

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17740

研究課題名（和文）基質をスライドさせて連続反応を行う結晶性多糖分解酵素・キチナーゼの作動機構の解明

研究課題名（英文）Studies on subsites of processive chitinases

研究代表者

杉本 華幸 (SUGIMOTO, Hayuki)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：60529527

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）：本研究では、連続分解型キチナーゼBcChiA1を主対象として、触媒クレフトに並ぶサブサイト（基質と結合する部位）が基質分解反応の速度パラメータにおよぼす影響を定量的に解析することで、個々のサブサイトの役割を明らかにした。基質導入の入口側に位置するサブサイトは酵素-基質複合体の形成、出口側のサブサイトは生成物の解離の各素過程において重要であることが分かった。中央付近のサブサイトは両素過程へ寄与していると考えられた。連続的に基質を分解するには、出口側サブサイトの方の寄与が入口側に比べて重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、連続反応性をもち、触媒効率のよい連続分解型キチナーゼのサブサイト（基質と結合する部位）に着目して解析を行い、どのようにして連続的に反応を行うことができるのか、その作動機構の一端を明らかにした。これらの知見は、触媒効率向上のための酵素分子デザインの基盤となる。また、研究対象としたキチナーゼは、結晶性多糖バイオマスのリファイナリーや利活用において欠くことのできない産業用酵素の候補である。結晶性多糖バイオマス資源の酵素分解法の開発に本研究成果を応用することで、環境への負荷の少ない分解・利活用法を確立し、カーボンニュートラル社会の実現の一助として貢献できる

研究成果の概要（英文）：Several subsites for substrate binding are lined in the catalytic domain of a processive-type chitinase, BcChiA1. The individual roles of these subsites during the processive hydrolysis reaction remain unknown. Direct kinetic comparisons of the mutants which the amino acid residue at each subsite was substituted were performed, aiming to characterize each subsite. Effects of the mutation at the subsites on the kinetic parameters for the hydrolysis of crystalline beta-chitin differed depending on the location of the subsite in the catalytic domain. It was suggested that for the processive hydrolysis of a substrate, the subsite at the exit of the catalytic domain is more important than that at the entrance.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：連続分解 キチナーゼ サブサイト 芳香族アミノ酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

連続反応酵素は、反応後基質が解離せず、触媒部位へスライドして連続反応する効率的な触媒である。連続反応性は DNA 等のポリマー関連酵素で多く報告されており、ATP 分解の共役等を利用して、連続的に反応する。

連続分解型キチナーゼはキチン [*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) がグリコシド結合で重合した結晶性多糖] に作用する糖質加水分解酵素で、単量体で機能し、ATP 等の外部エネルギーを必要としないシンプルで効率のよい連続反応酵素である。

連続分解型キチナーゼの触媒ドメインには、基質である GlcNAc 残基と相補的に相互作用する複数のサブサイトが並んでおり、内部の芳香族残基が基質とスタッキング相互作用を形成する。連続分解では、各サブサイトにおける基質との親和力とその並び方 (配列状態) が重要と予想される。

2. 研究の目的

連続分解型キチナーゼの作動機構については、キチン資化能に優れた細菌 *Serratia marcescens* が分泌するキチナーゼ A (SmChiA) をモデル酵素として主な研究が進められてきた。SmChiA の触媒ドメインには、サブサイトが 8 個存在する (-6 から +2)。このなかで -3 サブサイトのトリプトファン残基 (W167) を欠損させると、連続分解性が減少し分解活性が低下することがわかり、連続分解反応におけるサブサイト -3 の重要性が報告されている (Zakariassen et al., J. Biol. Chem., 284, 10610-10617, 2009)。しかし、本知見は SmChiA にもみ報告されており、他の連続分解型キチナーゼの反応機構においても共通であるのかはわかっていない。

