

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：23401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850234

研究課題名(和文)細胞表面提示型キチナーゼのキチン分解機構の解明と糖転移活性向上によるオリゴ糖生産

研究課題名(英文) Elucidation of the catalytic mechanism of bacterial cell-surface-expressed chitinase ChiW and chitin oligosaccharide production by using the high transglycosylation activity of ChiW.

研究代表者

伊藤 貴文 (Itoh, Takafumi)

福井県立大学・生物資源学部・准教授

研究者番号：10402827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、Paenibacillus 属細菌由来新規キチナーゼChiWのキチン分解機構の解明と、その糖転移活性の向上を目的とした。(1) ChiWキチン分解能力の解明：ChiWの複合ドメイン構造を2.0オングストローム分解能で決定した。また、ChiWのドメイン構造がキチン分解時に協奏的に働いていることが示唆された。(2) ChiW糖転移活性の向上：120-130%オリゴ糖合成活性が上昇した変異体が2種類取得された。(3) 細菌P. FPU-7のキチン分解機構に関する研究：P. FPU-7培養上清に含まれるタンパク質を決定した結果、ChiW以外にも複数種類のキチン分解酵素を見出した。

研究成果の概要(英文)：The purposes of this study are to elucidate the degradation mechanism of the novel multi-modular surface-expressed chitinase, ChiW, of Paenibacillus sp. str. FPU-7 and to enhance the transglycosylation activity of the enzyme.

(1) The degradation mechanism of ChiW. The crystal structure of ChiW was determined at 2.0 angstrom resolution. The structural and functional analyses reveal that the enzyme is composed of six structural domains for efficient chitin degradation. (2) Enhancement of the transglycosylation activity of ChiW. The important residues for substrate binding were selected as the mutation sites. The mutant enzymes were prepared by site-specific mutagenesis. As the result, two mutant enzymes with higher transglycosylation activities (120-130%) were obtained. (3) Identification of P. FPU-7 proteins for chitin degradation. Proteomic analysis was carried on P. FPU-7 extracellular proteins. A number of chitinase and chitin-related proteins were identified through the analysis.

研究分野：構造生物学

キーワード：Chitinase Paenibacillus Structural biology chitin oligosaccharides

1. 研究開始当初の背景

キチンは、真菌や昆虫などの細胞壁やカニの殻などに含まれる多糖であり、地球上に豊富に存在することから、エネルギーや機能性材料として利用する研究が盛んに行われている。しかしながら、キチンの高度利用には、利用目的の鎖長にまで分解することが必要であるが、*N*-アセチル-D-グルコサミンが重合した構造は非常に安定であり、その分解は容易ではない。キチンの分解とその制御技術の確立は重要な課題であった。

Paenibacillus sp. FPU-7 (*P. FPU-7*) は、菌類を旺盛に捕食し、カニ殻に含まれるキチンまでも強力に分解する。*P. FPU-7* は、従来知られている分泌型細胞外キチン分解酵素 (キチナーゼ) の他に、分子量 15 万の巨体キチナーゼ ChiW を細胞表面に提示していることが、ゲノム解析を通じて木元らにより初めて見いだされた (Kimoto, H. *et al.*, *Chitin and Chitosan Res.* 16, 176-177, 2010)。

研究開始当初までに、申請者らは、ChiW が 2 つの相同な触媒ドメインを有し、不溶性の多糖キチンに対して高い分解活性を有することを報告してきた (Itoh, T. *et al.*, 日本農芸化学会大会, 2012)。しかしながら、ChiW の配列解析からは、多糖キチナーゼの触媒活性に関わるとされる糖質結合ドメインが認められなかった。そこで、申請者らは予備的な X 線結晶構造解析を行ったところ、既知の糖質結合ドメインに代わり、機能未知の複数のドメインが存在することを明らかにした。このことから、ChiW の「複合ドメイン構造」と「高いキチン分解活性」の構造機能相関の解明は、酵素による難分解性高分子の分解法の確立に貢献することが期待された。

一方、キチンのオリゴ糖(特に 6 糖)には、高等動植物の生体防御機構を活性化するなどの機能が認められ、農業用資材として注目されている (Kimoto, H. *et al.*, *Chitin and Chitosan Res.* 17, 296-304, 2011)。しかし、目的とする鎖長のオリゴ糖を大量に生産する技術は未だに確立されていない。この要因として、キチンの加水分解によって目的のオリゴ糖を得るには重合度の制御が難しく、精製しても十分量のオリゴ糖が得られないこと、単糖からオリゴ糖を低コストに大量合成することは困難であることなどが挙げられる。申請者は、予備検討において、ChiW の新たな触媒作用として、オリゴ糖鎖を合成する強い糖転移活性を見出した。

