

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580104

研究課題名(和文) 結晶性キチン分解における芳香族アミノ酸残基の機能解明と - キチン分解機構への展開

研究課題名(英文) Elucidation of the role of aromatic amino acid residues in crystalline chitin hydrolysis and development to the mechanism of  $\alpha$ -chitin hydrolysis

研究代表者

渡邊 剛志 (WATANABE, TAKESHI)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：10201203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：キチンは多様な生物に存在する結晶性の構造多糖である。その酵素分解メカニズムの解明は、酵素科学的にも、生物学的にも、またバイオマス資源の利活用の面からも非常に重要である。本研究では、キチンを分解する酵素であるキチナーゼの、分子表面や触媒クレフトの内部に存在する芳香族アミノ酸残基が、強固な結晶性キチンのプロセス(連続的)な分解に決定的に重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chitin is a crystalline and rigid structural polysaccharide present in a variety of organisms. Elucidation of the mechanism underlying in the enzymatic degradation of crystalline chitin is very important not only from enzymological and biological view points, but also for utilization of biomass resources. In this study, critical roles of the aromatic amino acid residues, which are present on the surface of chitinase molecule and inside of its catalytic cleft, in processive hydrolysis of crystalline chitin was demonstrated.

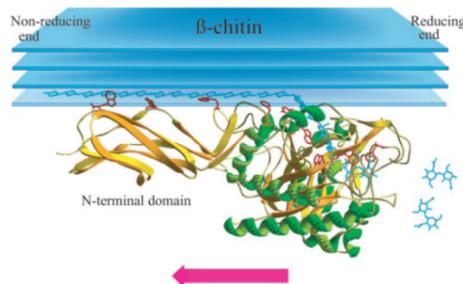
研究分野：応用微生物学

キーワード：キチナーゼ 結晶性キチン分解 *Serratia marcescens* 高速原子間力顕微鏡 芳香族アミノ酸残基

### 1. 研究開始当初の背景

キチンは、真菌類・藻類・甲殻類・昆虫・軟体動物をはじめとして多様な生物に存在し、構造多糖として重要な役割を果たしている。このようなキチンを分解する酵素であるキチナーゼにとって、強固な結晶構造を有するキチンの分解を可能にするメカニズムの解明は非常に本質的な課題であり、「新たな酵素科学分野の開拓」、「キチナーゼが関与する生物間相互作用の理解と応用」、「巨大な未利用バイオマス資源キチンの有効活用」に非常に重要である。

これまでの研究によって、結晶性キチン分解における、キチン結合ドメインや、触媒ドメイン表面の芳香族アミノ酸残基の重要性が明らかになってきた。そして、*Serratia marcescens* キチナーゼ A (SmChiA) の分子表面に存在する芳香族アミノ酸残基の変異実験などから、筆者らは下図のような細菌キチナーゼによる結晶性β-キチンの分解機構のモデルを提案した。すなわち、分子表面の3つのTrp残基や触媒クレフト内部の芳香族アミノ酸残基が重要な役割を果たし、キチナーゼ分子がキチンを分解しながらキチン表面を移動する「プロセッシングな結晶性キチン分解モデル」である。



その後、触媒クレフト内部の芳香族アミノ酸残基の部位特異的変異によって結晶性キチン分解活性が大幅に低下することが確かめられた。また、キチン鎖を逆方向に分解することが予想されていた SmChiA と本菌のもう一つのキチナーゼであるキチナーゼ B (SmChiB) が、実際にβ-キチン微小繊維の逆の末端をそれぞれ分解することが証明された。

これらの知見は、上記の結晶性キチン分解モデルを補強するものである。しかし、依然としてこのモデルは想像の域を出ず、その後結晶性キチン分解機構の理解はほとんど進まなかった。その最大の理由は、結晶性キチン表面におけるキチナーゼ分子の動きを観測する手段がなかったことにある。しかし、本研究が開始される少し前に、筆者らは高速原子間力顕微鏡を用いて高結晶性β-キチン微小繊維上を移動する SmChiA および SmChiB 分子の観察に成功した。これによって、結晶性キチン分解機構の研究を新たなレベルで展開できる可能性が見えて来た。