本研究では、*Bacillus circulans* が分泌する連続分解型キチナーゼ、BcChiA1 を新規解析酵素として、サブサイト体系的な解析を実施した。BcChiA1 と SmChiA の触媒ドメインの配列同一性は 34% であるが、X 線結晶構造回析から明らかにされた両触媒ドメインの RMSD は 0.99 Å と小さく、非常によく似ている。BcChiA1 にもサブサイトが 8 個存在する (Fig. 1)。しかし、サブサイト内の芳香族アミノ酸残基が SmChiA と異なる部位が存在する (-6 および +2 サブサイト)。両酵素を比較解析することで、サブサイト -3 の役割の普遍性や各サブサイトの機能について詳細な知見を得ることが期待される。本研究では、BcChiA1 について、酵素反応の速度論解析を中心に行った。得られた知見に基づき、BcChiA1 と SmChiA の比較を行い、連続分解型キチナーゼの作動機構における個別のサブサイトの役割を明らかにすることを目的とした。

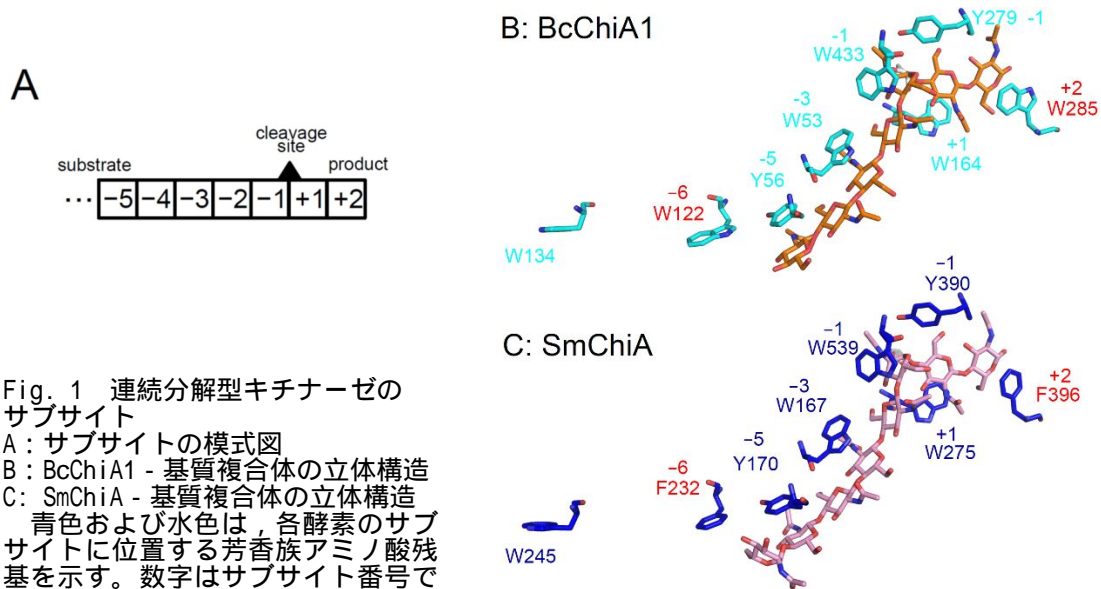


Fig. 1 連続分解型キチナーゼのサブサイト

A: サブサイトの模式図

B: BcChiA1 - 基質複合体の立体構造

C: SmChiA - 基質複合体の立体構造

青色および水色は、各酵素のサブサイトに位置する芳香族アミノ酸残基を示す。数字はサブサイト番号である。オレンジ色およびピンク色は、基質を示す。

3. 研究の方法

本研究では、連続分解型キチナーゼやそれらのアミノ酸置換体について、酵素反応の速度論解析を中心に行った。

(1) 結晶性β-キチンを基質とした酵素反応の解析系の確立

分散・微砕均一化処理を行った結晶性β-キチンを基質として使用することで、酵素反応の初速度を精度よく評価する方法を検討した。初速度の基質濃度依存性を調べ、その結果に基づいて、酵素反応を特徴付ける各種パラメータを評価した。