2. 研究の目的

キチンは再生可能な生物資源であり、その有効利用が大きな目的である。本研究では、主にキチナーゼ ChiW による「難分解性キチン分解の分子機構解明の研究」と「機能性キチンオリゴ糖の合成研究」の 2 つを行った。(1) ChiW の「複合ドメイン構造」と「高いキチン分解活性」の構造機能相関解析

ChiW のキチンに対する反応産物を機器

分析し、ChiW の反応様式を明らかにする。

試料調製と結晶化条件を最適化することで、2 Å 分解能以上を目標に ChiW の立体構造を精密に決定する。

分光法と分子動力学シミュレーション解析を利用して、ChiW がどのように反応を触媒するのかを明らかにする。

ChiW の Stem ドメインと細胞壁多糖との相互作用などを精査し、このドメインの機能を明らかにする。

上記からの反応様式と立体構造の解析結果を合わせて、ChiW が複合ドメイン構造を利用して、どのように細胞壁キチンを分解するのかを提示する。

(2) ChiW の糖転移活性を利用してオリゴ糖を合成する

立体構造や反応様式の解析結果に基づき、基質との結合に関わる残基を候補として、部位特異的に変異体を作製する。それら変異体の中から活性が十分に向上した糖転移高活性型 ChiW を取得する。

糖転移活性が向上した ChiW を用いて、溶媒、pH などの反応条件を変化させることで、オリゴ糖の合成条件を最適化する。

変異部位のアミノ酸残基と糖転移活性の相関を解析することで、糖転移反応に関する新たな知見を得る。

3. 研究の方法

(1) ChiW の「複合ドメイン構造」と「高いキチン分解活性」の構造機能相関解析

ChiW 触媒反応の解析

全長、各種ドメインのみ (2 種)、触媒ドメインの組み合わせ (2 種) の比活性を決定した。キチン(オリゴ糖および多糖) に対する反応産物を液体クロマトグラフィー(HPLC) や質量分析にて追跡した。

ChiW の X 線結晶構造解析

試料調製法を検討し、結晶化条件の最適化を行った。また、国際宇宙ステーション「きぼう」を利用した高品質結晶生成実験による宇宙での結晶化条件も最適化した。

CBM-54 (Stem ドメイン) の機能解析

CBM-54 のみのタンパク質を調製した。そして、細胞壁に含まれる多糖(ペプチドグリカン、キチン、グルカンなど)に対する分解活性および、それら細胞壁多糖への結合活性をブルダウンアッセイ法により測定した。

CBM-54 の自己切断機構の解析

CBM-54 は、その SDS ポリアクリルアミド

ゲル電気泳動像と立体構造から、構造内部で限定加水分解が起き、立体構造は維持したまま、構造内部にニックが入ることが示唆された。さらに、切断部位付近にはセリンプロテアーゼの触媒残基(Ser-His-Asp)が見出され、分子内での配列特異的な切断も示唆された。これら残基の変異体を調製し、切断状況を確認した。

(2) ChiW の糖転移活性の向上とキチンオリゴ糖の合成

ChiW の変異体作製とスクリーニング

ChiW はオリゴ糖を合成する糖転移活性を有す。他のキチナーゼの研究で糖転移活性に影響を与えることが知られているアミノ酸残基(Zakariassen, H. *et al.*, *Biochemistry* 50, 5693-5703, 2011 など)を他のアミノ酸に変異させた酵素ライブラリーを作製した。そして、基質と反応させた産物を HPLC によって定量した。

キチンオリゴ糖の合成条件の最適化

糖転移高活性型 ChiW を用いて、基質と反応条件 (pH や溶媒) を変化させ、合成条件(特に 6 糖以上) を最適化した。

(3) *Paenibacillus* 属細菌のキチン分解機構に関する研究

キチン分解細菌である *P. FPU-7* をキチンを含む培地と含まない培地にて培養し、その上清に含まれるタンパク質を SDS-PAGE にて約 1 cm 泳動後、ポリアクリルアミドゲルを約 1-2 mm 片に切断した。ポリアクリルアミドゲル中からゲル内消化にてペプチド断片を得て、Thermo 社 Orbitrap 型質量分析装置、*P. FPU-7* ゲノム配列、Mascot データベース解析ソフトを利用することで、培養上清中のタンパク質を網羅的に決定した。

