

令和 2 年 5 月 5 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K05839

研究課題名(和文)好アルカリ性放線菌に由来する各種GHファミリー18キチナーゼの性質検討と機能改変

研究課題名(英文)Characterization and functional modification of GH family 18 chitinases from alkaliphilic bacteria

研究代表者

中村 聡 (NAKAMURA, Satoshi)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：50227899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：GHファミリー18(GH18)キチナーゼには、触媒活性を担うGH18触媒ドメイン以外に、キチン結合ドメイン(ChBD)、フィブロネクチンタイプIII様ドメイン(FnIIIID)、およびキチナーゼ挿入ドメイン(CID)などの付加ドメインを有するものが知られているが、それらの役割は不明であった。各種付加ドメインを入れ替えたキメラ酵素の性質検討の結果、CIDの存在はエキソ型の切断やプロセッシビティの度合いを高めることがわかった。そして、ChBDおよびFnIIIIDは不溶性キチンに対するエキソ型の切断やプロセッシビティの度合いを高める可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GH18キチナーゼには、GH18触媒ドメインのみからなるシングルドメイン酵素のほか、ChBD、FnIIIIDおよびCIDといった付加ドメインを有するマルチドメイン酵素も存在する。また、エンド型とエキソ型の酵素が混在しており、プロセッシビティを示すものも知られている。本研究は、そのような多様な切断様式に及ぼす各種付加ドメインの役割を解明することを目的としている。付加ドメインを入れ替えたキメラ酵素を網羅的に調製し、種々の基質を用いて詳細な解析を行うことで、長年にわたる懸案事項を一気に解決しようとする点に本研究の学術的意義があり、産業界への波及効果も大きい。

研究成果の概要(英文)：GH family 18 (GH18) chitinases are known to have some additional domains, such as a chitin-binding domain (ChBD), a fibronectin type III-like domain (FnIIIID) and a chitinase insertion domain (CID), as well as a GH18 catalytic domain. The role of additional domains in chitin hydrolysis remains unclear to date. In order to clarify the role of the additional domains, many chimeric enzymes were prepared and characterized. The CID proved to contribute to exo-type digestion and processivity against soluble and insoluble chitins. Furthermore, the ChBD and FnIIIID might also contribute to exo-type digestion and processivity against insoluble chitin.

研究分野：生体関連化学

キーワード：GH18キチナーゼ マルチドメイン酵素 触媒ドメイン キチナーゼ挿入ドメイン キチン結合ドメイン
エンド型 エキソ型 プロセッシビティ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

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 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 結合を加水分解する酵素がキチナーゼである。キチナーゼは、キチン鎖の中間を加水分解するエンド型と、キチン鎖の末端から加水分解するエキソ型に分類される。

キチナーゼの触媒ドメイン(CatD)は、そのアミノ酸配列の相同性に基づき、GH ファミリー 18 (GH18) と 19 に分類される。GH18 キチナーゼには、触媒活性を担う CatD 以外に、キチン結合ドメイン (ChBD)、フィブロネクチンタイプ 様ドメイン (FnIID) などの付加ドメインを有するものが知られている。また、GH18 キチナーゼの中には、CatD 中にキチナーゼ挿入ドメイン(CID)とよばれる挿入配列を含むものがある。GH18 キチナーゼはもともとエンド型の切断様式をとるが、CID を含む酵素では、CID がクレフトを深めることで、見かけ上、エキソ型の切断様式をとるといわれている。しかしながら、GH18 キチナーゼの示すエンド型・エキソ型の多様な切断様式に及ぼす、ChBD、FnIID および CID といった各種付加ドメインの役割には不明な点が多く残されていた。

ある種の GH18 キチナーゼは、結晶性キチンを末端から連続的 (プロセッシブ) かつ効率的に加水分解する。このような連続反応性 (プロセッシビティ) を示すキチナーゼは、一般に CatD 以外にキチン結合ドメイン(ChBD)のような付加ドメインを有する。ChBD の分子表面に存在する芳香族アミノ酸が CatD の深いクレフトに向かって直線上に並ぶことで、CatD 中のサブサイトを延長している。これらの芳香族アミノ酸は結晶性キチンから 1 本のキチン分子鎖を引きはがし、クレフトに導く働きがあるとされるが、プロセッシブな加水分解機構に及ぼす各種付加ドメインの役割の詳細も不明であった。

