

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5月21日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500423

研究課題名（和文） CBMを利用したキチンを基盤とする
新規細胞培養用マトリックスの創製

研究課題名（英文） Creation of novel matrix for cell culture using CBM and chitin

研究代表者

中村 聡 (NAKAMURA SATOSHI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：50227899

研究成果の概要（和文）：好アルカリ性 *Bacillus* sp. J813 株由来キチナーゼは、触媒ドメイン、フィブロネクチンタイプ III 様ドメイン (FnIII_D) およびキチン結合ドメイン (ChBD) から構成される。Arg-Gly-Asp (RGD) 配列は、細胞外マトリックス分子フィブロネクチン中に存在し、細胞表面レセプターのインテグリンを介して細胞と相互作用する。RGD を融合した各種 FnIII_D/ChBD および ChBD タンパク質を調製し、その性質を調べた。融合タンパク質はキチン結合能、インテグリン結合能および細胞接着能を示した。

研究成果の概要（英文）：Chitinase J from alkaliphilic *Bacillus* sp. contained a catalytic domain, a fibronectin type III-like domain (FnIII_D) and a chitin-binding domain (ChBD). A peptide sequence Arg-Gly-Asp (RGD) sequence locates within fibronectin, an extracellular matrix molecule, and interacts with cells via a cell surface receptor called integrin. Several kinds of RGD-fused FnIII_D/ChBD and ChBD proteins were prepared and characterized. The fusion proteins indicated chitin-binding, integrin-binding and cell adhesive activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：再生医工学材料

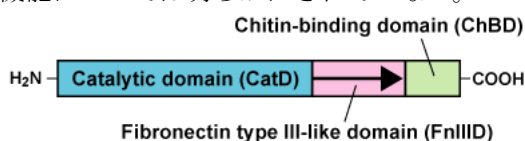
1. 研究開始当初の背景

一般に細胞は他の細胞や細胞外マトリックスと接着することにより一定の組織構造を形成する。細胞外マトリックスの一つであるフィブロネクチンは強い細胞接着能を示すタンパク質で、タイプ I, II および III の 3 種類のドメインからなる複雑な繰り返し構造をとる。ヒトフィブロネクチンタイプ III ドメインのうち 10 番目のドメイン内に

存在するアミノ酸配列 Arg-Gly-Asp (RGD) 配列は細胞接着に必須であり、細胞表面レセプターであるインテグリンと相互作用することにより細胞接着に働く。これまでに RGD 配列を応用した人工組織培養用マトリックスの開発が数多く報告されている。

キチンは N-アセチル-D-グルコサミンが β-1,4 グリコシド結合で直鎖状に連なった多糖であり、その β-1,4 グリコシド結合を加水

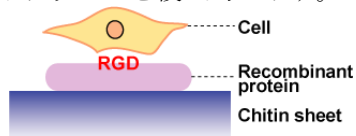
分解する酵素がキチナーゼである。当研究室において土壌より分離した好アルカリ性 *Bacillus* sp. J813 株はキチナーゼ (ChiJ) を生産し、既に ChiJ 遺伝子のクローニングが行われている。他のキチナーゼとのアミノ酸配列比較の結果、ChiJ は GH ファミリー18 触媒ドメイン (CatD)、フィブロネクチンタイプ III 様ドメイン (FnIII_D) およびキチン結合ドメイン (ChBD) からなるマルチドメイン構造をとることがわかった (図1)。各ドメインの機能解析の結果、ChBD はキチンとの結合に関与するという予備的な知見が得られたが、ChBD のキチン結合機構は不明である。また、本酵素の FnIII_D は前述したヒトフィブロネクチンのタイプ III ドメインとの間にアミノ酸配列の相同性が見られるが、その機能については明らかにされていない。



(図1) ChiJ の構造模式図

2. 研究の目的

本研究では、キチンを基盤とする新規組織培養用マトリクス創製を目的として、ChiJ の FnIII_D/ChBD および ChBD 領域に新たに RGD 配列を付与した種々の組換えタンパク質を調製する。そして、大腸菌が生産した各種組換え FnIII_D/ChBD および ChBD のキチン結合能、インテグリン結合能ならびに細胞接着能を調べる。さらに、組織培養用マトリクスへの応用に向け、本組換えタンパク質を介したキチン不織布上での繊維芽細胞の培養を試みる。また、本組換えタンパク質の機能向上に向け、ChBD のキチン結合機構を調べる。図2に、本研究の新規組織培養用マトリクスを模式的に示す。



