

令和元年5月29日現在

機関番号：63903

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19213

研究課題名(和文)結晶性多糖表面を動きながら連続的に分解する酸化還元型酵素を創る

研究課題名(英文)Engineering of a redox enzyme processively decomposing crystalline polysaccharide

研究代表者

飯野 亮太(IINO, RYOTA)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・教授

研究者番号：70403003

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究は以下の2点を目標とした。A.結晶性多糖を分解する酸化還元型酵素LPMOの反応過程を1分子蛍光観察で定量計測し機構を解明する。B.人工コイルドコイルタンパク質との融合でLPMOを多量体化し、野生型の分解活性を凌駕する非天然型酵素の創造に挑戦する。Aについては、以下を初めて明らかにした。1.共基質過酸化水素が存在するとLPMOの結晶性キチンへの結合が促進される、2.活性化されたLPMOはキチンに数秒間結合して分解を行う、3.キチン分解反応は連続的(プロセス)ではなく1回分解する毎にLPMOは解離する。Bについては、現時点では野生型よりも高活性な分子は得られておらず現在も継続中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セルロースやキチンといった結晶性多糖は、地球上に大量に存在し燃料に変換可能なバイオマスである。しかしながら、その物理的・化学的安定性からオリゴ糖への分解が容易でなく有効利用されていない。このため、常温常圧の穏やかな条件で結晶性多糖を分解する糖質分解酵素が基礎・応用の両面で研究されている。LPMOは、これらの中で最も高いオリゴ糖生成活性を示す酵素として注目を集めている。本研究で明らかとなったLPMOの作動機構に基づき、野生型よりも高い分解活性を持つ非天然酵素が創成されることが期待され、将来は結晶性多糖バイオマスの有効利用の促進につながると期待される。

研究成果の概要(英文):The following 2 subjects were set to be a goal in this study. A) Quantitative measurement of the elementary steps of LPMO, a redox enzyme that degrades crystalline polysaccharides, by single-molecule fluorescence imaging, and elucidation of its operation mechanism. B) Engineering of non-natural oligomeric LPMO by fusing with artificial coiled-coil proteins, that surpasses the wild-type enzyme. Regarding the subject A, following results were obtained for the first time. 1. The presence of the co-substrate hydrogen peroxide facilitates the binding of LPMO to crystalline chitin. 2. Activated LPMO binds to crystalline chitin for several seconds for degradation. 3. The chitin degradation reaction by LPMO is not processive, and LPMO dissociates after single catalysis. The subject B is still in progress, because non-natural molecules that show higher degradation activity than the wild-type have not been obtained yet.

研究分野：生物物理学

キーワード：分子モーター キチナーゼ 結晶性キチン バイオマス 1分子イメージング

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

セルロースやキチンといった結晶性多糖は、地球上に大量に存在し燃料に変換可能なバイオマスである。しかしながら、その物理的・化学的安定性からオリゴ糖への分解が容易でなく有効利用されていない。このため、常温常圧の穏やかな条件で結晶性多糖を分解する糖質分解酵素が基礎・応用の両面で研究されている。Lytic Polysaccharide Monoxygenase (LPMO、図1)は、これらの中で最も高いオリゴ糖生成活性を示す酵素として注目を集めている (Vaaje-Kolstad G Science 2010)。

研究代表者は、結晶性セルロース表面を直進運動しながら連続的に加水分解して二糖を生成する分子モーター、セロビオヒドロラーゼ (CBH、図2) の1分子蛍光観察を確立し、結合、並進運動、解離といった化学反応サイクルの素過程の速度定数を定量計測してその機構を解明した (Shibafuji Y J Biol Chem 2014; Nakamura A J Biol Chem 2016)。そこで本課題では、1分子蛍光観察を用いたLPMOの機構解明を着想した。また、CBHは多糖表面から解離せずに連続的分解を行うことから、LPMOを多量体化し解離を抑制すれば、連続的分解と効率的なオリゴ糖生成が可能になると着想した。

### 2. 研究の目的

本研究では、以下の2点を目標とした。

- A. 結晶性多糖を分解する酸化還元型酵素、LPMOの反応素過程を1分子蛍光観察で定量計測し作動機構を解明する。
- B. 人工コイルドコイルタンパク質との融合でLPMOを多量体化し、野生型の分解活性を凌駕する非天然型酵素を創造する。