2. 研究の目的

GH18 キチナーゼには、GH18 CatD のみからなるシングルドメイン酵素のほか、ChBD、FnIID および CID といった付加ドメインを有するマルチドメイン酵素も存在する。また、エンド型とエキソ型の酵素が混在しており、プロセッシビティを示すものも知られている。本研究では、付加ドメインを入れ替えたキメラ酵素を網羅的に調製し、種々の基質を用いて詳細な解析を行うことで、GH18 キチナーゼの多様な切断様式に及ぼす各種付加ドメインの役割解明を目指す。

3. 研究の方法

好アルカリ性放線菌 *Nocardioopsis* sp. F96 株由来 GH18 キチナーゼ ChiF1 は GH18 CatD のみからなるシングルドメイン構造をとり、CatD 中には CID を含まない。一方で、F96 株由来 GH18 キチナーゼ ChiF3 はマルチドメイン構造をとり、ChBD、FnIID および CID を含む GH18 CatD から構成される。また、好アルカリ性細菌 *Bacillus* sp. J813 株由来 GH18 キチナーゼ ChiJ は、CID を含む GH18 CatD、FnIID および ChBD から構成される。本研究では、ChiF1、ChiF3 および ChiJ を基盤とするキメラ酵素を網羅的に調製した (図 1)。そして、キチンオリゴ糖 [(GlcNAc)₆]、p-ニトロフェニル化キチンオリゴ糖 [pNP-(GlcNAc)₅]、可溶性キチン(グリコールキチン)および不溶性キチン基質に対する切断様式を詳細に検討した。

4. 研究成果

以下に、本研究の成果を項目毎に概説する。

(1) 各種キメラ酵素の調製

本研究で使用する各種キメラ酵素および変異型酵素をコードする発現型プラスミドを構築し、野生型酵素とともに、大腸菌における発現と精製を行った。各種酵素は大腸菌の菌体内で可溶性タンパク質として高効率生産され、一部の酵素を除き、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動においてほぼ単一バンドを示す精製標品が得られた。

(2) キチンオリゴ糖および p-ニトロフェニル化キチンオリゴ糖を用いた加水分解様式の解析

野生型 ChiF1、ChiF1 に ChiF3 および ChiJ 由来 CID を挿入した各種キメラ酵素ならびに野生型 ChiJ から FnIID および ChBD を欠失した変異型酵素を用い、キチンオリゴ糖 (GlcNAc)₆ に対する加水分解様式の解析を行った。その結果、CID をもたない野生型 ChiF1 はエンド型の切断様式をとることが明らかとなった。一方、CID をもつ各種酵素は、ChiF1 に比して、エキソ型の切断の度合いが高いことがわかった。また、p-ニトロフェニル化キチンオリゴ糖 pNP-(GlcNAc)₅ 加水分解産物の HPLC 解析の結果、CID をもつ各種酵素は、キチン鎖を非還元末端側から 2 糖単位で連続的に切断するプロセッシビティを有する可能性が示唆され

た。これらの結果から，CID の存在はエキソ型の切断やプロセッシビティの度合いを高めることが考えられた。

(3) 可溶性キチンを用いた加水分解様式の解析

野生型酵素，各種キメラ酵素および変異型酵素を用い，可溶性のグリコールキチン基質に対する加水分解様式の解析を行った。その結果，反応初期段階でのエキソ型の切断の度合いは，CatD が ChiJ 由来か ChiF1 由来かに大きく依存した。すなわち，CID を含む ChiJ 由来の CatD をもつ酵素は，CID を含まない ChiF1 由来の CatD をもつ酵素に比して，反応初期段階でのエキソ型の切断様式の度合いが高い結果となった。また，オリゴ糖基質の加水分解の結果とは異なり，ChiF1 の CatD 中に CID を挿入したキメラ酵素によるグリコールキチンの加水分解では，エキソ型の切断の度合い向上は観察されなかった。さらに，グリコールキチンを基質とした場合、ChiF1 への ChBD および FnIIID の付加はエキソ型の切断の度合いの低下を招いた一方で，ChiJ へ ChBD および FnIIID の付加はエキソ型の切断の度合いに大きな変化を与えず，可溶性キチン基質の加水分解に及ぼす ChBD および FnIIID の役割を普遍化するには至らなかった。