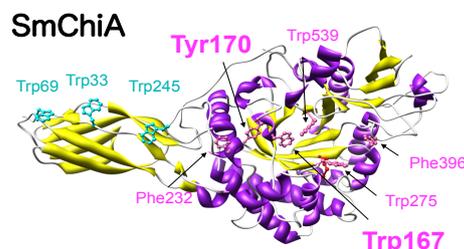
### 2. 研究の目的

長期的な意味での本研究の目的は、結晶性キチンの酵素分解機構を解明することである。これまでの研究で、結晶性キチン分解における、キチナーゼ分子表面および活性クレフト内部の芳香族アミノ酸残基の重要性が明らかになって来た。このことを踏まえて、本研究では次の2つを目的とした。

①結晶性キチン分解における芳香族アミノ酸残基の具体的な役割を、部位特異的変異の影響の酵素化学・生化学的解析と、高速原子間力顕微鏡による高結晶性キチン微小繊維上のキチナーゼの可視化(挙動の観察)を組み合わせることによって解明する。さらにその研究成果をもとに、②これまで分子レベルでの研究が不可能であった、キチナーゼによるα-キチン分解機構解明の端緒を開く。

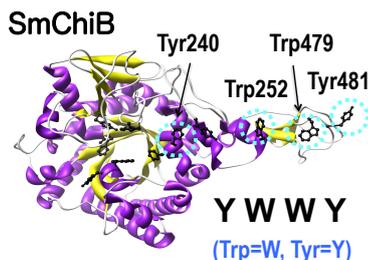
### 3. 研究の方法

結晶性キチン分解における、キチナーゼ分子表面および触媒クレフト内部の芳香族アミノ酸残基の機能を解明するために、これらの残基を部位特異的変異によりAlaに置換し、その影響を酵素化学・生化学的手法と高速原子間力顕微鏡を併用して解析した。部位特異的変異の標的としたのは、*S. marcescens* のキチナーゼ B (SmChiB) の分子表面に存在する4つの芳香族アミノ酸残基、およびキチナーゼ A (SmChiA) の触媒クレフト内部に存在する結晶性キチン分解に特に重要と考えられる芳香族アミノ酸残基である。



SmChiA および SmChiB の分子表面には芳香族アミノ酸残基が直線上に並んで露出している。これらの残基は、“結晶性キチン表面への結合”、“触媒クレフトへのキチン鎖の導入”、“結晶性キチン表面における酵素の移動”、に多機能的に関与しているものと予想される。また、触媒クレフト内部にも結晶性キチン分解に必須の芳香族アミノ酸残基があり、これらはクレフト内部のキチン鎖の移動に重要な役割を果たしているものと予想される。SmChiA 分子表面には Trp 残基が3つ、SmChiB 分子表面には2つの Trp (W) と2つの Tyr (Y) が触媒ドメイン側から Tyr・Trp・Trp・Tyr (YWYY) の順で露出している。そのため SmChiB は、SmChiA と異なり、Y→W の変異によって結晶性キチンへの結合活性を高める変異が可能と考えられた。また、多様な変異体が構築できるた

めより細かな結合活性の調節が可能である。



そのため、分子表面の芳香族アミノ酸残基の機能解析の実験には SmChiB を、触媒クレフト内部の芳香族アミノ酸残基の機能解析の実験には SmChiA を用いた。

野生型及び変異キチナーゼのキチン分解活性やキチンへの結合活性を、高結晶性のβ-キチンやコロイダルキチンなどの様々な形状のキチンを基質として分析し、部位特異的な変異の生化学的性質への影響を解析し、また高速原子間力顕微鏡を用いて結晶性キチン表面におけるキチナーゼ分子の挙動を観察することによって、プロセッシブ（連続的）なキチン分解への影響を解析した。

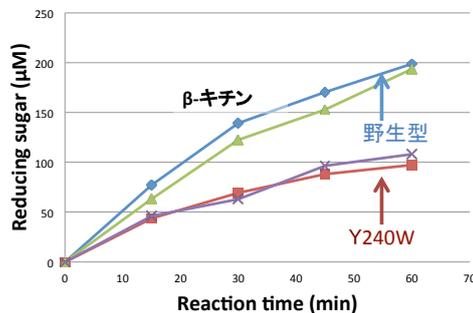
#### 4. 研究成果

キチナーゼ高生産菌である *Serratia marcescens* 2170 は、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー18 に属する 3 種類のキチナーゼ SmChiA、SmChiB、SmChiC と、キチンを酸化分解するキチン結合蛋白質 CBP21 を培地中に分泌する。これらの中で、SmChiA と SmChiB は結晶性キチン分解能が高いプロセッシブなキチナーゼである。本研究では、SmChiA を用いて結晶性キチン分解における触媒クレフト内部の芳香族アミノ酸残基の重要性とその機能を、SmChiB を用いて分子表面の芳香族アミノ酸残基の重要性とその機能を解明することを最も重要な課題として試みた。