(2) 2種の連続分解型キチナーゼの比較解析

先行研究において知見が蓄積されているモデル酵素・SmChiAのほかに、BcChiA1を新規解析酵素として加えて、同一ロットの基質を用いて酵素反応の速度論解析を行い、速度論パラメータを直接比較した。基質として、結晶性 β -キチン（連続分解される基質）とキトサン（結晶性 β -キチンに比べて、連続分解されにくい基質）を用いた。

(3) -3サブサイトの解析

BcChiA1とSmChiAの-3サブサイトに位置するトリプトファン残基（BcChiA1ではW53, SmChiAではW167）をアラニンへ置換した変異型酵素を用いて酵素反応の速度論解析を行い、連続分解型キチナーゼによる酵素反応において、-3サブサイトの重要性は普遍性があるのかを検討した。

(4) -6および+2サブサイトの解析

BcChiA1とSmChiAの8個のサブサイトのうち、-6および+2サブサイトでは、存在する芳香族アミノ酸残基の種類が異なる（Fig. 1）。SmChiAの場合、いずれもフェニルアラニン残基が存在する。他方、BcChiA1では、W122（-6サブサイト）とW285（+2サブサイト）がそれぞれ存在する。これらのサブサイトのアミノ酸置換体を調製し、酵素反応の速度論解析を行った。-3サブサイトを置換した場合の効果と比較を行うことで、連続分解反応における各サブサイトの役割について検討した。

4. 研究成果

(1) 結晶性 β -キチンを基質とした酵素反応の解析系の確立

均一性や分散性が悪いため、キチンを基質として使ったこれまでの酵素化学実験は、ほとんど定性的であった。また、基質の形状や状態により分解活性が変化するため、別々の研究で報告された速度論パラメータを直接比較することはできなかった。そこで、本研究では、ハオリムシ棲管由来結晶性 β -キチンを分散・微砕均一化したものを基質として用いることで、結晶性の基質であっても、精度よく酵素反応の初速度を評価できる解析系を構築した。本研究に用いた全ての酵素サンプルにおいて、初速度の酵素初濃度依存性を検討した。基質大過剰の条件下において調べたところ、酵素初濃度と初速度の間に良好な比例関係が見られた。Fig. 2およびFig. 3にSmChiAについての結果を示す。続いて、初速度の基質濃度依存性について調べた。連続分解反応モデルを仮定して解析を行い、単純溶液系と同様の簡便な解析手法で速度論パラメータを評価できることを明らかにした（Fig. 4）。また、同じロットの基質を用いることで、複数の酵素や種々のアミノ酸置換体の解析結果を直接比較できるようにした。

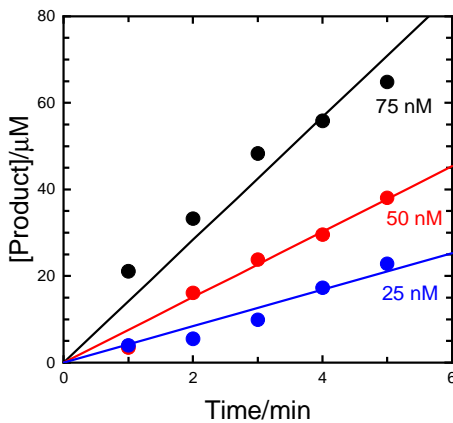


Fig. 2 異なるSmChiA初濃度で測定した結晶性 β -キチン分解反応の経時変化（pH 6.0, 25 $^{\circ}$ C）
いずれも基質初濃度は1 mg/mL。

