

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510302

研究課題名(和文)新規モデリング法を利用したモジュラーキチナーゼの立体構造と抗真菌機能の相関の解明

研究課題名(英文) Approaches for elucidation of structure-function relationships of modular chitinases using a novel modeling method

研究代表者

野中 孝昌 (Nonaka, Takamasa)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：30242457

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)：2つの機能ドメインを結ぶ柔軟性の高いリンカーを持つ細菌キチナーゼ(キチナーゼC)に対して、そのリンカーに変異を導入した2種類の酵素を調製し、抗真菌活性とキチン分解活性を測定した。リンカーの変異はドメインの配置(全体構造)を大きく変える可能性があるが、今回導入した変異は、どちらの活性に対しても最大で25%程度の影響しか与えないことが分かった。また、このような構造を独自の方法でモデリングし、その中から、実測の溶液散乱データに基づいて集団としてのモデルを選抜する方法を開発した。この方法を野生型キチナーゼに適用して得たモデル構造は、我々が提唱しているキチン分解機構と矛盾しないものであった。

研究成果の概要(英文)：A bacterial chitinase (Chitinase C) is composed of two functional domains connected by a flexible linker. We prepared two kinds of mutant enzyme whose linker is elongated or replaced, and measured their antifungal and hydrolyzing activities. Although mutations in the linker were expected to vary the relative orientation of two domains, they affected the activities by up to only 25%. Furthermore, we developed a novel method to model protein structures with flexible interdomain linkers and select model structures as conformational ensembles on the basis of solution X-ray scattering data. The chitinase structures selected by this method can explain an action in chitin hydrolyzing we proposed previously.

研究分野：蛋白質結晶学

キーワード：キチナーゼ 抗真菌活性 モデリング

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の多くは、複数のドメインからなり(モジュラータンパク質)、それらが協奏的に働くことで機能を発揮している。モジュラータンパク質の機能を詳細に解明するためには、生理条件下におけるインタクトな構造情報を原子レベルで得ることが極めて有効である。しかしながら、既存の構造解析法単独では、これを達成することは現在のところ困難であることが多い。そこで、申請者は X 線結晶構造解析、X 線溶液散乱および分子動力学計算を統合した新たな手法によるモジュラーキチナーゼの構造機能解析を進めてきた (Kezuka *et al.*, *Proteins* 2010; Kezuka *et al.*, *J. Mol. Biol.* 2006 ほか)。本申請課題では、これまで研究対象としていたモジュラーキチナーゼの中から、特に成果の得られている 2 種類のキチナーゼに焦点を絞り、これら酵素の特徴である抗真菌活性に着目した研究を進める。

糖質加水分解酵素のファミリー19 に属するキチナーゼは、抗真菌活性を持っている。キチナーゼは、病原菌の細胞壁中に含まれるキチン鎖を切断し、溶菌することで、その生育を阻害すると考えられている。これまでの報告によれば、高い抗真菌活性を示すキチナーゼは、触媒ドメインに加え、基質結合ドメインを併せ持っている (Iseli *et al.*, *Plant Physiol.* 1993; Itoh *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002)。不溶性で強固な結晶構造を持つキチン鎖を切断するためには、基質への結合が重要であると考えられるが、分子レベルでの抗真菌活性発現機構は、ほとんど分かっていない。

これまでに研究代表者は、細菌(放線菌 *Streptomyces griseus*)と植物(イネ)に由来し、いずれも N 末端側からキチン結合ドメインと触媒ドメインからなるモジュラーキチナーゼ(それぞれ ChiC および OsChia1b とする。図 1)の全長構造を、X 線結晶構造解析と X 線溶液散乱を併用して解析している (Kezuka *et al.*, *J. Mol. Biol.* 2006; Kezuka *et al.*, *Proteins* 2010)。しかしながら、結晶構造においては、ドメイン間リンカーの高い柔軟性により、この部分の構造は決定できていない。また、得られた結晶構造はこれらキチナーゼが結晶中で取り得る構造のスナップショットであり、溶液構造は溶液中での平均構造であると考えられる。つまり、ChiC および OsChia1b は 2 つのドメインがある特定のコンフォメーション(相対配置)を取るのではなく、柔軟性の高いリンカーにより幾つものコンフォメーションを持つ