##### 1) キチナーゼ分子表面の芳香族アミノ酸残基の結晶性キチン分解における重要性と機能

SmChiB の分子表面には、Y481、W479、W252、Y240 の4つの芳香族アミノ酸残基が触媒クレフトにむかって直線上に並んでいる。これらのアミノ酸残基の中の、Trp(W)を Tyr(Y)に、YをWに置換した6つの変異 SmChiB 遺伝子を構築し、大腸菌による生産とカラムクロマトグラフィーによる精製をおこなった。精製された野生型および変異 SmChiB を用いて、キチンに対する結合活性や分解活性を予備的に分析した結果、結合活性は W を Y に変えた変異によって低下し、Y を W に変えた変異によってやや上昇することがわかった。また、分解活性はすべての変異によって低下し、特に Y240 の変異が最も大きく低下させる傾向を示した。このように、Y を W に変異させることによる分解活性への影響が、触媒クレフトにもっとも近い Y240 と最も遠い Y481 の間で異なる可能性が示唆された。そのため、

Y240W 変異体と Y481W 変異体に着目し、その影響を高結晶性β-キチン微小繊維を基質としてより詳細に分析することにした。その結果、2つの変異体とも野生型より高い結合活性を示すことが確かめられ、さらに、Y481W 変異は分解活性に有意な影響を与えなかつ



結晶性キチン分解活性に対する、ChiB分子表面の芳香族アミノ酸残基の変異の影響

たのに対し、Y240W 変異は分解速度を大きく低下させることが確かめられた。

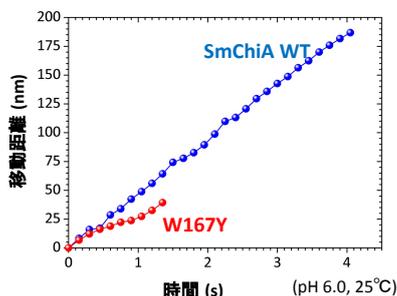
そこで次に、野生型および変異キチナーゼの結晶性基質上の挙動を高速原子間力顕微鏡により観察したところ、野生型 SmChiB はおよそ  $36.9 \pm 17.0$  nm/s の速度で高結晶性β-キチン微小繊維上を移動し、プロセッシブな分解が観察されたが、Y240W はほとんど移動しないことがわかった。これらの結果は、Y481 残基は基質への結合のみに寄与し、Y240 残基は基質への結合に加えてキチン鎖を触媒クレフト内部へ導き入れる役割を担っていることを強く支持している。

##### 2) 触媒クレフト内部の芳香族アミノ酸残基の、結晶性キチン分解における重要性と機能

SmChiA のマイナス側サブサイトに存在する W167 を Tyr(Y)に置換し、まずこの変異がキチンへの結合力や分解活性にどのような影響を及ぼすのかを生化学的手法により解析した。また、高速原子間力顕微鏡を用いて、野生型 SmChiA と W167Y の反応中の酵素1分子の挙動をリアルタイムで可視化し、酵素の移動距離(連続分解回数)や移動速度(分解速度)への影響を解析することを試みた。生化学的解析の結果、野生型 SmChiA と W167Y の高結晶性β-キチンへの結合力はほぼ同等であったが、W167Y の分解活性は野生型よりも顕著に低かった。このことから、W167 は結晶性キチン分解には重要であるが、結晶性キチン表面への結合には重要でないことがわかった。また、高速原子間力顕微鏡観察により、野生型 SmChiA と W167Y 変異体いずれも、キチン上を移動する分子が観察され、プロセッシブに分解する様子が捉えられた。しかし W167Y の場合、移動する分子が観察されはするものの、短時間で解離していく分子も野生型 SmChiA に比べて圧倒的に多く観察され、移動距離は顕著に短かった。一方移動速度に関しては、野生型 SmChiA と比較してそれほど大きな違いは認められなかった。これらの解析結果は、まだ解析に用いた分子の数が必