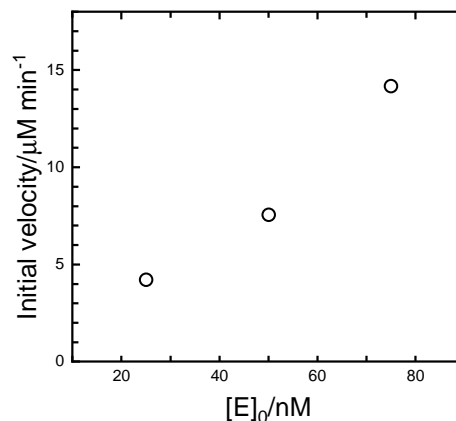


Fig. 3 SmChiAによる結晶性 β -キチン分解反応の初速度と酵素初濃度
（pH 6.0, 25 $^{\circ}$ C）

(2) 2種の連続分解型キチナーゼの比較解析

結晶性 β -キチン（連続分解される基質）とキトサン（水溶性のポリマー基質。結晶性 β -キチンに比べて、連続分解されにくい基質）を用いて、2種の連続分解型キチナーゼSmChiA, BcChiA1による基質分解反応について速度論パラメータを評価し、比較解析を行った（Fig. 4）。その結

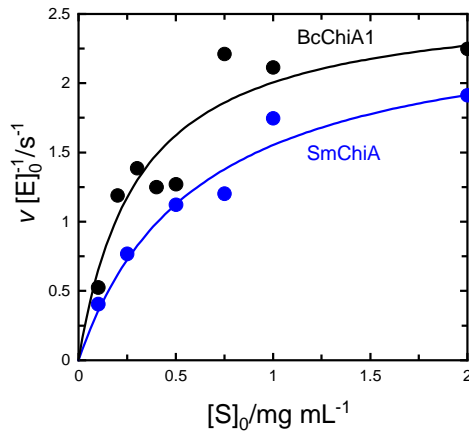


Fig. 4 BcChiA1, SmChiA による結晶性β-キチン分解反応の初速度の基質濃度依存性 (pH 6.0, 25)
● : BcChiA1, ● : SmChiA

果, 結晶性β-キチンの分解反応では, 両酵素で見かけの分子活性 (酵素 1 分子当たりの活性) に大きな差はなかった。見かけのミカエリス定数 (基質との親和性の強さを示す。この値が大きいほど親和性が低い。) は, SmChiA の方が BcChiA1 よりわずかに大きかった。他方, キトサンの分解反応では, BcChiA1 と SmChiA で見かけの分子活性に大きな差はなかった。これらは, 同一ロットの基質を用いて実験を行ったことで, 初めて明らかになった知見である。結晶性基質の分解反応で観測された SmChiA と BcChiA1 の見かけのミカエリス定数の差は, 基質結合の様式において両者に差があることを反映していると考えられ, 2 種の酵素のサブサイトの配列や構造の違いにより生じた可能性が予想された。

(3) -3 サブサイトの解析

SmChiA の-3 サブサイトに存在するトリプトファン残基 (W167) を欠損させた場合 (アミノ酸置換体を SmChiA-W167A と表記する), 他のサブサイトのアミノ酸残基を置換した場合よりも, 結晶性基質に対する分解活性が減少し (ほとんど活性は検出されない), 連続反応性における-3 サブサイトの重要性が報告されている (Zakariassen et al., J. Biol. Chem., 284, 10610-10617, 2009)。

BcChiA1 の-3 サブサイトには W53 が存在している。W53 をアラニン残基に置換した変異型 BcChiA1 (BcChiA1-W53A を表記する) を調製し, -3 サブサイトのアミノ酸置換が基質分解反応におよぼす影響を調べた。その結果, SmChiA の場合と同様, BcChiA1-W53A の結晶性β-キチンに対する分解活性は低下した (Fig. 5)。BcChiA1 においても, 連続分解反応における-3 サブサイトの重要性が明らかになった。しかし, SmChiA-W167A ではほとんど活性が検出されなかったのに対し, BcChiA1-W53A では低いながらも活性が検出された。結晶性β-キチン分解反応の速度論解析の結果, BcChiA1-W53A の見かけの分子活性は野生型に比べて約 2 分の 1 に減少した。さらに, -3 サブサイトのアミノ酸置換がキトサンに対する分解活性へおよぼす影響は, SmChiA と BcChiA1 で異なっていた (Fig. 6)。また, 等温滴定量熱測定によりキトオリゴ糖との結合を調べたところ, SmChiA-W167A/E315Q (E315 は触媒残基) では結合がみられなかったのに対し, BcChiA1-W53A/E204Q (E204 は触媒残基) では, 野生型より親和性が弱いものの, キトオリゴ糖との結合

