

博士学位論文

氏名(本籍)	本田 翔太郎 (埼玉県)
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	博甲 第 144 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項
学位論文題目	細菌 <i>Listeria innocua</i> キチナーゼの 発現と機能に関する解析

論文審査委員

主査 小山 文隆 教授

副査 今村 保忠 教授

〃 南雲 紳史 教授

〃 澤村 直哉 早稲田大学 准教授

工学院大学大学院

目次	
序論	3
キチン, キチンオリゴ糖	4
キチナーゼ	4
キチナーゼの構造	5
キチナーゼの作用機序	6
<i>Serratia marcescens</i> 由来キチナーゼの研究	6
細菌キチナーゼの役割	8
<i>Bacillus thuringensis</i> 由来キチナーゼ	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 由来キチナーゼ	8
<i>Escherichia coli</i> 由来キチナーゼ	9
<i>Listeria monocytogenes</i> 由来キチナーゼ	9
<i>Listeria innocua</i> 由来キチナーゼ	10
本研究の目的	10
参考文献	21
第 I 章 <i>L. innocua</i> キチナーゼ様遺伝子の発現および, 酵素化学的性質の比較	27
1-1 はじめに	28
1-2 実験試料と方法	28
1-2-1 細菌と培地	28
1-2-2 遺伝子クローニングおよび試薬	28
1-2-3 キチナーゼ遺伝子の取得および発現ベクターの構築	28
1-2-4 <i>lin0153</i> 遺伝子産物 (LinChi78) と <i>lin1996</i> 遺伝子産物 (LinChi35) の発現および精製	29
1-2-5 酵素の活性測定およびタンパク質濃度測定	30
1-2-6 LinChi78 と LinChi35 の pH および活性の温度依存性, ならびに pH および温度安定性	30
1-2-7 速度論パラメーターの算出	31
1-2-8 示差走査蛍光光度 (differential scanning fluorimetry, DSF) 分析	31
1-3 結果	31
1-3-1 <i>L. innocua</i> 由来 <i>lin0153</i> と <i>lin1996</i> 遺伝子のクローニングと大腸菌での発現	31
1-3-2 リステリアキチナーゼ活性の至適温度, pH および速度論パラメーター	32
1-4 考察	33
参考文献	44
第 II 章 LinChi78 と LinChi35 の多糖, オリゴ糖に対する作用機序	46
2-1 はじめに	47
2-2 実験試料と方法	47

2-2-1	実験試薬.....	47
2-2-2	LinChi78 と LinChi35 の発現と精製.....	47
2-2-3	コロイダルキチンの調製.....	47
2-2-4	多糖由来またはキチンオリゴ糖の生産物の分析.....	48
2-2-5	生産物のアノマー分析.....	48
2-3	結果.....	48
2-3-1	コロイダルキチンとキチンオリゴ糖に対するリステリアキチナーゼの加水分解活性.....	48
2-3-2	反応生産物の分析とアノマーの分析.....	49
2-4	考察.....	50
	参考文献.....	60
第 III 章	各種多糖に対する結合能力の解析および、他の細菌由来キチナーゼと比較.....	62
3-1	はじめに.....	63
3-2	実験試料と方法.....	63
3-2-1	実験試薬.....	63
3-2-2	LinChi78 と LinChi35 の発現と精製.....	63
3-2-3	BthChi74 キチナーゼ遺伝子の取得および発現ベクターの構築.....	63
3-2-4	BthChi74 の発現と精製.....	64
3-2-5	キチンビーズ, α -キチンとセルロースに対する結合解析.....	65
3-3	結果.....	65
3-3-1	BthChi74 の発現.....	65
3-3-2	LinChi78, LinChi35, および BthChi74 の各種多糖に対する結合.....	65
3-4	考察.....	66
	参考文献.....	75
第 IV 章	総合考察.....	77
	参考文献.....	80
	謝辞.....	82

序論

キチン, キチンオリゴ糖

キチンは *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) が β -1.4 グリコシド結合した多糖で (図 0-1), 自然界でセルロースに次いで多く, カビの細胞壁, 昆虫の外骨格, そして甲殻類の殻の主成分で発見されている. これらの生物は自身の骨格を支える構成物質としてキチンを調製し, 利用している. また, イカの甲骨, 昆虫の顎や針などにもキチンが含まれており, 主に強度の要求される部位で利用されている. 通常, キチンはカニの殻などから炭酸カルシウムおよびタンパク質を, それぞれ, 酸とアルカリで除去して得られる.

キチンは主に α -キチンや β -キチンと呼ばれる 2 種類の結晶構造で存在している. α -キチンは一番多い結晶構造で, キチン鎖が逆平行に折り重なり, 強い水素結合を持つコンパクトな結晶構造をしているのに対し, β -キチンはキチン鎖が平行に並び, 弱い相互作用で重なり合った反応性が高い結晶構造をとる [1].

キチンは, キチンを脱アセチル化したキトサンと共に, 生分解性, 生体親和性の他, 創傷治癒促進活性を初めとする様々な生物機能を有することから医薬分野, 化粧品分野, 食品分野, 農林水産分野, 工業分野などへの応用も行われている. また, このキチンを, 化学的もしくは酵素処理することにより得られるキチンオリゴ糖も, ほ乳類の細胞などで抗腫瘍活性や創傷治癒促進などの生理活性を持つことが知られている [2, 3]. キチンは非水溶性であるために, 反応性が低い. そこで, キチンを濃塩酸に懸濁し, 溶液中に分散させたコロイダルキチンが利用されている. コロイダルキチンはキチナーゼの活性測定において天然の高分子基質としてや, キチン分解細菌の培地の窒素源や炭素源として用いられている [4].

キチナーゼ

キチナーゼ (EC 3.2.1.14) は, キチンの β -1.4 グリコシド結合を加水分解する酵素で, 微生物, カビ, 植物, 昆虫やほ乳類などが生産している [5-9]. Carbohydrate-Active enZymes Database (CAZY: <http://www.cazy.org/>) 上で, キチナーゼは, 立体構造や触媒機構の違いから Glycoside hydrolases family (GH) 18 ファミリーと GH19 ファミリーに分類されている. GH18 キチナーゼは, 様々な動物, 植物, 昆虫, カビ, 細菌, ウィルスで見ついているのに対し, GH19 キチナーゼは, 植物と一部の細菌の遺伝子上でのみ発見されている [7, 10, 11]. GH18 酵素と GH19 酵素の上記の反応を司る触媒ドメインは, 類似したアミノ酸配列を共有せず, それぞれの三次元構造は異なる. その為, GH18 と GH19 の二つのファミリーは異なる祖先から進化した酵素だと考えられている [12].