4. 研究成果

(1) ChiW の「複合ドメイン構造」と「高いキチン分解活性」の構造機能相関解析

ChiW のキチンに対する反応産物を機器分析し、ChiW の反応様式を明らかにした。

ChiW のキチンおよびそのオリゴ糖に対する反応様式を明らかにするため、ChiW 全体、触媒ドメインのみ、立体構造不明ドメインのタンパク質試料を調製した。立体構造不明ドメインのみにはキチン分解活性は認められなかったが、ChiW 全体および触媒ドメインのみには分解活性が認められ、キチンはランダムに分解され、最終的には 2 糖にまで分解された。その反応の最適温度、最適 pH は、それぞれ 50 °C、pH 5 付近であった。また、決定した ChiW の立体構造に基づき、触媒ドメインのみ (触媒ドメイン 1, 触媒ドメイン 2)、および触媒ドメインの順番を入れ替えた変異体タンパク質を調製した。そして、各ドメインと活性の相関解析を行ったところ、各ドメインがキチン分解時に協奏的に働いて

いることが示唆された。

試料調製と結晶化条件を最適化することで、2 Å 分解能以上を目標に ChiW の立体構造を精密に決定した。

ChiW がキチンを強力に分解できる立体構造的要因を明らかにするため、タンパク質試料の精製条件と結晶化条件の再検討を行った。結果、ChiW 全長の結晶の回折データの分解能を 2.6 Å から 2.0 Å にまで向上することができた。触媒ドメインのみの結晶に関しては、1.93 Å 分解能の回折データが得られた。また、円二色性スペクトルデータの取得した結果、ChiW の立体構造不明ドメインが主に β -ストランドで構成されていることを明らかにした。

ChiW の CBM-54 ドメインと細胞壁多糖との相互作用などを精査し、このドメインの機能を明らかにした。

機能が不明であった CBM-54 ドメインと種々の糖との結合実験を行った。その結果、CBM-54 ドメインがキチンではなくて、真菌細胞壁に含まれる多糖であるグルカンと強く結合することが明らかとなった。CBM-54 ドメインの自己切断部位は、アスパラギン-セリンである。さらに、立体構造上付近のアミノ酸残基はアルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸が存在した。これらの部位特異的な変異体を作製し、切断活性を調べたところ、本ドメインがセリンプロテアーゼ様の自己切断を行っていることが明らかとなった。

上記 から の反応様式と立体構造の解析結果を合わせて、ChiW が複合ドメイン構造を利用して、どのように細胞壁キチンを分解するのかを提示した。

生化学的解析と立体構造解析から、ChiW は CBM-54 ドメインを利用して、真菌細胞壁多糖グルカンと結合する。そして、基質である細胞壁多糖キチンに近づき、効率的に切断することが明らかとなった。

これらの成果は、査読付き論文 3 編にて報告した (現在、1 報準備中)。また、今回、細菌表層でのキチンの効率的な分解法を明らかにしたことは、セルロースなど強固な構造多糖の酵素を利用した温和な条件での分解法の確立にもつながる。

(2) ChiW の糖転移活性の増強

立体構造や反応様式の解析結果に基づき、基質との結合に関わる残基を候補として、部位特異的に変異体を作製した。さらに合成条件を最適した。7 種類の変異体を作製し、それらの活性を測定したところ、120-130%オリゴ糖合成活性が上昇した変異体が 2 種類取得された。反応 pH を最適化したところ、pH 5.5 が適切であることが示された。

(3) *Paenibacillus* 属細菌のキチン分解機構に

関する研究

キチン分解細菌である *P. FPU-7* を培養し、その上清に含まれるタンパク質を決定した。その結果、これまで確認しているキチナーゼ以外にも複数種類のキチン分解酵素およびそれらと遺伝子上でクラスター構造を形成している機能不明タンパク質を見出した。さらに、キチンオリゴ糖を細胞質内へと輸送するタンパク質の候補も見出した。

これらの研究成果は、グラム陽性細菌の真菌細胞壁の分解法の解明につながり、今後、バイオマス資源の利用技術の基盤となる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Katano, H., Takakuwa, M., Itoh, T. and Hibi, T.: Microplate assay of α -glucosidase and its inhibitors based on the direct reduction of molybdosilicate by glucose. *Anal. Sci.* 3:1291-1295, 2015. 査読有.
DOI: 10.2116/analsci.31.1291.

Katano, H., Takakuwa, M., Itoh, T. and Hibi, T.: Colorimetric determination of fructose for the high-throughput microtiter plate assay of glucose isomerase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79: 1057-1060, 2015. 査読有.
DOI: 10.1080/09168451.2015.1010477.

木元 久, 伊藤 貴文, 日弁 隆雄, 藤井 豊, 草桶 秀雄: *Paenibacillus* 属細菌のキチン分解機構. *応用糖質化学* 4: 113-120, 2014. 査読有.
<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009823319>

Itoh, T., Sugimoto, I., Hibi, T., Suzuki, F., Matsuo, K., Fujii, Y., Taketo, A. and Kimoto, H.: Overexpression, purification, and characterization of *Paenibacillus* cell surface-expressed chitinase ChiW with two catalytic domains. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78: 624-634, 2014. 査読有.
DOI: 10.1080/09168451.2014.891935.