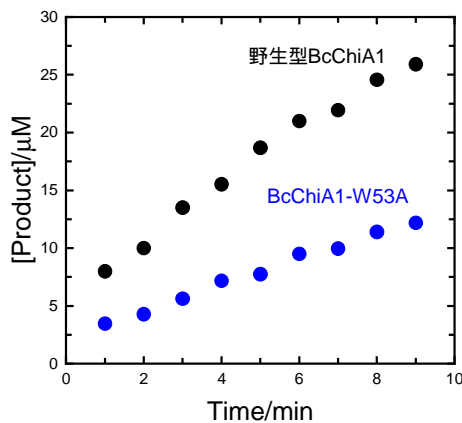


Fig. 5 野生型 BcChiA1 および -3 サブサイト置換体 (W53A) による結晶性β-キチン分解反応の経時変化 (pH 6.0, 25)
いずれも, 基質初濃度は 1 mg/mL, 酵素初濃度は 30 nM。

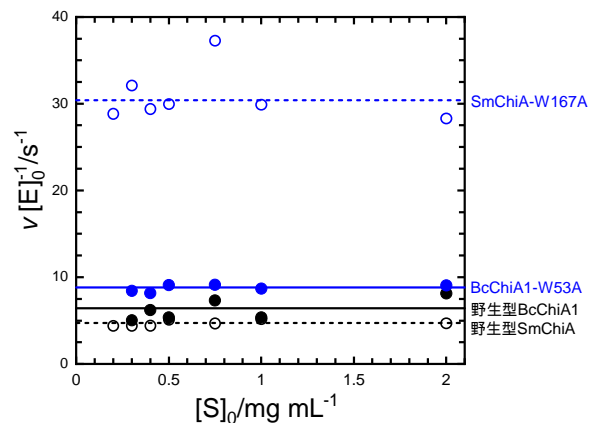


Fig. 6 BcChiA1, SmChiA, および, 各酵素の-3 サブサイト置換体のキトサンに対する分解活性 (pH 6.0, 25)
● : 野生型 BcChiA1, ● : BcChiA1-W53A
○ : 野生型 SmChiA, ○ : SmChiA-W167A

熱が観測された。これらの結果から、BcChiA1 の-3 サブサイトが連続分解反応におよぼす影響は、SmChiA の場合よりも小さく、-3 サブサイトの重要度は酵素により差異がある (-3 サブサイトの寄与が決定的でない場合もある) ことがわかった。

(4) -6 および+2 サブサイトの解析

-3 サブサイトのアミノ酸置換の影響は、BcChiA1 では SmChiA の場合よりも小さかった。BcChiA1 の場合、他のサブサイトの影響が大きい可能性を予想した。両酵素では、-6 および+2 サブサイトに位置する芳香族アミノ酸残基が異なっていることに着目した。すなわち、BcChiA1 ではいずれもトリプトファン残基が存在しているが、SmChiA の場合はフェニルアラニン残基が位置する (Fig. 1)。そこで、BcChiA1 の-6 および+2 サブサイト置換体、BcChiA1-W122A および BcChiA1-W285A を調製し、基質分解反応の速度論解析を行った。

結晶性 β -キチンの分解反応では、いずれの変異型酵素も野生型より活性が低下した (Fig. 7)。速度論解析の結果、アミノ酸置換が速度論パラメータへおよぼす影響は異なっていた。BcChiA1-W122A の場合、見かけの分子活性への影響は小さいが、基質との親和性が顕著に減少した。他方、BcChiA1-W285A では、基質との親和性への影響は小さいが、見かけの分子活性が顕著に減少した。(3) で記述した-3 サブサイト置換体 (BcChiA1-W53A) の場合、見かけの分子活性および基質との親和性の両方が顕著に減少した。サブサイトの位置によって、芳香族アミノ酸残基の置換が速度論パラメータへおよぼす影響は異なっていた。また、キトサンの分解反応の解析結果も併せて考察すると、基質が結合する際に入口側に位置する-6 サブサイトの W122 については、酵素反応の初期段階である酵素-基質複合体の形成、すなわち、基質との結合に特に重要であることが示唆された。他方、出口側に位置する+2 サブサイトの W285 については、連続反応性や加水分解後の生成物の解離過程において重要であることが示唆された。