キチナーゼの構造

GH18 キチナーゼは触媒ドメインだけではなく、いくつかのドメイン、代表的なものではフィブロネクチン III 型様ドメイン (FNIII) やキチン結合ドメイン (ChBD) で構成されている。GH18 キチナーゼの触媒ドメインは、8本の α ヘリックスと β シートが繰り返し並んだ $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造 (トリオースリン酸イソメラーゼバレル) をしており、一部の酵素では分解様式に影響を与える $\alpha+\beta$ 挿入ドメインが挿入されている (図 0-2A, B) [13]。FNIII は、3つの β シートと4つの β シートが逆平行に折りたたまれた基本構造を持つ β サンドイッチ型のドメインで、原核生物や動物などの広い生物のタンパク質から発見されている (図 0-3A, B) [14-16]。動物由来の FNIII は、Arg-Gly-Asp (RGD 配列) の短いモチーフが細胞接着に関与するのに対し [14]、細菌由来の FNIII では RGD 配列は見られず、糖基質の結合に関与する芳香族アミノ酸もタンパク質表面に露出していないことから、キチンなどの糖質との結合とは異なる役割を持つことが考えられ、現在ではキチナーゼの活性に寄与すると考えられている [15, 16]。最後に、ChBD は CAZY データベース上の Carbohydrate-Binding Module family (CBM) として分類され、キチナーゼが保有している CBM は主に CBM2, 5, 12, 14, 18 である (図 0-4A-D)。ChBD という呼称は、結晶性多糖であるキチンとの結合と加水分解能を促進することに由来している。これらドメイン上に存在している芳香族アミノ酸を置換した変異体と多糖との結合実験やオリゴ糖との共結晶解析により、これらアミノ酸が基質と相互作用することが報告されている [17-22]。

キチナーゼの触媒機構

この触媒機構は *Serratia marcescens* 由来キチナーゼ B (SmChiB) を用いて解析され、そのメカニズムが明らかにされてきた [23-28]。GH18 酵素の触媒機構は基質補助触媒機構と言われ、基質と酵素が中間体を形成し、加水分解反応を行う。触媒ドメイン中に存在する、GH18 キチナーゼ特有のモチーフである DXDXE の Glu 残基 (SmChiB の場合: Glu144) が、酸触媒、塩基触媒として働き、二つの Asp140 残基と Asp142 残基が触媒反応に重要な役割を持つ。これら二つのアスパラギン酸の中で Asp142 残基は触媒反応中でより重要な役割をもち、触媒残基である Glu144 残基と相互作用する up フォーム、Asp140 残基と相互作用する down フォーム、この二つのフォーム変化が触媒反応に必須であることが提唱されている [24]。次に、基質結合時の活性部位を示している (図 0-5A)。基質との結合時、down フォームの Asp142 残基はサブサイト-1 と結合する糖のアセトアミド基と相互作用し、up フォームへと誘導され、基質を固定する。結合した基質は舟形構造に変化する (図 0-5B)。Tyr214 残基も Asp142 残基と同様にアセトアミド基と相互作用し、その安定化に関与する。この二つのアミノ酸とアセトア

ミド基との相互作用により、アセトアミド基は歪んだ構造に固定され、アノマー炭素への求核攻撃が誘導される。基質と結合した Asp215 残基により pKa が上昇した Glu144 残基はグリコシド結合の酸素にプロトンを与え、同時に、アセトアミド基が C-1 位のアノマー炭素に求核攻撃を行い、オキサゾリン中間体を形成する (図 0-5C)。Asp142 残基がオキサゾリン中間体の陽イオンと相互作用し安定化する。Glu144 残基が塩基性触媒として働き、水分子を活性化する。そして、活性化された水分子がオキサゾリン中間体の C-1 位の炭素原子に求核攻撃を行い、オキサゾリン中間体がアセトアミド基に戻り、触媒反応が完了する。以上が、GH18 キチナーゼで提唱されている触媒機構である。

一方、GH19 キチナーゼは、 α ヘリックスと多数のループ構造で構成された触媒ドメインを持ち、その触媒機構は Brameld と Goddard らによって提案され、Ohnuma らによって、触媒機構が明らかになった (図 0-6) [29, 30]: 二つの Glu 残基と一つの Ser 残基によって反応が進行し、反応初期に片方の Glu 残基がグリコシド結合上の酸素にプロトンを供与し、切断する。活性部位周辺の Ser 残基のヒドロキシ基によって保持された水分子が、もう一方の Glu 残基によって水素を引き抜かれ活性化する。活性化した水分子を介して Ser 残基と Glu 残基、そして GlcNAc のアノマーの炭素が三角形の頂点に位置する構造をとり、活性化した水分子がアノマー炭素を求核攻撃し、加水分解を完了させる。

キチナーゼの作用機序

キチナーゼは、エキソ型とエンド型の分解様式を持つ [31]。エキソ型キチナーゼは、還元末端側または非還元末端側から、(GlcNAc)₂ を遊離する。一方、エンド型キチナーゼは、キチン鎖をランダムに分解する酵素で、二量体、三量体だけではなく、さらに重合度の高いキチンオリゴ糖を生産する [32]。キチナーゼの触媒機構で述べたように、アセトアミド基が GH18 酵素の触媒反応に必要である。つまり、生産物の還元末端側はアセトアミド基を持つ糖である。エキソ型の分解様式の場合、糖鎖の端から反応が開始される。その際、末端側から 2 番目の糖にアセトアミド基がない場合、つまり Tyr214 残基と Asp142 残基が相互作用できない場合、反応は進まず、アセトアミド基が Tyr214 残基と Asp142 残基と相互作用できる位置まで糖鎖がスライドし、三量体以上が生産される [31]。

Serratia marcescens 由来キチナーゼの研究

細菌由来キチナーゼの研究において、グラム陰性細菌の *Serratia marcescens* はキチン分解のモデル細菌として扱われ、この細菌の生産するキチナーゼに関して、多くの研究が報告されている。この節では *S. marcescens* 由来キチナーゼの