(図2) ChBD を用いたキチンを基盤とする新規組織培養用マトリクス

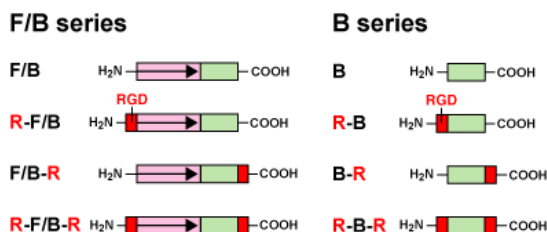
3. 研究の方法

pChiJ は ChiJ 遺伝子をコードする組換えプラスミドである。各種組換えタンパク質の発現には、発現ベクター pET-21b(+) および大腸菌 BL21(DE3) 株 (Novagen) を用いた。不溶性キチンには、キチンをビーズ状に加工したキトパール BL-01 (富士紡績) を使用した。ヒトインテグリン $\alpha 5\beta 1$ および抗ヒトインテグリン $\alpha 5\beta 1$ 抗体は Chemicon より購入し、組換えタンパク質のインテグリン結合能は ELISA により調べた。株化したマウス繊維芽

細胞には、3T3-L1 株を使用した。

4. 研究成果

(1) ChiJ 遺伝子の FnIII_D/ChBD 領域、FnIII_D 領域および ChBD 領域を発現ベクター pET-21b(+) に挿入し、ChiJ の当該領域 (それぞれ F/B, F および B) をコードする発現型プラスミドを得た。また、FnIII_D/ChBD 領域の N 末端、C 末端、N 末端および C 末端にそれぞれ RGD 配列を導入した形の組換え FnIII_D/ChBD (それぞれ R-F/B, F/B-R および R-F/B-R) をコードする発現型プラスミドを構築した。さらに、ChBD 領域に対しても同様に RGD 配列を導入した組換え ChBD (それぞれ R-B, B-R および R-B-R) をコードする発現型プラスミドも併せて構築した。これら発現型プラスミドを導入した大腸菌 BL21(DE3) 株においては、各種組換えタンパク質 (図3) が大腸菌菌体内に生産されていることがわかった。

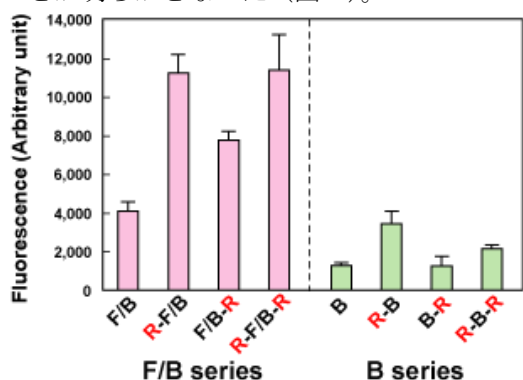


(図3) 各種組換えタンパク質の構造模式図

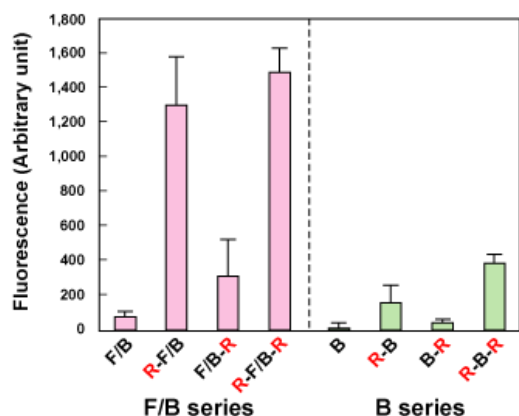
(2) 組換えタンパク質のキチンとの結合能を調べるために、不溶性キチンビーズを充填したカラムへの吸着実験を行った。試料としては各種発現型プラスミドを導入した大腸菌の無細胞抽出液を用いた。その結果、FnIII_D/ChBD 領域および ChBD 領域単独でもなおキチンへの結合能を十分に保持していることが明らかとなった。一方、FnIII_D 領域単独ではキチンへの結合能を示さないことがわかった。さらに、RGD 配列の付与により、FnIII_D/ChBD および ChBD 領域のキチン結合能は損なわれないことが確認された。