(4) 不溶性キチンを用いた加水分解様式の解析

野生型酵素，各種キメラ酵素および変異型酵素を用い，不溶性キチン基質に対する加水分解様式の解析を行った。最終加水分解産物の解析の結果，ChiJ の ChBD および FnIIID は，ChiF1 および ChiJ の CatD の C 末端側に存在する場合に限って，不溶性キチンに対するエキソ型の切断やプロセッシビティの度合いを高める機能を有することが示唆された。これは，プロセス的な分解に際してはスライディングの方向性があるため，キチナーゼを構成するドメイン (CatD，ChBD および FnIIID など) やそれらの並ぶ順番が重要であるためと考えられる。

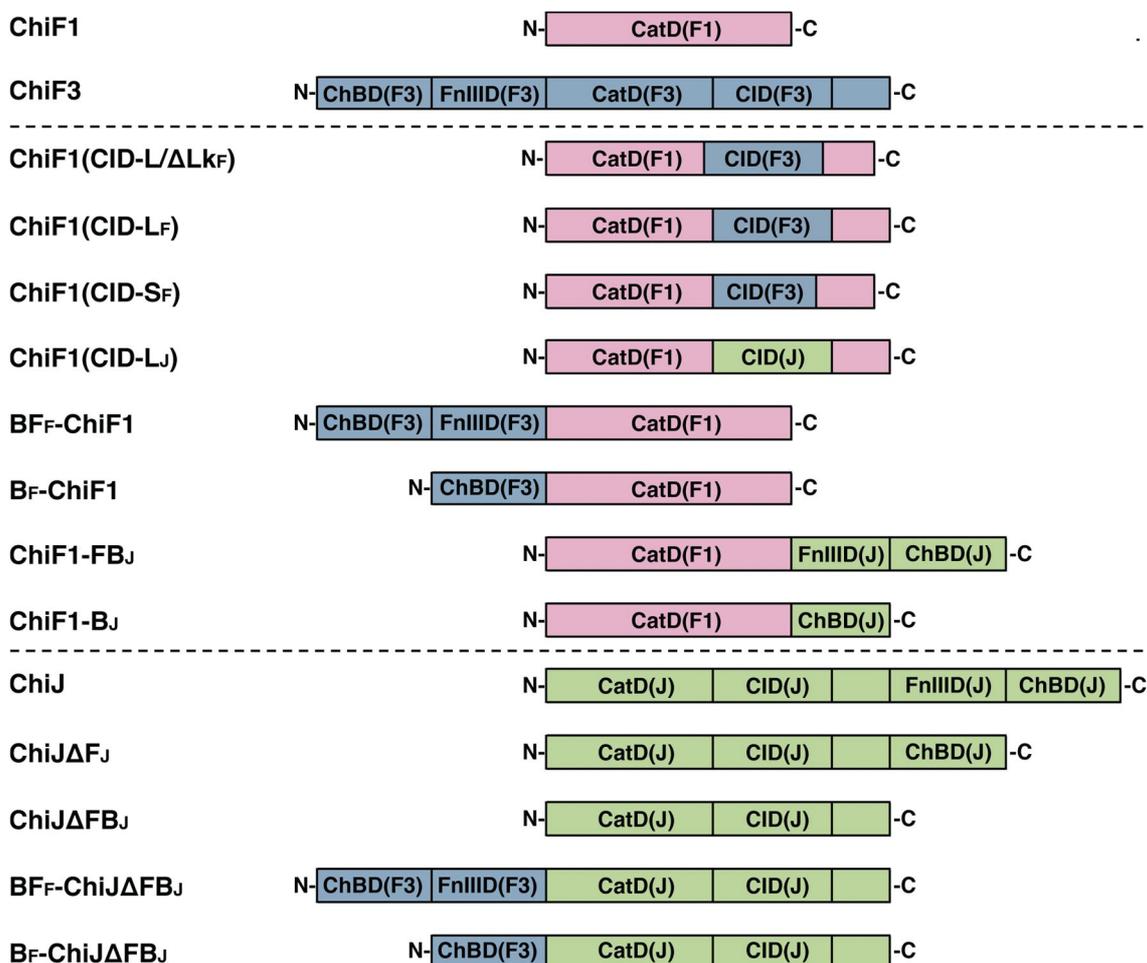


図 1 本研究で使用した野生型酵素，各種キメラ酵素および変異型酵素のドメイン構成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Keiko Okuda, Kiseki Ito, Yusuke Hagiwara, Tomohiro Okeda, Rie Yatsunami, Toshiaki Fukui and Satoshi Nakamura	4. 巻 18
2. 論文標題 Characterization of novel arabinofuranosidases from <i>Paenibacillus</i> sp. strain H2C	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Society for Extremophiles	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Yusuke Hagiwara, Yasuhiro Mihara, Koichi Sakagami, Ryuta Sagara, Undramaa Bat-Erdene, Rie Yatsunami and Satoshi Nakamura	4. 巻 84
2. 論文標題 Isolation of four xylanases capable of hydrolyzing corn fiber xylan from <i>Paenibacillus</i> sp. H2C	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 640-650
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Teisuke Takita, Kota Nakatani, Yuta Katano, Manami Suzuki, Kenji Kojima, Naoki Saka, Bunzo Mikami, Rie Yatsunami, Satoshi Nakamura, Kiyoshi Yasukawa	4. 巻 130
2. 論文標題 Increase in the thermostability of GH11 xylanase XynJ from <i>Bacillus</i> sp. strain 41M-1 using site saturation mutagenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Enzyme and Microbial Technology	6. 最初と最後の頁 109363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109363	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 Kinuka Toyama, Daiki Misu, Rei Kajitani, Kimiko Endo, Tetsuya Fukazawa, Rie Yatsunami, Takehiko Ito, Toshiaki Fukui and Satoshi Nakamura	4. 巻 16
2. 論文標題 Characterization of a novel multi-domain chitinase from alkaliphilic <i>Nocardiosis</i> sp. strain F96	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Society for Extremophiles	6. 最初と最後の頁 37-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 石井 稔, 遠山絹華, 戸松彩理, 大竹 潤, 八波利恵, 福居俊昭, 中村 聡	4. 巻 26