### 3. 研究の方法

*Serratia marcescens* 由来のLPMO、SmAA10Aの単量体および多量体にヒスチジンタグを付加して大腸菌で発現させ、Ni-NTAアフィニティークロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーで精製した。多量体の形成は、ヒト由来キネシン1のコイルドコイルドメイン (図3 Isojima Nat Chem Biol 2016)、または、de novo デザイン人工コイルドコイルタンパク質との融合することで行った。(図4、Harbury PB Science 1993; Thomson AR Science 2016)。結晶性キチンの分解活性は、HPLCで生成物のオリゴ糖を定量して評価した。

また、1分子蛍光イメージングを行うため、SmAA10A表面のアミノ酸残基をシステインに置換し、蛍光色素Cy3またはSeTau647 (ST647)で標識して活性が低下しないものをスクリーニングした。1分子蛍光イメージングは研究室で組み立てた全反射蛍光顕微鏡により行った。結晶性キチンを顕微鏡カバーガラス上にスピコートして固定し、蛍光標識SmAA01A溶液を上から滴下することで、キチンマイクロ結晶の長さで規格した結合速度定数 ( $M^{-1}\mu m^{-1}s^{-1}$ )、および解離速度定数 ( $s^{-1}$ )の見積もりを行った。

### 4. 研究成果

本研究を開始した時点では、LPMOによる結晶性多糖の分解には、酸素が共基質として必須であると考えられてきた (Kracher D Science 2016)。この知見に従って本研究でも条件検討を行い、分解活性が最大となる条件を見いだした。しかしながら、本研究を進める過程で、LPMOの分解活性に必要な共基質は酸素ではなく過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) であるという、これまでの根拠を覆す報告がなされた

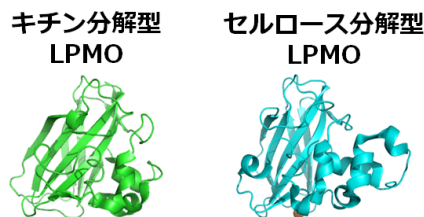


図1. (左) 結晶性キチン分解型 LPMO. (右) 結晶性セルロース分解型 LPMO.

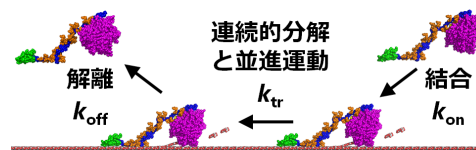


図2. CBHの化学反応サイクル. 結合、連続的分解による二糖の生成、解離.

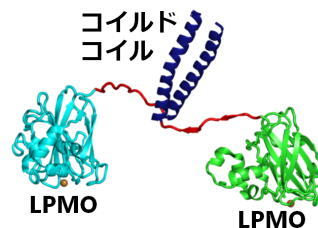


図3. 二量体 LPMO のモデル構造

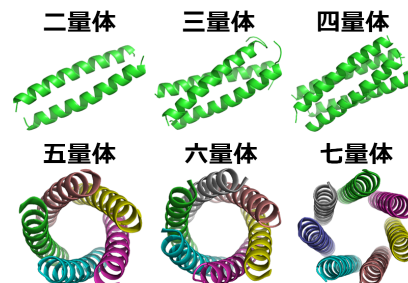


図4. コイルドコイルタンパク質 (Harbury PB Science 1993; Thomson AR Science 2016)

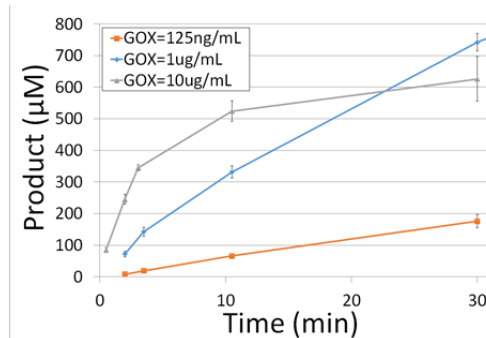


図5. *Serratia marcescens* 由来 LPMO、SmAA10A によるオリゴ糖生成量経時変化のグルコースオキシダーゼ (GOX) 濃度依存性. GOX が 1  $\mu g/ml$  の条件で活性が長時間保持された. 酵素濃度 0.5  $\mu M$ .