(3) 各種発現型プラスミドを導入した大腸菌の無細胞抽出液より、不溶性キチンを用いたアフィニティークロマトグラフィーによる組換え FnIII_D/ChBD および ChBD の精製を行った。ここで得られた各種組換えタンパク質精製標品を用いてヒトインテグリンとの結合能を ELISA により調べた。その結果、各種組換え FnIII_D/ChBD および ChBD はヒトインテグリン $\alpha 5\beta 1$ との結合能を有していることが明らかとなった (図4)。また、各種組換えタンパク質の細胞接着能を調べた結果、組換えタンパク質に対してマウス繊維芽細胞 3T3-L1 株の接着が認められた (図5)。さらに、組換え FnIII_D/ChBD は組換え ChBD に比して高いインテグリン結合能お

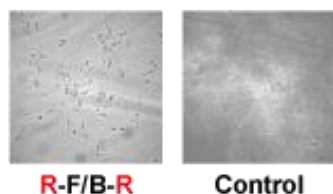
よび細胞接着能を有すること、RGD 配列の付与によりインテグリン結合能および細胞接着能の向上がみられたこと、そして組換えタンパク質 R-F/B-R が最も高いインテグリン結合能ならびに細胞接着能を示すことがわかった。また、組換えタンパク質 R-F/B-R を固定化したキチン不織布を用いて、マウス繊維芽細胞 3T3-L1 株の接着能評価を行った。その結果、組換えタンパク質 R-F/B-R はキチン不織布に対する細胞接着性を向上させることが明らかとなった (図 6)。



(図 4) 各種組換えタンパク質のヒトインテグリン結合能



(図 5) 各種組換えタンパク質のマウス繊維芽細胞接着能



(図 6) 組換えタンパク質 R-F/B-R を介してキチン不織布に接着したマウス繊維芽細胞の光学顕微鏡写真

(4) ChBD のキチン結合能向上を目指し、ChBD とグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質 GST-ChBD を用いたタンパク質工学検討を行った。アミノ酸置換を導入した融合タンパク質の結合

解析の結果、ChBD は芳香族アミノ酸 Trp541 および Trp542 を介したスタッキング相互作用により不溶性キチンと結合することがわかった。また、ChBD の分子表面に新たに芳香族アミノ酸の導入を試みた結果、Trp541 および Trp542 と直線的に並ぶ位置に Trp を導入することで、全体としての親和性は低下したものの、キチン分子上の認識可能部位が増えたことが示唆された。



(図 7) ChBD の立体構造モデル

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 19 件)

- ① F. Uni, S. Lee, R. Yatsunami, T. Fukui, and S. Nakamura, Mutational analysis of a CBM family 5 chitin-binding domain of an alkaline chitinase from *Bacillus* sp. J813, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 530-535 (2012) [査読有]
- ② S. Chen, F. Ye, H. Zhao, Y. Chena, Y. Chen, S. Nakamura, F. Arisaka and X. Xing, Mechanism of the thermal inactivation of a MBP-fused heparinase I: Biochemical investigations and kinetic modeling, *Biotechnol. Bioeng.*, 108, 1841-1851 (2011) [査読有]
- ③ R. Yazawa, J. Takakura, T. Sakata, Ihsanawati, R. Yatsunami, T. Fukui, T. Kumasaka, N. Tanaka and S. Nakamura, A calcium-dependent xylan-binding domain of alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 379-381 (2011) [査読有]
- ④ W. Tsukimura, K. Watanabe, C. Morokuma, R. Yatsunami, T. Fukui and S. Nakamura, Improvement of alkaliphily of thermostable GH family 10 xylanase from *Thermotoga maritima* by directed evolution, *J. Jpn. Soc. Extr.*, 9, 15-18 (2010) [査読有]
- ⑤ R. Yatsunami, M. Sato, K. Orishimo, Y. Hatori, Y. Zhang, T. Takashina, T. Fukui and S. Nakamura, Gene expression and characterization of a novel GH family 18 chitinase from extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* NRC-1, *J. Jpn. Soc. Extr.*, 9, 19-24 (2010) [査読有]
- ⑥ Y. Zhang, R. An, R. Yatsunami, M. Sato, K.