2. 論文標題 好アルカリ性細菌由来 GH18 キチナーゼを構成する 各種ドメインの機能解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 キチン・キトサン研究	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Kota Nakatani, Yuta Katano, Kenji Kojima, Teisuke Takita, Rie Yatsunami, Satoshi Nakamura, and Kiyoshi Yasukawa	4. 巻 82
2. 論文標題 Increase in the thermostability of Bacillus sp. strain TAR-1 xylanase using a site saturation mutagenesis library	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1715-1723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Toshitaka Matsubara, Kosuke Fujishima, Chad W. Saltikov, Satoshi Nakamura and Lynn J. Rothschild	4. 巻 2016
2. 論文標題 Earth analogues for past and future life on Mars: isolation of perchlorate resistant halophiles from Big Soda Lake	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 International Journal of Astrobiology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1017/S1473550416000458	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 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Keiko Okuda, Bat-Erdene Undramaa, Yusuke Hagiwara, Koichi Sakagami, Yasuhiro Mihara, Rie Yatsunami, Toshiaki Fukui, Satoshi Nakamura
2. 発表標題 Cleavage specificities of GH10 xylanases from Paenibacillus sp. H2C
3. 学会等名 The 20th Biocatalysis Symposium of Japan
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸松彩理, 遠山絹華, 八波利恵, 福居俊昭, 中村 聡
2. 発表標題 好アルカリ性細菌 <i>Bacillus</i> sp. J813 株由来 GH18 キチナーゼに存在する挿入ドメインの機能解明
3. 学会等名 第31回日本キチン・キトサン学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 遠山絹華, 三須大樹, 梶谷 嶺, 遠藤きみ子, 深沢徹也, 八波利恵, 伊藤武彦, 福居俊昭, 中村 聡
2. 発表標題 好アルカリ性放線菌 <i>Nocardiopsis</i> sp. F96由来GHファミリー18キチナーゼChiF1およびChiF3の性質検討
3. 学会等名 第30回キチン・キトサン学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kinuka Toyama, Daiki Misu, Rei Kajitani, Kimiko Endo, Tetsuya Fukazawa, Rie Yatsunami, Takehiko Ito, Toshiaki Fukui, Satoshi Nakamura
2. 発表標題 Characterization of GH Family 18 Chitinases from Alkaliphilic Actinomycete <i>Nocardiopsis</i> sp. Strain F96
3. 学会等名 Extremophiles 2016 (11 th International Congress on Extremophiles) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 遠山絹華, 三須大樹, 梶谷 嶺, 遠藤きみ子, 深沢徹也, 康 斐, 八波利恵, 伊藤武彦, 福居俊昭, 中村 聡