(Bissaro B Nat Chem Biol 2017)。このため、これまでの予備実験の結果をすべて白紙に戻して追試を行った。その結果、酸素存在下よりも過酸化水素存在下の方が確かに高い活性が得られることを確認した。さらに、高濃度の過酸化水素存在下では SmAA10A の失活が起き長時間の計測を行えないことが判明した。そこで、グルコースオキシダーゼ (GOX) を用いて失活が起こりにくい適性濃度の過酸化水素を連続的に供給する反応系を構築し、LPMO が長時間高い活性を保持できる条件を確立した (図5)。

また、SmAA10A の1分子蛍光イメージングを行うための蛍光色素導入部位の検討を行った。その結果、T92C 変異体に ST647 を導入した試料が野生型 ( $0.71 \text{ s}^{-1}$ ) の90%程度の結晶性キチン分解活性 ( $0.63 \text{ s}^{-1}$ ) を保持することが明らかとなった (図6)。次に最適化した反応条件と蛍光標識 SmAA10A で単量体 SmAA10A の1分子イメージングを行い、SmAA10A が結晶性キチンに結合・解離する様子を観察することに成功した (図7)。得られた画像データを基に、結合速度定数 ( $\text{M}^{-1}\mu\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$ )、および解離速度定数 ( $\text{s}^{-1}$ ) の見積もりを行った。その結果、結晶性キチン分解反応に必要なすべての成分を含む活性化状態では、共基質の  $\text{H}_2\text{O}_2$  がほとんど産生されない GOX なし条件やグルコースなし条件、および還元剤 (電子供与体) のアスコルビン酸が存在しない不活性化条件に比べ、結晶性キチンへの SmAA10A の結合速度定数が 3~5 倍増加することが明らかとなった (図8上)。さらに、不活性化条件では、SmAA10A の結晶性キチンへの結合時間が 0.3 秒程度 (解離速度  $3.4 \text{ s}^{-1}$  程度) の短い単一成分のみであるのに対し、活性化条件では結合時間が 2.2 秒程度 (解離速度  $0.38 \text{ s}^{-1}$ ) の長い成分が 3 割程度現れることが明らかとなった (図8下)。さらに、結晶性キチン上での並進運動は観察されず、動かずに解離する分子がほとんどであった。

上記の生化学解析と1分子解析の結果から、1. 共基質過酸化水素が存在すると LPMO の結晶性キチンへの結合が促進される、2. 活性化された LPMO はキチンに数秒間結合して分解を行う、3. キチン分解反応は連続的 (プロセス) ではなく1回分解する毎に LPMO は解離することが明らかとなった。これらは LPMO の作動機構に迫る重要な成果であり現在、投稿論文を作成中である。

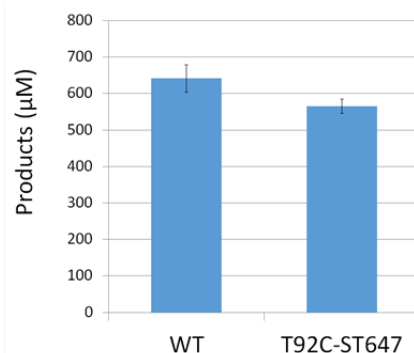


図6. 野生型 (WT、左) と蛍光標識 SmAA10A (T92C-ST647) のキチン分解活性の比較. 酵素濃度  $0.5 \mu\text{M}$ 、反応時間 30 分. 活性:  $0.71 \text{ s}^{-1}$  (野生型)、 $0.63 \text{ s}^{-1}$  (蛍光標識 SmAA10A).

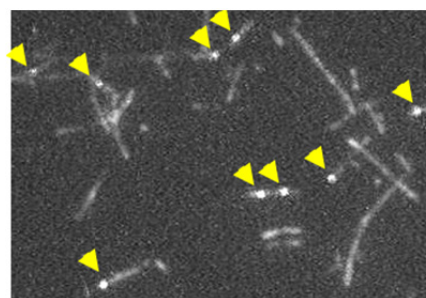


図7. 蛍光標識 SmAA10A の1分子蛍光イメージング (矢尻). 線状に見えるのが結晶性キチン.