ずしも充分でない段階のものであり、さらに多くの分子の観察と解析が必要ではあるが、W167Y の分解活性の低下が連続分解回数の下に起因することを予想させる。

以上の結果は、W167 が結晶性キチンのプロ



高速原子間力顕微鏡による野生型 SmChiA と W167Y 変異体の移動距離と速度の解析例

セッシブな分解に非常に重要であり、基質であるキチン鎖を触媒部位に向ってスライドさせる上で重要な役割を果たしているという考えを強く支持している。また、Tyr の方が Trp よりも基質との間の相互作用が弱いと考えられることから、プロセッシブな分解に伴うキチン鎖の触媒クレフト内部でのスライド（移動）には、W167 と基質との間に働く比較的強い相互作用が重要であることが示唆された。

以上のように、SmChiB の分子表面の芳香族アミノ酸残基の部位特異的変異によって、触媒クレフト近傍の芳香族アミノ酸残基がプロセッシブなキチン分解に特に重要であることが示された。また SmChiA の触媒クレフト内部の芳香族アミノ酸残基の部位特異的変異によって、サブサイトマイナス側の芳香族アミノ酸残基の変異がプロセッシブな分解活性を大幅に低下させることがわかった。これらの結果は、キチナーゼ分子表面の芳香族アミノ酸残基が「結晶性キチン表面への結合と活性クレフトへのキチン鎖の導入に多機能的に働き」、また触媒クレフト内部の芳香族アミノ酸残基が「クレフト内部におけるキチン鎖の移動に重要な役割を果たしている」、という筆者らの考えを強力に支持するものである。

今回、 $\alpha$ -キチンの分解機構解明のための直接的な実験に着手することはできなかったが、上記の研究成果と、それを得る過程で蓄積された研究手法と解析技術は、海洋藻類 *Phaeocystis* 由来の高結晶性  $\alpha$ -キチン微小繊維を基質とした  $\alpha$ -キチン分解機構解明のための研究基盤となる。今後、高結晶性  $\beta$ -キチンを基質とした結晶性キチン分解機構の解明をさらに深化させつつ、 $\alpha$ -キチン分解機構解明のための実験に具体的に着手する予定である。

## 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 10 件)

- ① Two-way traffic of glycoside hydrolase family 18 processive chitinases on crystalline chitin. (2014) Igarashi K, Uchihashi T, Uchiyama T, Sugimoto H, Wada M, Suzuki K, Sakuda S, Ando T, Watanabe T, Samejima M, Nature Commun. 5: Article number 3975. (査読あり) (Igarashi と Watanabe が共同責任著者) DOI: 10.1038/ncomms4975.
- ② Construction and basic characterization of deletion mutants of the genes involved in chitin utilization by *Serratia marcescens* 2170. (2014) Takanao S, Honma S, Miura T, Ogawa C, Sugimoto H, Suzuki K, Watanabe T, Biosci Biotechnol Biochem. 78(3): 524-32. (査読あり) DOI: 10.1080/09168451.2014.882755.
- ③ (総説) *Serratia marcescens* のキチン分解利用機構. (2014) 渡邊剛志, 杉本華幸, 鈴木一史. キチン・キトサン研究 20(1): 4-15. (査読あり)
- ④ (総説) キチナーゼによる結晶性キチンのプロセッシブ(連続的)な分解機構の解明. (2014) 杉本華幸, 五十嵐圭日子, 内橋貴之, 鈴木一史, 渡邊剛志. 応用糖質科学 4(2): 107-112. (査読あり)
- ⑤ Involvement of Gln679, in addition to Trp687, in chitin-binding activity of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. (2013) Hara M, Sugimoto H, Uemura M, Akagi K, Suzuki K, Ikegami T, Watanabe T, J Biochem. 54(2): 185-93. (査読あり) DOI: 10.1093/jb/mvt043.
- ⑥ Regulation of chitinase production by the 5'-untranslated region of the *ybfm* in *Serratia marcescens* 2170. (2012) Toratani T, Suzuki K, Shimizu M, Sugimoto H, Watanabe T, Biosci Biotechnol Biochem. 76(10):1920-4. (査読あり)
- ⑦ *Serratia marcescens* induces apoptotic cell death in host immune cells via a lipopolysaccharide- and flagella-dependent mechanism. (2012) Ishii K, Adachi T, Imamura K, Takano S, Usui K, Suzuki K, Hamamoto H, Watanabe T, Sekimizu K, J Biol Chem. 287(43): 36582-92. (査読あり) DOI: 10.1074/jbc.M112.399667.