研究を基に、キチナーゼの構造と機能の関係についてまとめる。 *S. marcescens* は 3 種類のキチナーゼ (SmChiA, SmChiB, SmChiC) を生産する [33]。 SmChiA のドメインは N 末端側から、N 末端ドメインと GH18 触媒ドメインで構成され、 SmChiB では GH18 触媒ドメインと ChBD, SmChiC では GH18 触媒ドメイン, FNIII, そして ChBD で構成されている (図 0-7) [24, 34, 35]。 それぞれの触媒ドメインの構造に注目すると、 SmChiA と SmChiB は、触媒ドメインの TIM バレルの 7 番目の β シートと 7 番目 α ヘリックスの間に $\alpha+\beta$ 挿入ドメインと呼ばれるドメインが挿入されており、深いクレフト状の活性部位を形成している。 一方、 SmChiC は $\alpha+\beta$ 挿入ドメインを持たず、触媒クレフトは浅く、また、 SmChiA と SmChiB のキチナーゼに保存されているサブサイトのアミノ酸の一部を失っている (図 0-8A-C)。

SmChiA と SmChiB はエキソ型の分解様式を示すのに対し、 SmChiC はエンド型の分解様式であることが示された [31, 36]。 Zees らは、 SmChiA の $\alpha+\beta$ 挿入ドメインの欠失酵素を用いて、活性は大きく減少するものの、七量体までの重合度の高いオリゴ糖を生産することを報告した。 この結果は、 $\alpha+\beta$ 挿入ドメインがエキソ型とエンド型の重要な要因になることを示唆している [13]。

SmChiA では、 N 末端ドメインから触媒クレフト上にかけて直線状に芳香族側鎖を持つアミノ酸が並んでいる。 これらのアミノ酸置換の実験により、芳香族アミノ酸が基質認識に重要な役割を持つことが報告されている (図 0-9A) [37]。 また、一般的に酵素は加水分解後、基質から遊離し再度基質と結合するプロセスを経るのに対し、 SmChiA は基質と結合し、加水分解後に、基質と遊離することなく連続的に加水分解を進行させることが蛍光顕微鏡や分子間力顕微鏡を用いた実験によって観察された [37, 38]。 この連続した反応は、プロセッシブ型の分解様式とされ、従来の不連続な反応はノンプロセッシブ型と定義された。 この結果から、 GH18 キチナーゼはエキソ型またはエンド型、プロセッシブ型またはノンプロセッシブ型を組み合わせた分解様式を持つと提唱された。

$\alpha+\beta$ 挿入ドメインを持つ SmChiA と SmChiB の触媒ドメインを重ね合わせると、 SmChiA の N 末端ドメインと SmChiB の ChBD が逆向きに配置されている (図 0-9A, B) [37, 38]。 このドメインの向きによる分解挙動への影響を調べるために、 β キチンを基質とし、 SmChiA と SmChiB をそれぞれ単独での反応、または SmChiA の反応後に SmChiB を添加した際の基質の加水分解の様子を蛍光顕微鏡で観察した。 その結果、 SmChiA, SmChiB 単独の場合では、 β キチンの片側のみが先細りする様子が観察された。 一方、 SmChiA の反応後に、 SmChiB を追加した場合は、 β キチンの両端が先細ることが観察された。 この結果は SmChiA, SmChiB の多糖基質での加水分解の開始点が異なることを示した。 つまり、 SmChiA は糖の還元末端から、 SmChiB は非還元末端を起点として反応が進行す

ることが明らかにされている [37, 39].

細菌キチナーゼの役割

細菌は、栄養素、窒素源や炭素源を取得するためにキチナーゼを生産する [40]. 一方で、宿主への寄生や疾患に関与し、特に炎症性腸疾患などの急性および慢性の炎症発生に関与していると示唆され、細菌の持つ毒性の増幅や病原性を増幅する病原因子であると報告されている [41, 42].

Bacillus thuringiensis 由来キチナーゼ

B. thuringiensis はグラム陽性細菌で、土壌、水、昆虫の死骸、落葉樹の葉など、非常に幅広い環境から単離されている。この細菌は、内毒素である Cry タンパク質を生産する特徴を持ち、微生物殺虫剤として知られている [43, 44]. この Cry タンパク質は鱗翅目 (蝶や蛾)、双翅目 (ハエや蚊) および鞘翅目 (カブトムシやゾウムシ) などの多くの昆虫に対して毒性を持つことが実証されている [44, 45]. Cry タンパク質は、昆虫の中腸上皮細胞のレセプターに結合し、頂端膜に孔を形成し、細胞死へと導く [45]. しかし、中腸の上皮細胞は、キチン質であるペリトロフィック膜に覆われ、Cry タンパク質の浸潤を抑制している [46]. キチナーゼの存在下で、細菌毒性が増幅されることから、キチナーゼがペリトロフィック膜を分解することで、Cry タンパク質の上皮細胞への浸潤を促進し、毒性を向上させることが提案されており、*B. thuringiensis* 固有のキチナーゼを高発現させる試みや種々のキチナーゼを導入する研究が進められている [45-47].

Pseudomonas aeruginosa 由来キチナーゼ

P. aeruginosa は、ヒトに感染する日和見病原体で、嚢胞性線維症 (CF) の主要な原因菌である [48, 49]. 土壌中の菌からはキチン結合タンパク質 (CBP) やキチナーゼは検出されないが、CF 患者から単離された細菌から両タンパク質が見つかっている。また、特に CBP は感染段階で発現量が異なり、感染後期と比較して感染初期および急性感染で発現量が上昇する [42]. これは、CBP が細菌の肺上皮細胞への初期接着において重要であり、肺感染の初期段階で、本菌がこれらのタンパク質を利用していることを強く示唆している。また、DNA マイクロアレイ分析においても、非 CF 関連株より CF 関連菌の CBP 発現量が高いこと、さらに、キチナーゼも高い転写レベルを示すことから、これらのタンパク質が病原因子として働いていることが示唆されている。

***Escherichia coli* 由来キチナーゼ**

大腸菌はヒトの腸内で検出されるグラム陰性桿菌で、通常ヒト腸内に常在している。この細菌はキチンを炭素源として利用しないにもかかわらず、病原性株と非病原性株を含む 13 種の大腸菌株はキチナーゼ遺伝子を持つ。クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD) 患者では、附着性侵襲性大腸菌 (adherent invasive *Escherichia coli*, AIEC) が多く検出され、キチナーゼ (EcChiA) が腸上皮細胞への接着に関与している [42]。実際、EcChiA 欠損 AIEC は、野生型の AIEC と比べ、マウスの腸上皮細胞への付着が減少する [50]。さらに、EcChiA の ChBD が、マウスの腸上皮細胞上のキチナーゼ様タンパク質 (chitinase 3-like-1, CHI3L1) の Asp 残基上の N 型糖鎖を介して結合することがわかっている。