た構造集団として存在すると考えるべきである。

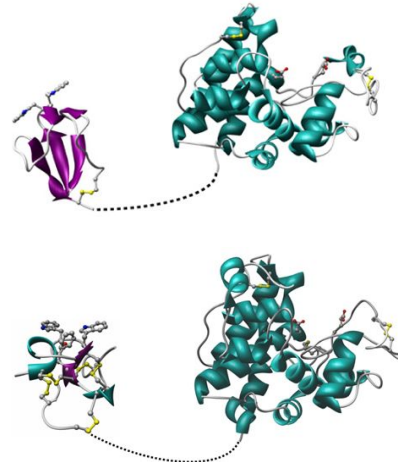


図 1 本研究で対象とするキチナーゼの結晶構造 (上)細菌キチナーゼ ChiC、(下)植物キチナーゼ OsChia1b

どちらの図も向かって左が N 末端側のキチン結合ドメイン、右が触媒ドメインである。ドメイン間リンカーの構造(破線で描画)は、柔軟性が高いため決定できていない。図に示したドメインの相対配置は便宜上のもので、溶液中では一義的には決まらないものと考えられる。

これら 2 種類のキチナーゼは、同様なドメイン構造を取り、互いの触媒ドメインが 35% のアミノ酸配列のアイデンティティを示す一方で、進化的に異なるキチン結合ドメインを持っている。これまでに代表者は、ChiC および OsChia1b のキチン結合機構を、分子動力学計算により検証し、異なるキチン結合機構を提唱している。これらの結果は、2 つのキチナーゼが、キチン結合ドメインを介して、基質の異なる領域(結晶性而非結晶性領域)に結合することを示唆するものであった。したがって、これらのキチナーゼは、N 末端に異なるタイプのキチン結合ドメインを持つため、異なる機構により抗真菌活性を発現していると考えられる。研究開始当初の時点で、被検菌 *Trichoderma reesei* に対して、ChiC と OsChia1b はともに抗真菌活性を持つことが分かっていた (図 2; Mizuno *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008)。

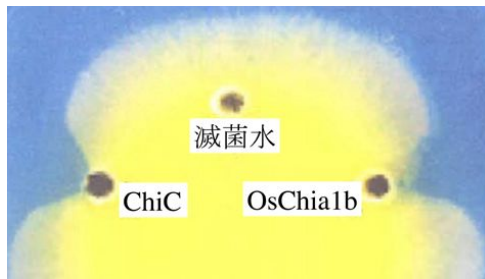


図2 ChiC と OsChia1b による抗真菌活性

Trichoderma reesei を被検菌としている。ChiC と OsChia1b を添加したウェルの周辺にのみ *T. reesei* が生育していない様子が分かる。酵素添加量: 100 pmol

2. 研究の目的

本申請課題では、新規モデリング法と X 線溶液散乱データを用いることで、このような集団としてのキチナーゼ立体構造を解析する。また、全体構造に大きな影響を及ぼすリンカーの配列を変え、得られる立体構造と抗真菌活性との相関を検証する。

3. 研究の方法

キチナーゼの全体構造に影響を与える可能性が高いリンカーに変異を導入し、その抗真菌活性およびキチン分解活性を測定する。並行して、連携研究者が独自に開発したモデリング法を用いて、キチナーゼ全長のモデル構造を構築、X 線溶液散乱データに基づいて、モデル構造を絞り込む。このようにして得た活性および構造情報を併せて考察することで、構造と機能の相関の解明を試みる。

試料調製

活性測定を実施するための ChiC の発現は、大腸菌を用いた系により行った。

ChiC のリンカー変異酵素としては、リンカーの長さを 2 倍にしたリンカー延長型、リンカーの配列を OsChia1b のものと置き換えたリンカー置換型を調製した。

変異酵素の調製に際し、今後の試料調製の頻度を考慮して、より簡便に精製を行うことを目的に、ヘキサヒスチジンタグを C 末端に付加することを最初に検討した。これにより変異酵素の調製が簡便になった一方で、実際に実験を進めると、抗真菌活性の評価が正しく行えないことが分かった。酵素が被検菌の細胞壁に含まれる基質（キチン鎖）へ接近する際に、タグが立体的な障害となっていることが予想された。以上の理由から、最終的には野生型酵素と同様にタグを付加しない既存の方法により精製を行った。なお、ChiC 遺伝子は、GC 含量が 65% と高く、宿主となる大腸菌とはコドンの使用頻度が異なること