2. 発表標題 好アルカリ性放線菌 <i>Nocardiopsis</i> sp. F96株由来 GH ファミリー18キチナーゼの性質検討および各ドメインの機能解明
3. 学会等名 極限環境生物学会2016年度(第17回)年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Keiko Okuda, Bat-Erdene Undramaa, Yusuke Hagiwara, Koichi Sakagami, Yasuhiro Mihara, Rie Yatsunami, Toshiaki Fukui, Satoshi Nakamura
2. 発表標題 Cleavage specificities of GH10 xylanases from <i>Paenibacillus</i> sp. H2C
3. 学会等名 The 20th Biocatalysis Symposium of Japan (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井 稔, 遠山絹華, 戸松彩理, 大竹 潤, 八波利恵, 福居俊昭, 中村 聡
2. 発表標題 好アルカリ性細菌由来GH18キチナーゼを構成する各種ドメインの機能解析
3. 学会等名 第33回日本キチン・キトサン学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野 遥, 重光千彩, 遠山絹華, 八波利恵, 福居俊昭, 中村 聡
2. 発表標題 高度好塩性古細菌 <i>Halobacterium salinarum</i> 由来GH18キチナーゼChiN1およびChiN2 類縁菌 <i>Haloarcula japonica</i> における発現と性質検討
3. 学会等名 第33回日本キチン・キトサン学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井 稔, 遠山絹華, 戸松彩理, 大竹 潤, 八波利恵, 福居俊昭, 中村 聡
2. 発表標題 細菌由来GH18 キチナーゼを構成する各種ドメインの機能解析
3. 学会等名 酵素工学研究会第82回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野 遥, 重光千彩, 遠山絹華, 八波利恵, 福居俊昭, 中村 聡
2. 発表標題 Halobacterium salinarum由来好塩性GH18キチナーゼChiN1およびChiN2の性質および付加ドメインの役割
3. 学会等名 酵素工学研究会第82回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 聡
2. 発表標題 極限酵素のタンパク質工学と指向性進化
3. 学会等名 第124回触媒討論会(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 中村 聡・著, 高鳥浩介, 久米田裕子, 土戸哲明, 古畑勝則・監修	4. 発行年 2016年
2. 出版社 株式会社テクノシステム	5. 総ページ数 664 (72-75)
3. 書名 有害微生物の制御と管理 現場対応への実践的な取り組み	

1. 著者名 中村 聡, 中島春紫, 伊藤政博, 道久則之, 八波利恵	4. 発行年 2019年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 224
3. 書名 新版 ビギナーのための微生物実験ラボガイド	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ヘミセルラーゼ	発明者 味の素株式会社	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2019-162036	出願年 2016年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 Hemicellulase	発明者 Ajinomoto Co., Inc.	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、USP16/266542	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>中村（聡）・八波研究室ホームページ http://www.nakamura.bio.titech.ac.jp (2020年3月31日付での中村 聡の定年退職に伴い、当該ホームページは削除予定)</p>
--

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
---------------------------	-----------------------	----