***Listeria monocytogenes* 由来キチナーゼ**

Listeria monocytogenes はグラム陽性であり、幅広い環境に分布している通性嫌気性の細菌である [51]。 *L. monocytogenes* は食品媒介病原体で、妊娠中の女性や高齢者など免疫力が低下した方が発症するヒトリステリア症を引き起こす [52]。 *L. monocytogenes* は、二つのキチナーゼ、LmChiA (LMO1883) と LmChiB (LMO0105)、そして今までキチン結合タンパク質 (CBP) と呼ばれていた、溶解性多糖モノオキシゲナーゼ (LPMO, LMO2467) を含むキチン分解システムをもつ [53-55]。 LmChiA と LmChiB は、キチンまたはキチンオリゴマーの加水分解に寄与している。また、LmChiA はマクロファージの細胞質内で発現が促進されることから、宿主細胞内での生存と増殖に必要とされている [56]。 LmChiA、LmChiB、そして LPMO をそれぞれ欠損した *L. monocytogenes* は、マウスの脾臓と肝臓において増殖が抑制された [54]。また、 *L. monocytogenes* に感染したマウス組織の免疫応答に関与する mRNA の生産量を解析した結果、サイトカインである Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) や Interleukin (IL)-1 の mRNA の生産量は、LmChiA 欠損体と比べて変化が見られ、自然免疫応答に関与する inducible nitric oxide synthase (iNOS) の mRNA の生産量が減少していた。さらに、LmChiA 欠損 *L. monocytogenes* は、iNOS 遺伝子を欠損したマウス組織で病原性が回復する。これらの結果から、LmChiA は病原性に関連する重要な病原因子として同定され、宿主の自然免疫を抑制することによって病原性を高めることが報告されている [57]。 LmChiB は、LmChiB 欠損 *L. monocytogenes* が細胞性粘菌キイロタマホコリカビに感染した際に、感染初期の段階で生存性が著しく減少する。このことから LmChiB は、宿主細胞のコロニー形成時ににおいて役割を持つという報告もある [58]。これらの結果から、細菌リステリアのキチナーゼは、感染に重要な役割を担っていることが考えられている。しかし、マウス組織とキイロタマ

ホコリカビはキチンを合成していないため、LmChiA や LmChiB の細胞内での明確な標的が現在明らかになっておらず、両酵素の基質特異性に関する研究が進んでいる状況である。

***Listeria innocua* 由来キチナーゼ**

Listeria innocua は *L. monocytogenes* と共通の祖先から進化した非病原性細菌であり、*L. monocytogenes* ゲノム上のコードされる遺伝子の内、病原性関連遺伝子を含む、41 遺伝子を欠損している。欠損した遺伝子には、腸の細胞膜通過に重要な役割を持つ表面タンパク質インターナリン A (InlA) や InlB, 食細胞の液胞からの脱出を促進するタンパク質であるリステオロイシン O (LLO), ホスホリパーゼ A (PlcA), 細胞間の拡散に必要なタンパク質, アクチンアセンブリ誘導タンパク質 (ActA) とホスホリパーゼ B (PlcB) をコードする遺伝子が含まれている。これらの病原性遺伝子は遺伝子座上にクラスターを形成しており、*L. innocua* はこのクラスターを欠損している [59]。その為に、*L. innocua* は非病原性である。興味深いことに *L. innocua* が喪失している LLO, PlcA, PlcB, および InlC などの病原性に関連する分泌タンパク質の内、推定キチナーゼは病原性関連クラスター上には存在していないため保存され、*L. monocytogenes* と *L. innocua* は推定キチン分解システムを共通して保有している [59]。 *L. innocua* のゲノム上には二つのキチナーゼ様遺伝子 (*lin0153*, *lin1996*) と LPMO 様遺伝子 (*lin2611*) がコードされている。この推定キチン分解システムは *L. monocytogenes* の生産するキチン分解システムタンパク質 (LmChiB, LmChiA, LMO2467) とアミノ酸配列の同一性を比べると、それぞれ 99%, 97%と 83%を示す [59-61]。

本研究の目的

これまで、述べてきたように細菌キチナーゼは、キチンを窒素源や炭素源にするためにキチンを分解するだけではなく、細菌の病原性の増加、宿主細胞への接着、毒性の増強などの機能を持つことが明らかにされている。しかし、これらの細菌由来キチナーゼの役割については、未解明な部分が多い。特に、*L. monocytogenes* が引き起こすヒト疾患でのキチナーゼの役割は動物細胞を用いた研究で議論されているが、天然基質や人工基質を用いた酵素化学的性質の基礎的な研究は少ない。そこで、リステリア属キチナーゼのさらなる知見を得るために非病原性 *L. innocua* 由来のキチナーゼに注目した。

リステリア属キチナーゼの詳細な特性解析は、リステリア属の病原性におけるキチナーゼの機能的役割の理解拡大につながることから、本研究では、非病原性細菌と病原性細菌に共通して保存されているリステリア属キチナーゼの詳細

な酵素化学的性質とそれらの機能を明らかにすることを目的とした。まず、第 I 章では、*L. innocua* からキチナーゼ様遺伝子 (*lin0153* と *lin1996* 遺伝子) をクローニングし、大腸菌でそれらを発現し、精製を行った。精製したタンパク質と人工基質 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside [4NP-(GlcNAc)₂]を用いて、酵素活性、pH と温度に対する活性の依存性と安定性、そして速度論パラメーターを解析した。第 II 章では、天然基質であるコロイダルキチンや鎖長の異なるキチンオリゴ糖を基質として加水分解反応を実施し、得られた生産物を解析し、それぞれの酵素の作用機序を考察した。第 III 章では非結晶性多糖であるキチンビーズや結晶性多糖である α -キチンとセルロースに対する結合活性を解析し、*B. thuringiensis* 由来キチナーゼ BtChi74 の結合能力と比較した。第 IV 章では *L. innocua* 由来キチナーゼの詳細な酵素化学的性質、作用機序、結合能力に関する結果をまとめ、考察した。