が予想されたことから、変異酵素の遺伝子は人工合成し、その際にコドン最適化も実施した。既存の精製系では、ペリプラズムに発現している ChiC（あるいはその変異酵素）を浸透圧破砕により回収後、硫酸沈殿、脱塩を経て、陽イオン交換カラムに通して純度を高めた。

抗真菌活性測定

PDA（Potato Dextrose Agar）培地上に *Trichoderma reesei* を植菌し、25℃ で 2 日間培養した。コロニーの半径が 2 cm 程度になったところで、周囲に直径 4 mm のウェルを作り、そこに酵素溶液 40 μl（25~300 pmol 相当）を添加し、さらに一晚 25℃ で培養を続けた。酵素により *T. reesei* の生育が阻害された領域（阻止円）の面積を計算し、活性の指標とした。

キチン分解活性測定

フェリシアン化物の還元を基にした還元糖定量法である Schales 変法を用いた（Imoto & Yagishita, *Agr. Biol. Chem.*, 1971）。基質にはコロイダルキチン（終濃度 0.2%）を用いた。なお、コロイダルキチンは、カニ由来キチンを塩酸処理し、独自に調製した。

超高速ランダムポリペプチド鎖構造生成法を用いた酵素のモデリング

ドメインの配置に自由度をもたらすリンカーの構造モデルを、連携研究者が独自に開発した超高速ランダムポリペプチド鎖構造生成法（Seki *et al.*, *J. Chem. Theory Comput.* 2011）により構築し、その両端に剛体と仮定した 2 つのドメインを連結することで全長モデル構造を構築した。この方法により、膨大な数（約 10^5 個）のコンフォメーションを持つ構造集団を構築することが可能となった。その後、立体障害を生じない全長モデル構造を抽出し、理論散乱曲線の計算を経て、これが X 線溶液散乱実験の実測値と一致するモデル構造を選抜した。

4. 研究成果

(1) 抗真菌活性およびキチン分解活性

抗真菌活性測定については、PDA 培地上に *T. reesei* を生育させ、キチナーゼ添加による阻止円の形成面積を評価した。実際に変異酵素を評価する前に野生型 ChiC の酵素量と阻止円の面積の関係を検証した（ $n = 5$ ）。その結果、少なくとも野生型 ChiC 50~300 pmol（1.25~7.5 μM の酵素溶液を 40 μl 添加）の範囲で、得られる阻止円の面積に直線性が得られることを確認した。

この系において、野生型 ChiC、リンカー延

長型、リンカー置換型および比較対象として OsChia1b の抗真菌活性を $n=5$ で測定した(表 1)。最も高い活性を示したのは野生型 ($80.7 \pm 6.4 \text{ mm}^2$) で、リンカー置換型 ($70.8 \pm 7.8 \text{ mm}^2$)、リンカー延長型 ($60.2 \pm 3.8 \text{ mm}^2$)、OsChia1b ($52.6 \pm 6.5 \text{ mm}^2$) の順に続いた。

抗真菌活性はキチナーゼが真菌の細胞壁中のキチンを分解することで発現すると考えられる。そこで、参考として各酵素に対し、コロイダルキチン(不溶性キチン)を基質として活性を測定した。リンカー延長型および置換型は野生型よりも活性がわずかに高く、OsChia1b は ChiC およびリンカー変異酵素に比べ、21~26%程度の活性値を示した。

表 1 各キチナーゼの示す活性値

	比活性 [U/ μmol]	抗真菌活性 [mm^2]
野生型 ChiC	147 ± 2	80.7 ± 6.4
リンカー延長型	157 ± 6	60.2 ± 3.8
リンカー置換型	184 ± 6	70.8 ± 7.8
OsChia1b	39 ± 1	52.6 ± 6.5

ChiC からキチン結合ドメインを削除した変異酵素(活性ドメイン単独)では、コロイダルキチン(あるいはその他の不溶性キチン)に対する活性は概ね半減することが報告されている(Itoh *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002)。これは、不溶性キチンの分解には、結合ドメインを介して基質に結合することが重要であると考えられる。前述のとおり、OsChia1b の持つキチン結合ドメインは ChiC のそれとはタイプが異なり、不溶性基質よりも水溶性基質への結合に適した構造を持つ(Kezuka *et al.*, *Proteins* 2010)。したがって、OsChia1b の低い活性は、結合ドメインの結合特異性に起因すると考えられる。一方で、リンカー変異酵素の比活性は最大で野生型の 125%であり、リンカーの延長あるいは置換がコロイダルキチン分解に与える影響は小さいことが分かった。