Itoh, T., Hibi, T., Sugimoto, I., Suzuki, F., Fujii, Y., Taketo, A. and Kimoto, H.: Crystallization and preliminary X-ray analysis of the catalytic domains of *Paenibacillus* sp. str. FPU-7 cell surface-expressed chitinase ChiW. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 70:350-353, 2014. 査読有.
DOI: 10.1107/S2053230X14002325.

Itoh, T., Hibi, T., Fujii, Y., Sugimoto, I., Fujiwara, A., Suzuki, F., Iwasaki, Y., Kim, J-K., Taketo, A. and Kimoto, H.: Cooperative degradation of chitin by extracellular and cell surface-expressed chitinases from *Paenibacillus* sp. FPU-7. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 7482-7490, 2013. 査読有.

DOI: 10.1128/AEM.02483-13.

[学会発表] (計 8 件)

伊藤 貴文, 日弁 隆雄, 木元 久, 固い細胞壁を細菌はどのようにして破壊するのか-細胞表層結合型キチナーゼの立体構造解析-, 第 8 回北陸合同バイオシンポジウム 2015, 平成 27 年 10 月 31 日, 山中座ホール (石川県・加賀市).

伊藤 貴文, 立体構造に基づく糖質関連酵素の反応機構の解明とポストゲノミクスへの新展開, 公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部第 173 回例会, 平成 27 年 6 月 20 日, 名古屋大学 (愛知県・名古屋市).

伊藤 貴文, 日弁 隆雄, 横内 佳奈, 高宮 杏奈, 藤井 豊, 武藤 明, 木元 久, *Paenibacillus* 属細菌由来細胞表層キチナーゼ ChiW の組換えタンパク質発現と細胞表層結合ドメインの応用, 公益社団法人 日本農芸化学会 2015 年度大会, 平成 27 年 3 月 27 日, 岡山大学 (岡山県・岡山市).

伊藤 貴文, 立体構造に基づく糖質関連酵素の反応機構の解明とポストゲノミクスへの新展開, 公益社団法人 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年度農芸化学奨励賞受賞講演, 平成 27 年 3 月 26 日, ホテルグランヴィア岡山 (岡山県・岡山市).

木元 久, 笠原 康一, 加藤 久晴, 伊藤 貴文, 日弁 隆雄, “越前がに” のブランドイメージを活用した次世代型農業資材, 第 7 回北陸合同バイオシンポジウム 2014, 平成 26 年 11 月 28 日, 八尾ゆめの森 ゆうゆう館 (富山県・富山市).

伊藤 貴文, 日弁 隆雄, 高宮 杏奈, 鈴木 史子, 杉本 郁美, 藤井 豊, 武藤 明, 木元 久, *Paenibacillus* 属細菌由来キチン分解酵素 ChiW の N 末端領域の解析, 公益社団法人 日本農芸化学会 2014 年度大会, 平成 26 年 3 月 28 日, 明治大学 (神奈川県・川崎市).

高宮 杏奈, 伊藤 貴文, 日弁 隆雄, 大門 結花, 高木 良樹, 仲上 真由, 鈴木 史子, 杉本 郁美, 藤井 豊, 武藤 明, 木元 久, *Paenibacillus* str. FPU-7 由来キチナーゼ ChiW の N 末端領域の機能解析, 第 6 回北陸合同バイオシンポジウム 2013, 平成 25 年 11 月 8 日, 国民宿舎 能登小牧台 (石川県・七尾市).

Kimoto, H., Itoh, T., Hibi, T., Fujiwara, A., Fujii, Y., Tanaka, Y., Suzuki, F., Taketo, A., Kusaoke, H., Chitinases secreted by *Paenibacillus* sp. strain IK-5 form a huge complex. 10th Asia-Pacific Chitin & Chitosan Symposium (第 10 回アジア・太平洋キチンキトサン国際シンポジウム) Yonago

Convention Center “BIGSHIP” Yonago, Japan
October 4-8, 2013.

[その他]

ホームページ等

[http://fpuinfo.fpu.ac.jp/fpu/system/php/faculties_](http://fpuinfo.fpu.ac.jp/fpu/system/php/faculties_open/showone.php?id=ito-t)
[open/showone.php?id=ito-t](http://fpuinfo.fpu.ac.jp/fpu/system/php/faculties_open/showone.php?id=ito-t)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 貴文 (ITOH, Takafumi)

福井県立大学・生物資源学部・准教授

研究者番号: 10402827

(2) 研究協力者

日竝 隆雄 (HIBI, Takao)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号: 00285181

木元 久 (KIMOTO, Hisashi)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号: 70283166

藤井 豊 (FUJII, Yutaka)

福井大学・医学部・教授

研究者番号: 80211522