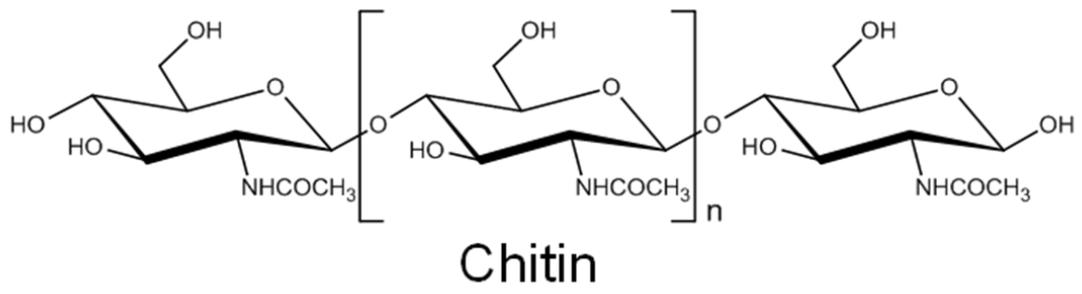


図 0-1. キチンの構造

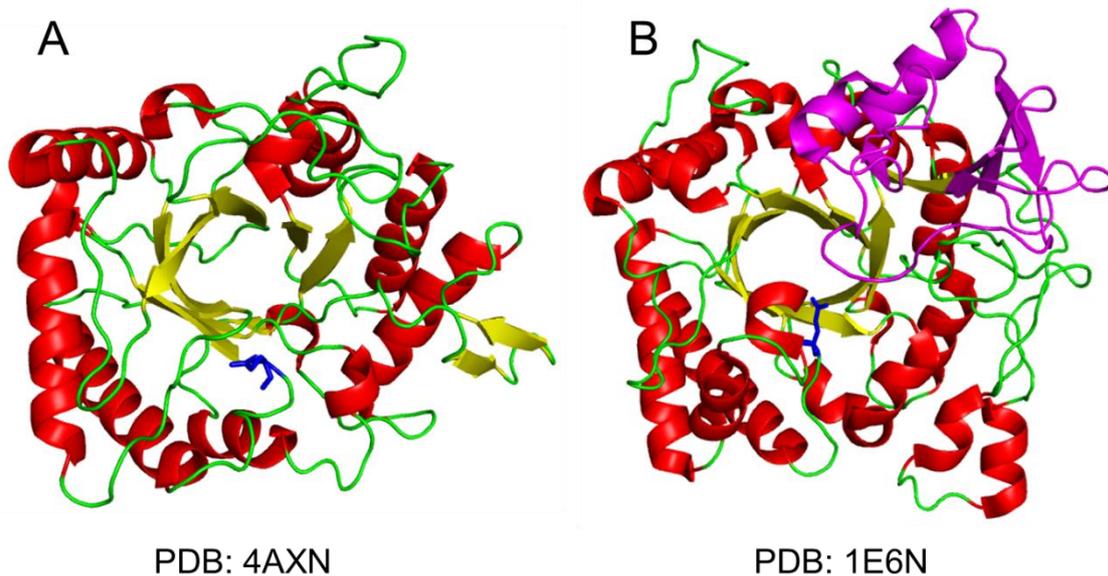


図 0-2. GH18 キチナーゼの触媒ドメインの結晶構造

A: SmChiC (PDB: 4AXN), B: SmChiB (PDB: 1E6N) の触媒ドメインを示している。αヘリックスは赤、βシートは黄色、紫色はα+β挿入ドメインを示している。青色のアミノ酸側鎖は触媒残基を示している。

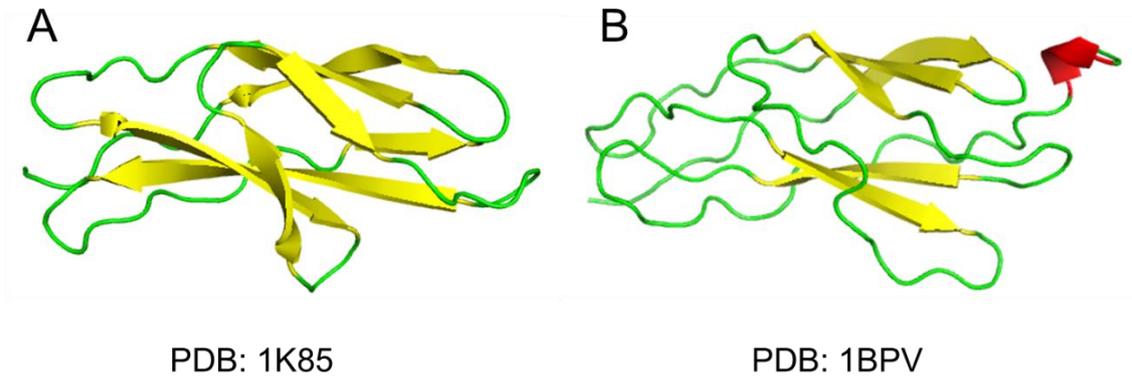
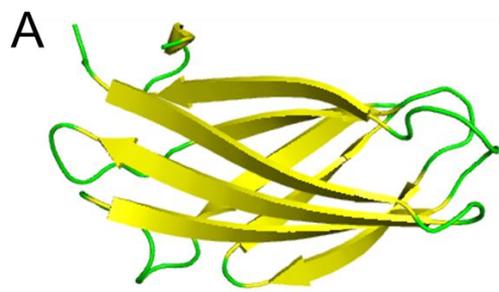
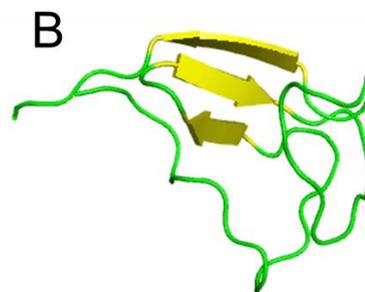


図 0-3. 細菌由来とヒト由来のフィブロネクチン 3 型ドメインの結晶構造
A: *Bacillus circulans* WL-12 由来キチナーゼ A1 の FNIII (PDB: 1K85), B: ヒト心臓の筋肉由来 TITIN の FNIII (PDB: 1BPV) を示している. α ヘリックスは赤, β シートは黄色を示している.



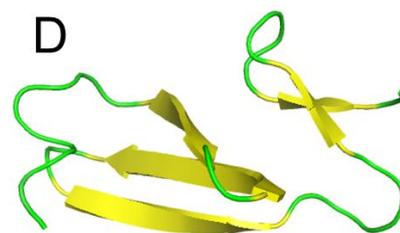
PDB: 2CWR



PDB: 2D49



PDB: 1ED7



PDB: 5HBF

図 0-4. Carbohydrate-Binding Module2, 5, 12, 14 の結晶構造

A: *Pyrococcus furiosus* 由来キチナーゼの CBM2 (PDB: 2CWR), B: *Streptomyces griseus* 由来キチナーゼ C の CBM5 (PDB: 2D49), C: *Bacillus circulans* WL-12 由来キチナーゼ A1 の CBM12 (PDB: 1ED7), D: ヒト由来キトトリオシダーゼの CBM14 (5HBF) を示している. β シートは黄色を示している.