(2) 超高速ランダムポリペプチド鎖構造生成法を用いた酵素のモデリング

「研究の方法」に示した通り、 10^5 個におよぶ ChiC の全長モデルを構築し、実験的に得た X 線溶液散乱データとモデル構造から計算した理論的溶液散乱データを比較し、実験値を再現する集団を選抜した。これら集団では、活性ドメインが、結合ドメインを介してキチンへ結合すると考えられる面から離れ、多方面に配向しているものが多く見られた(図 3)。これは、キチン結合ドメインが細胞壁中の結晶性の高い部分に結合し、その周囲に存在する非結晶性部分を活性ドメインが切断するという、我々が提唱しているモデ

ル(Kezuka *et al.*, *Proteins* 2010)にも矛盾しないものであった。

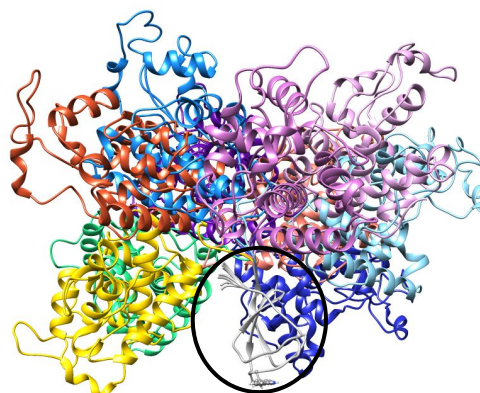


図 3. 実測値を再現する集団の一例
キチン結合ドメイン(丸で囲んで示した)同士を重ね合わせて、10 種類のモデル構造を表示している。いずれも同じ集団に属するキチナーゼのモデル構造である。

現時点では、野生型 ChiC に対してのみモデル構造を選抜し、キチン分解および抗真菌活性値を得ている。リンカーへの変異導入のもたらす両活性への寄与は、タバコキチナーゼにおける先行研究(Suarez *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 2001)を参考に当初予想していたよりも小さかった。今後、酵素の立体構造と機能の相関を検証するためには、リンカー変異酵素のモデル構造の構築と選抜を進めることが必須である。このためには、変異酵素の調製の効率化と、これにより得た試料を用いた X 線溶液散乱実験が必要となる。また、活性を劇的に減少させるような変異を期待して、新たな変異酵素(例えば、リンカーを極端に短くする。)を調製することも検討すべきであると考えている。

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 1 件)

1. Yuichiro Kezuka, Masaki Kojima, Takeshi Watanabe and Takamasa Nonaka, Structure of full-length class I chitinase from rice revealed by X-ray crystallography and small-angle X-ray scattering, *Photon Factory Activity Rep. Part B* **30** (2013) p.270 査読なし

[学会発表](計 4 件)

1. 毛塚 雄一郎、関 安孝、野中 孝昌、モジュラーキチナーゼの立体構造と抗真菌活性の相関解明への試み、第 15 回日本蛋白質科学会年会、2015 年 6 月 24 日発

表予定、あわぎんホール(徳島県徳島市)

2. 毛塚 雄一郎、関 安孝、野中 孝昌、
モジュラーキチナーゼの立体構造と抗真菌活性の相関解明への試み、第8回東北糖鎖研究会、2014年10月11日、岩手医科大学矢巾キャンパス(岩手県紫波郡矢巾町)
3. 野中 孝昌、蛋白質と糖の相互作用、第8回東北糖鎖研究会、2014年10月10日、岩手医科大学矢巾キャンパス(岩手県紫波郡矢巾町)
4. 関 安孝、毛塚 雄一郎、野中 孝昌、
曾田 邦嗣、新しいペプチド鎖生成法を使用した IDP の分子モデリング、第12回日本蛋白質科学会年会、2012年6月21日、愛知県名古屋市

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

野中 孝昌 (Takamasa NONAKA)
岩手医科大学 薬学部 教授
研究者番号： 30242457

(2)研究分担者

毛塚 雄一郎 (Yuichiro KEZUKA)
岩手医科大学 薬学部 助教
研究者番号： 50397163

(3)連携研究者

関 安孝 (Yasutaka SEKI)
岩手医科大学 薬学部 准教授
研究者番号： 30377220