- Orishimo, Y. Hatori, T. Fukui and S. Nakamura, Characterization of a haloarchaeal GH family 18 chitinase with additional acidic amino acids on its protein surface, *J. Jpn. Soc. Extr.*, 9, 72-74 (2010) [査読有]
- ⑦ H. Umemoto, Ihsanawati, M. Inami, R. Yatsunami, T. Fukui, T. Kumasaka, N. Tanaka and S. Nakamura, Improvement of alkaliphily of *Bacillus* alkaline xylanase by introducing amino acid substitutions both on catalytic cleft and protein surface, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 965-967 (2009)[査読有]
- ⑧ N. Koizumi, S. Masuda, K. Maeda, Y. Isoda, R. Yatsunami, T. Fukui and S. Nakamura, Additional carbohydrate-binding modules enhance the insoluble substrate hydrolytic activity of beta-1,3-glucanase from alkaliphilic *Nocardia* sp. F96, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 1078-1082 (2009) [査読有]
- ⑨ H. Umemoto, R. Yazawa, J. Takakura, R. Yatsunami, T. Fukui and S. Nakamura, Analysis of functional domains and improvement of alkaliphily of an alkaline xylanase on the basis of its three-dimensional structure, *J. Appl. Glycosci.*, 57, 145-150 (2009) [査読有]
- ⑩ F. Uni, S. Lee, R. Yatsunami, T. Fukui and S. Nakamura, Role of exposed aromatic residues in substrate-binding of CBM family 5 chitin-binding module of alkaline chitinase. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 53, 311-312 (2009) [査読無]

[学会発表] (計 7 1 件)

- ① F. Uni, S. Lee, R. Yatsunami, T. Fukui and S. Nakamura, Mutational analysis of a CBM family 5 chitin-binding domain of alkaline chitinase, TOCAT6, July 18-23, 2010, Sapporo
- ② 中村 聡, ヘミセルロースの有効利用に向けたアルカリキシラナーゼの機能向上 (招待講演), 日本農芸化学会 2010 年度大会シンポジウム「多様な非デンプン性バイオマスからの効率的かつ多角的なバイオエタノール生産をめざす酵素化学の現状と展望」, 2010 年 3 月 30 日, 東京

[図書] (計 1 3 件)

- ① S. Nakamura, K. Nakasone and T. Takashina, Genetics and genomics of triangular disc-shaped halophilic archaeon *Haloarcula japonica* strain TR-1, “*Extremophiles Handbook*” (Ed. by K. Horikoshi), Springer, Tokyo, 2011, pp. 363-381
- ② 三原久和, 中村 聡, 小島英理, ソフトマテリアルとしてのタンパク質・ペプチド, 「ソフトマテリアルの応用展開」(西 敏夫・編), シーエムシー, 大阪, 2010, pp. 3-15

- ③ Y. Zhang, R. Yatsunami, Y. Hatori, M. Sato, K. Orishimo, T. Fukui and S. Nakamura, Halotolerance and organic-solvent tolerance of haloarchaeal chitinase, “*Biotechnology of Lignocellulose Degradation and Biomass Utilization*” (Ed. by K Sakka, S. Karita, T. Kimura, M. Sakka, H. Matsui, H. Miyake and A. Tanaka), Ito Print Pub. Div., Mie, 2009, pp. 442-447
- ④ W. Tsukimura, K. Watanabe, C. Morokuma, Ihsanawati, R. Yatsunami, T. Fukui, T. Kumasaka, N. Tanaka and S. Nakamura, Improvement of alkaliphily of family 10 xylanase from hyperthermophile *Thermotoga maritima*, “*Biotechnology of Lignocellulose Degradation and Biomass Utilization*” (Ed. by K Sakka, S. Karita, T. Kimura, M. Sakka, H. Matsui, H. Miyake and A. Tanaka), Ito Print Pub. Div., Mie, 2009, pp. 423-427
- ⑤ R. Yazawa, J. Takakura, T. Sakata, H. Miyakubo, Ihsanawati, H. Umemoto, R. Yatsunami, T. Fukui, T. Kumasaka, N. Tanaka, and S. Nakamura, Mutational analysis of CBM family 36 xylan-binding domain of alkaline xylanase. “*Biotechnology of Lignocellulose Degradation and Biomass Utilization*” (Ed. by K Sakka, S. Karita, T. Kimura, M. Sakka, H. Matsui, H. Miyake and A. Tanaka), Ito Print Pub. Div., Mie, 2009, pp. 448-454

[その他]

ホームページ等

<http://www.nakamura.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 聡 (NAKAMURA SATOSHI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：50227899

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

深川聡子 (FUKAGAWA SATOKO)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・学生