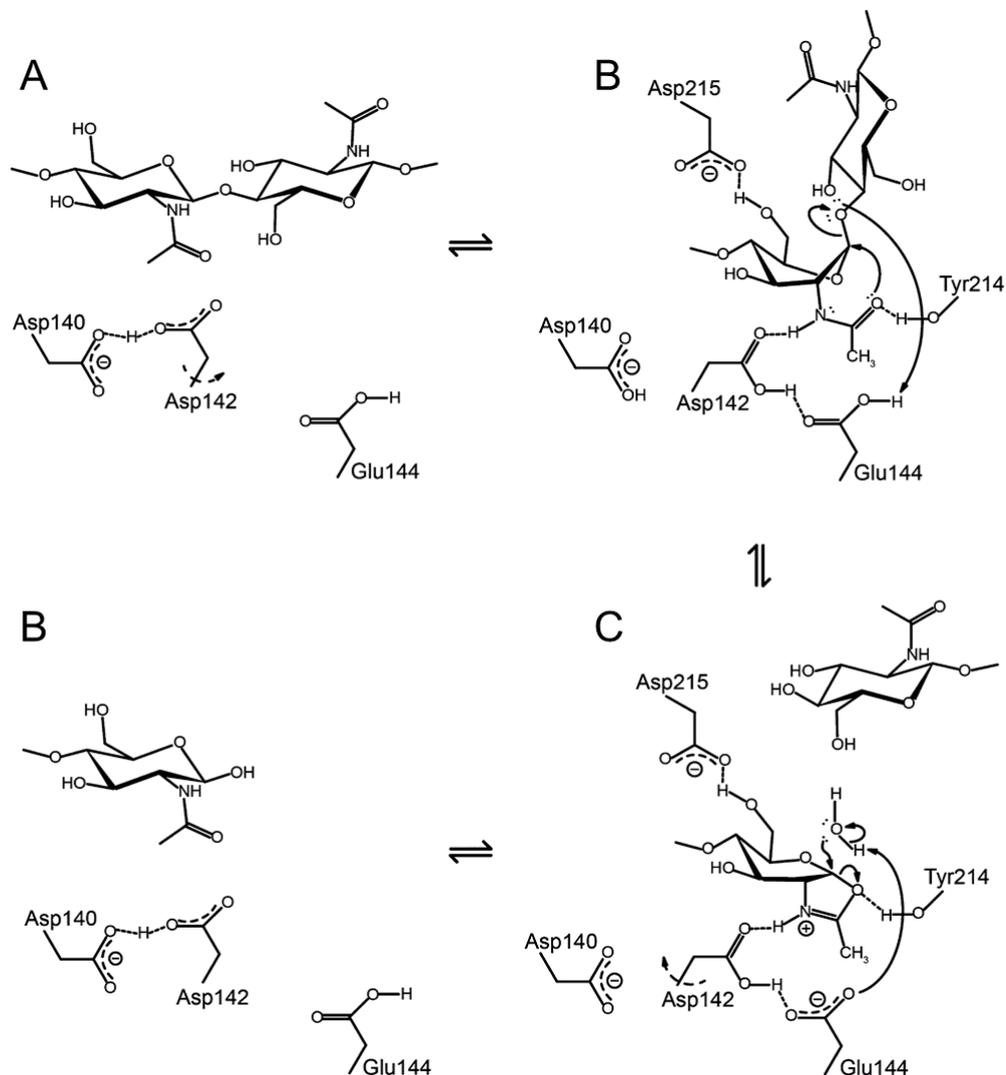


図 0-5. GH18 キチナーゼの加水分解反応の反応機構

Vaaje-Kolstad らが示した反応機構の模式図 [29]

A は基質結合時の活性部位を示している。基質は不活性状態の酵素と結合し Asp142 の Glu144 へ回転を誘導する。B は舟形の立体構造で結合した基質を示している。Glu144 は舟形の立体構造をした糖に酸触媒として働き、酸素をプロトン化する。同時に、基質のアセトアミド基によって求核攻撃が行われ、脱離を促進し、オキサゾリニウムイオン中間体の形成を誘導する。C は形成したオキサゾリイオン中間体を示している。Glu144 は塩基触媒として作用し、オキサゾリニウムイオンを攻撃する水分子を活性化す。D は反応後の活性部位を示している。

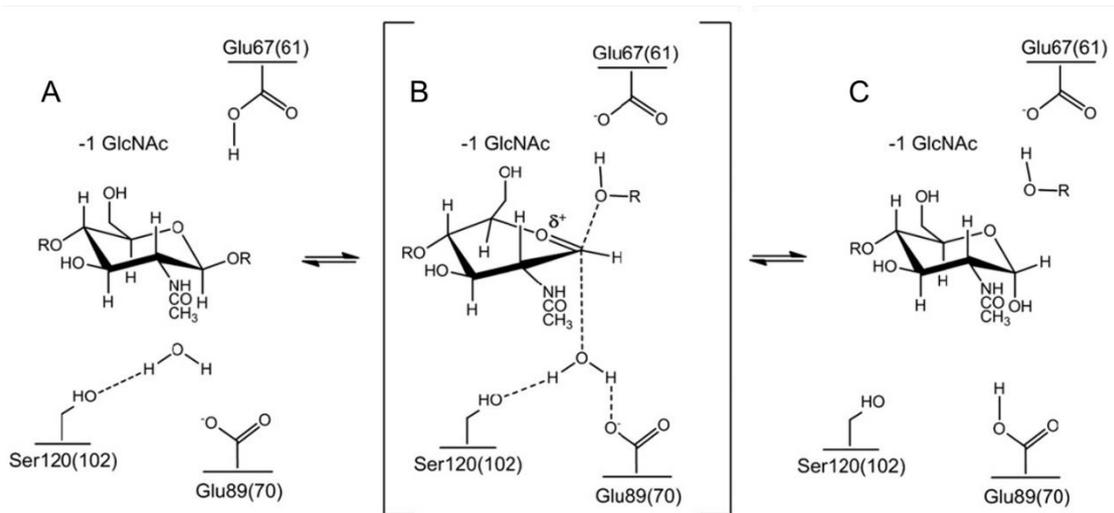


図 0-6. GH19 キチナーゼの加水分解反応の反応機構

Ohnuma らが示した反応機構の模式図 [31]

A は基質と結合する前を示している. B は加水分解反応時の活性部位を示している. C は反応後の活性部位を示している.