(5) 総括

これまで、モデル酵素である SmChiA における知見から、連続分解型キチナーゼにおいて-3 サブサイトは決定的に重要であるとされていたが、BcChiA1 の場合、-3 サブサイトのアミノ酸を欠損させても、活性の低下は SmChiA の場合よりも小さく、相対的に他のサブサイトの寄与が顕著であることを明らかにした。さらに、BcChiA1 の各サブサイトのアミノ酸置換体を作製して体系的に速度論解析を行った。サブサイトの位置により、芳香族アミノ酸残基の置換が2つの速度論パラメータへおよぼす影響が異なることを明らかにした。個々のサブサイトの位置特異的な役割を裏付けることができた。

本研究で解析を行った2種の野生型酵素による酵素反応の速度論パラメータは同等であった。しかし、BcChiA1 の各サブサイトが基質分解反応へおよぼす影響は、モデル酵素として解析されてきた SmChiA のそれとは異なっていることがわかった。酵素反応の各素過程において、各酵素はサブサイト全体でバランスを保っているのかもしれない。連続分解型キチナーゼの作動機構の解明には、個々のサブサイトの寄与を体系的に解明することが鍵となる。

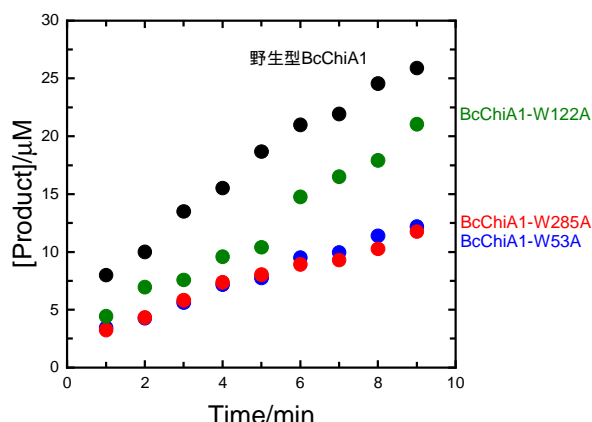


Fig. 7 野生型 BcChiA1 および 3 種のサブサイト置換体による結晶性 β -キチン分解反応の経時変化 (pH 6.0, 25)
いずれも、基質初濃度は 1 mg/mL、
酵素初濃度は 30 nM。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 多田瑞季, 渡邊美咲, 鈴木一史, 杉本華幸
2. 発表標題 Bacillus circulans由来連続分解型キチナーゼの-3サブサイトの解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小田陽介, 小出優衣, 多田瑞季, 鈴木一史, 杉本華幸
2. 発表標題 2種の連続分解型キチナーゼの比較解析
3. 学会等名 第60回 新潟生化学懇話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉本華幸
2. 発表標題 微生物由来キチン分解モノオキシゲナーゼの構造安定性
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部第182回例会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉本華幸
2. 発表標題 キチナーゼによる基質連続分解機構に関する研究
3. 学会等名 第58回 新潟生化学懇話会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 多田瑞季, 小田陽介, 猪浦弾, 鈴木一史, 渡邊剛志, 杉本華幸
2. 発表標題 連続反応性をもつ3種のキチナーゼによる基質分解反応の速度論的解析
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟大学農学部教員紹介 https://www.agr.niigata-u.ac.jp/teachers/262 新潟大学応用微生物学研究室 http://www.agr.niigata-u.ac.jp/~ksuzuki/AppIMicro/Welcome.html
--

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