後部位特異的変異体を調製し、酵素学的解析や基質複合体の構造解析を進めることで、基質結合および触媒反応機構に迫れるものと考えられる。

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1件)

Kezuka, Y., Kojima, M., Mizuno, R., Suzuki, K., Watanabe, T. & Nonaka, T. Structure of full-length class I chitinase from rice revealed by X-ray crystallography and small-angle X-ray scattering *Proteins* **78**, 2295-2305. (2010).

[学会発表] (計5件)

Yuichiro Kezuka, Yoshikane Itoh, Jun Watanabe, Takeshi Watanabe, and Takamasa Nonaka Structural studies of a bacterial modular chitinase belonging to glycoside hydrolase family 19 JBS Biofrontier Symposium on Biochemistry of pH Homeostasis and Proton Circuit (2009年7月24日、岩手医科大学矢巾キャンパス)

杉山真一、岡田真司、深溝慶、毛塚雄一郎、野中孝昌、鈴木一史、渡邊剛志 ファミリー19キチナーゼ活性ドメインの局所構造と分解生成物 第23回キチン・キトサンシンポジ

ウム（2009年8月21日、佐賀大学本庄キャンパス）

植村迪夫、丸屋良輔、山田伸明、原政司、池上貴久、毛塚雄一郎、野中孝昌、鈴木一史、渡邊剛志 細菌キチナーゼキチン結合ドメインの結合特性の比較解析 日本農芸化学会2010年度大会（2010年3月29日、東京大学駒場キャンパス）

野中孝昌 蛋白質のX線構造解析と応用 第45回日本生体医工学会東北支部大会（2011年10月29日、岩手医科大学循環器医療センター）

関安孝、毛塚雄一郎、野中孝昌 天然変性領域を含むタンパク質構造アンサンブルの構築 第6回岩手医科大学先端医療薬学研究センター講演会（2012年3月16日、岩手医科大学矢巾キャンパス）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

野中孝昌（NONAKA TAKAMASA）

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：30242457

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

小島正樹（KOJIMA MASAKI）

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：90277252

毛塚雄一郎（KEZUKA YUICHIRO）

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：50397163