SmChiA



SmChiB



SmChiC



図 0-7. *S. marcescens* の生産するキチナーゼの模式図

上から順に SmChiA, SmChiB, SmChiC を示している. FNIII : フィブロネクチン III 型様ドメイン, ChBD : キチン結合ドメインを示している.

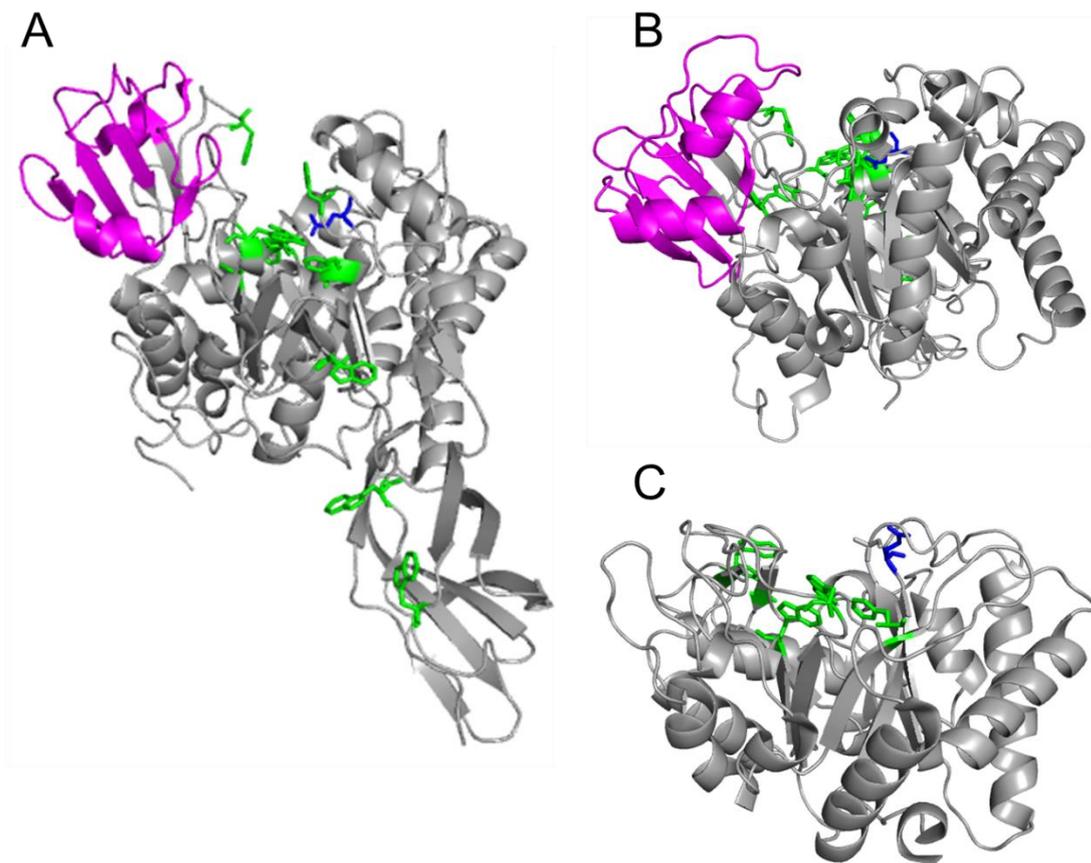


図 0-8. *S. marcescens* キチナーゼの結晶構造モデル

A: SmChiA (PDB: 2WMO), B: SmChiB (PDB: 1E6N), C: SmChiC (PDB: 4AXN) を示している. 青色のアミノ酸側鎖は触媒残基, 緑色のアミノ酸側鎖は基質結合側鎖, 紫色は $\alpha+\beta$ 挿入ドメインを示している.