[学会発表] (計 25 件)

- ① *Serratia marcescens* 2170 のキチン分解利用機構の解明: ChiD, Ctb の発現系構築と CBP21 欠損株の構築. 今井裕也、五十嵐瑞穂、三浦拓馬、桜井大地、杉本華幸、鈴木一史、渡邊剛志 (2015) 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 26-29 日, 岡山大学.
- ② Chitin degradation and utilization system of *Serratia marcescens* 2170. --Role and regulation of the *chiPQ-ctb* operon-- T. Watanabe, T. Miura, H. Minami, C. Ogawa, S.

- Honma, H. Sugimoto, and K. Suzuki. (2014) MIE BIOFORUM 2014 -Lignocellulose Degradation and Biorefinery-, 2014年11月18-21日 Shima, Mie, Japan.
- ③ (招待講演)細菌のキチナーゼとキチン分解利用機構. 渡邊剛志、杉本華幸、鈴木一史、第28回キチン・キトサンシンポジウム特別セッション、2014年8月7-8日、順天堂大学.
- ④ *Serratia marcescens* 2170 のキチン分解利用機構 -*chiPQ-ctb* オペロンの機能解析-. 三浦拓馬、本間祥太、杉本華幸、鈴木一史、渡邊剛志 第28回キチン・キトサンシンポジウム 2014年8月7-8日、順天堂大学.
- ⑤ *Serratia marcescens* 2170 のキチン分解利用機構 ---*chiPQ-ctb* オペロンの機能---. 三浦拓馬、今井裕也、小川知佐奈、杉本華幸、鈴木一史、渡邊剛志 (2014)日本農芸化学会2014年度大会. 2014年3月27-30日、明治大学.
- ⑥ (招待講演) Chitin degradation and utilization system of *Serratia marcescens* 2170. Takeshi Watanabe, Hayuki Sugimoto, Kazushi Suzuki, 10th Asia-Pacific Chitin & Chitosan Symposium. Oct. 4-8 (2013) Yonago Convention Center, "Big Ship", Yonago, Japan.
- ⑦ Studies on mechanism of crystalline chitin hydrolysis by *Serratia marcescens* chitinase B using high-speed atomic force microscopy. H. Sugimoto, K. Nakamura, Y. Nishino, A. Fujinuma, H. Watanabe, T. Uchihashi, T. Ando, K. Igarashi, M. Wada, M. Samejima, K. Suzuki, and T. Watanabe. 10th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium. Oct. 4-8 (2013) Yonago Convention Center, "Big Ship", Yonago, Japan.
- ⑧ Regulation of chitin degradation and utilization system by ChiX small RNA in *Serratia marcescens*. K. Suzuki, N. Sasaki, C. Ogawa, M. Shimizu, S. Takano, H. Sugimoto, and T. Watanabe. 10th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium Oct. 4-8 (2013) Yonago Convention Center, "Big Ship", Yonago, Japan.
- ⑨ 構造一体型キチナーゼ *Serratia marcescens* キチナーゼ B の結晶性キチン分解機構の解明とフレキシブル型キチナーゼとの比較解析. 杉本華幸、中村啓太、西野裕史、藤沼晶子、橋詰義夫、丸屋良輔、五十嵐圭日子、鮫島正浩、渡辺大輝、内橋貴之、安藤敏夫、鈴木一史、渡邊剛志 日本農芸化学会2013年度大会. 2013年3月24-27日、東北大学.
- ⑩ 高速原子間力顕微鏡観察を用いた *Serratia marcescens* キチナーゼ B の結晶性キチン分解機構の解明. 杉本華幸、藤沼晶子、中村啓太、西野裕史、五十嵐圭日子、鮫島正浩、渡辺大輝、内橋貴之、安藤敏夫、鈴木

一史、渡邊剛志 第85回日本生化学会大会  
2012年12月14-16日、福岡国際会議場  
マリンメッセ福岡.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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：  
出願年月日：  
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

渡邊 剛志 (WATANABE, Takeshi)  
新潟大学・自然科学系・教授  
研究者番号：10201203

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

五十嵐 圭日子 (IGARASHI, Kiyohiko)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科  
・准教授  
研究者番号：80345181

鈴木 一史 (SUZUKI, Kazushi)  
新潟大学・自然科学系・准教授  
研究者番号：00444183

杉本 華幸 (SUGIMOTO, Hayuki)  
新潟大学・自然科学系・助教  
研究者番号：60529527