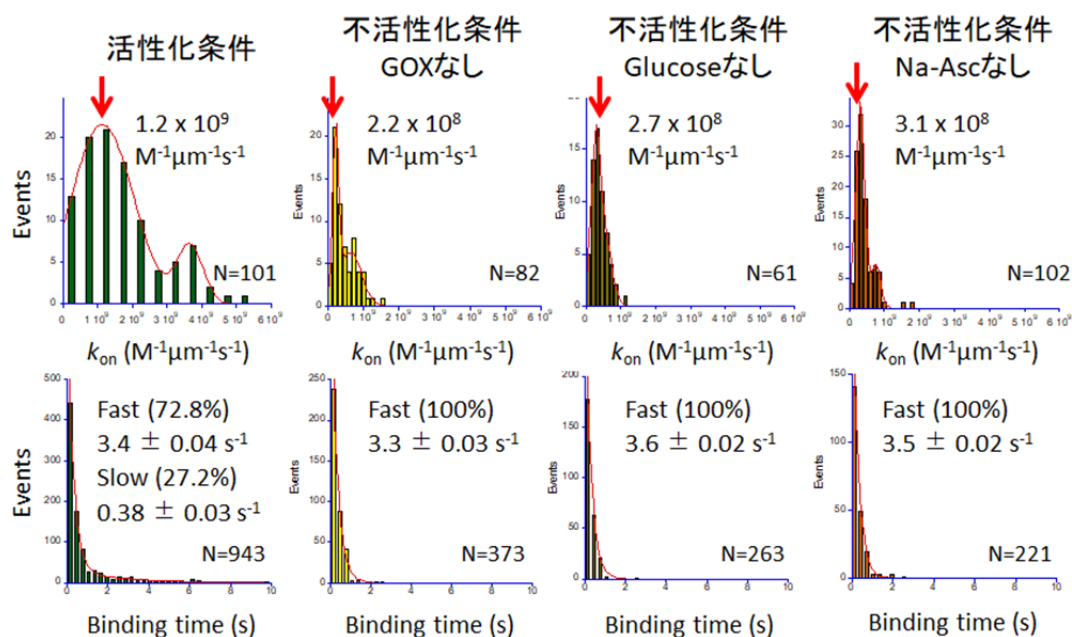


図8. 活性化、不活性化条件における蛍光標識 SmAA10A (T92C-ST647) の結晶性キチンへの結合速度定数 ( $k_{on}$ ,  $\text{M}^{-1}\mu\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (上) および解離速度定数 ( $\text{s}^{-1}$ ) (下)。

さらに、多量体化 SmAA10A 変異体の作製と活性評価を行った。キネシン 1 のコイルドコイルドメインを SmAA10A の C 末端に融合し、2 量体を作製することに成功した。しかしながら、この 2 量体 SmAA10A は野生型の単量体 SmAA10A と同程度のキチン分解活性しか示さなかった。次に、3-7 量体を形成する *de novo* タンパク質 (Harbury PB Science 1993; Thomson AR Science 2016) と融合し、さらにサイズの大きな多量体 SmAA10A の形成を試みた。しかしながら、作製した融合タンパク質を大腸菌で発現させると全て不溶性の沈殿を形成し、可溶性のタンパク質として精製することは困難であった。

現在は、新たな多量体化の方法として、SpyTag/SpyCatcher システムを利用した系の構築を試みている。SpyTag (13 アミノ酸残基) と SpyCatcher (138 残基) は自発的に共有結合を形成するペプチドタグである (図 6) (Zakeri PNAS 2012)。ターゲット分子の末端やループ領域に SpyTag を遺伝子上で付加することで SpyCatcher を結合させることができる。現時点までに、SpyTag 融合 SmAA10A、および SpyCatcher 融合 6 量体の作製が終了している。今後は、多量体化 SmAA10A の結晶性キチン分解活性の生化学的評価、および蛍光標識多量体化 SmAA10A の 1 分子蛍光イメージングを行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Kawai F, Nakamura A, Visootsat A, \*Iino R, Plasmid-based one-pot saturation mutagenesis and robot-based automated screening for protein engineering, ACS Omega 3: 7715-7726 (2018)  
DOI: 10.1021/acsomega.8b00663  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.8b00663>

[学会発表] (計 5 件)

- ① Siti Mastura Zakaria, Akihiko Nakamura, Yasuko Okuni, Mayuko Yamamoto, Akasit Visootsat, Jun Ando, Ryota Iino, Quantitative Analysis of Chitin Degradation by Copper-Dependent Lytic Polysaccharide Monooxygenase, 平成 30 年度日本生物物理学会中部支部講演会、2019 年
- ② Akasit VISOOTSAT, Paul VIGNON, Akihiko NAKAMURA, Ryota IINO, Biochemical and single-molecule imaging analyses of high and low activity mutants of Serratia marcescens Chitinase A, 平成 30 年度日本生物物理学会中部支部講演会、2019 年
- ③ VISOOTSAT Akasit, VIGNON Paul, 中村 彰彦, 飯野 亮太, Single-molecule fluorescence imaging analysis of Serratia marcescens ChitinaseA (SmChiA) Trp-active mutant, 日本生物物理学会第 56 回年会, 2018 年
- ④ Ryota Iino, Operation and design principles of protein molecular motors, The 2nd IMS-NANOTEC Joint Research Meeting, 2018 年
- ⑤ \*飯野亮太, 機動分子科学: 生体分子、人工分子を超えて、第 17 回蛋白質科学会年会ワークショップ「機動分子科学」 2017 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[https://groups.ims.ac.jp/organization/iino\\_g/index.html](https://groups.ims.ac.jp/organization/iino_g/index.html)

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

※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。