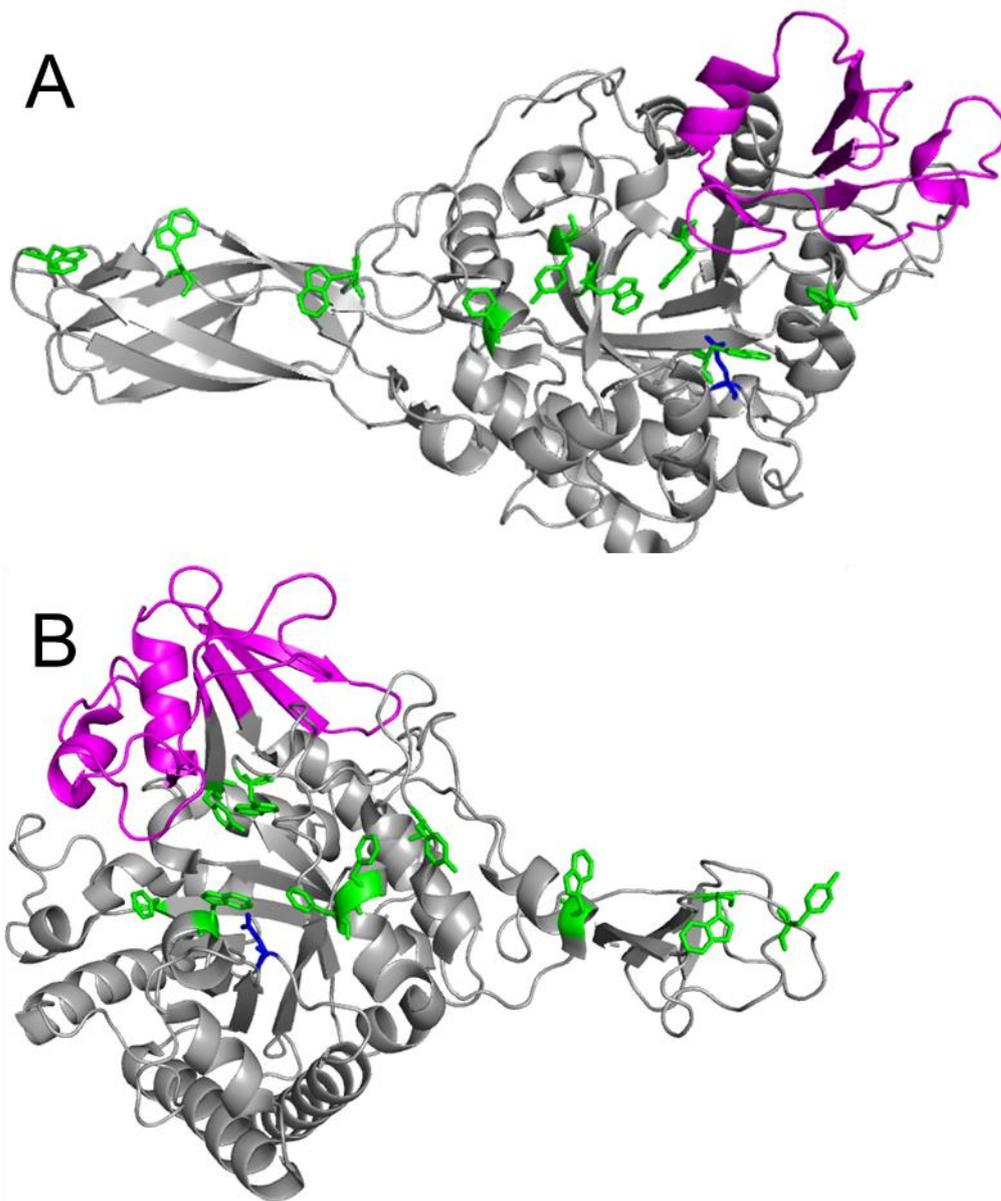


図 0-9. *S. marcescens* キチナーゼの結晶構造モデル

A: SmChiA (PDB: 2WMO), B: SmChiB (PDB: 1E6N) を示している. 青色のアミノ酸側鎖は触媒残基, 緑色のアミノ酸側鎖は基質結合側鎖, 紫色は $\alpha+\beta$ 挿入ドメインを示している.

参考文献

1. **Kurita K** (2001) Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog Polym Sci* 26: 1921-1971. doi: org/10.1016/S0079-6700(01)00007-7
2. **Aam BB, Heggset EB, Norberg AL, Sørli M, Vårum KM, Eijsink VG** (2010) Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Mar Drugs* 8:1482-1517. doi: 10.3390/md8051482
3. **Khoushab F, Yamabhai M** (2010) Chitin research revisited. *Mar Drugs* 8:1988-2012. doi: 10.3390/md8071988.
4. キチン,キトサン研究会 (1988) 最後のバイオマス キチン, キトサン, 技報堂出版, 第1版: 13
5. **Kasprzewska A** (2003) Plant chitinases -regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* 8: 809-824.
6. **Donnelly LE, Barnes PJ** (2004) Acidic mammalian chitinase-a potential target for asthma therapy. *Trends Pharmacol Sci* 25: 509-511. doi: 10.1016/j.tips.2004.08.002
7. **Duo-Chuan L** (2006) Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161: 345-360. doi: 10.1007/s11046-006-0024-y
8. **Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK** (2007) Bacterial chitinases: properties and potential, *Crit Rev Biotechnol* 27: 21-28. doi: 10.1080/07388550601168223
9. **Arakane Y, Muthukrishnan S** (2010) Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cell Mol Life Sci* 67: 201-216. doi: 10.1007/s00018-009-0161-9
10. **Ohno T, Armand S, Hata T, Nikaidou N, Henrissat B, Mitsutomi M, Watanabe T** (1996) A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J Bacteriol* 178: 5065-5070
11. **Kawase T, Saito A, Sato T, Kanai R, Fujii T, Nikaidou N, Miyashita K, Watanabe T.** (2004) Distribution and phylogenetic analysis of family 19 chitinases in Actinobacteria. *Appl Environ Microbiol* 70: 1135-1144. doi: 10.1128/AEM.70.2.1135-1144.2004
12. **Rathore AS, Gupta RD** (2015) Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives. *Enzyme Res* 791907. doi: 10.1155/2015/791907
13. **Zees AC, Pyrpassopoulos S, Vorgias CE** (2009) Insights into the role of the (alpha+beta) insertion in the TIM-barrel catalytic domain, regarding the stability and the enzymatic activity of chitinase A from *Serratia marcescens*. *Biochim Biophys Acta* 1794: 23-31. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.09.018

14. **Leahy DJ, Aukhil I, Erickson HP** (1996) 2.0 A crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region. *Cell* 84: 155-164. doi: org/10.1016/S0092-8674(00)81002-8
15. **Jee JG, Ikegami T, Hashimoto M, Kawabata T, Ikeguchi M, Watanabe T, Shirakawa M** (2002) Solution structure of the fibronectin type III domain from *Bacillus circulans* WL-12 chitinase A1. *J Biol Chem* 277: 1388-1397. doi: 10.1074/jbc.M109726200
16. **Lin FP, Wu CY, Chen HN, Lin HJ** (2015) Effects of C-terminal domain truncation on enzyme properties of *Serratia marcescens* chitinase C. *Appl Biochem Biotechnol* 175: 3617-3627. doi: 10.1007/s12010-015-1530-5
17. **Suzuki K, Taiyoji M, Sugawara N, Nikaidou N, Henrissat B, Watanabe T** (1996) The third chitinase gene (chiC) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. *Biochem J* 343: 587-596. doi: 10.1042/bj3430587
18. **Tjoelker LW, Gosting L, Frey S, Hunter CL, Trong HL, Steiner B, Brammer H, Gray PW** (2000) Structural and functional definition of the human chitinase chitin-binding domain. *J Biol Chem* 275: 514-520. doi: 10.1074/jbc.275.1.514
19. **Ikegami T, Okada T, Hashimoto M, Seino S, Watanabe T, Shirakawa M** (2000) Solution structure of the chitin-binding domain of *Bacillus circulans* WL-12 chitinase A1. *J Biol Chem*. 275: 13654-13661. doi: 10.1074/jbc.275.18.13654
20. **Akagi K, Watanabe J, Hara M, Kezuka Y, Chikaishi E, Yamaguchi T, Akutsu H, Nonaka T, Watanabe T, Ikegami T** (2006) Identification of the substrate interaction region of the chitin-binding domain of *Streptomyces griseus* chitinase C. *J. Biochem* 139: 483-493. doi: 10.1093/jb/mvj062
21. **Nakamura T, Mine S, Hagihara Y, Ishikawa K, Ikegami T, Uegaki K** (2008) Tertiary structure and carbohydrate recognition by the chitin-binding domain of a hyperthermophilic chitinase from *Pyrococcus furiosus*. *J Mol Biol* 381: 670-680. doi: 10.1016/j.jmb.2008.06.006
22. **Uni F, Lee S, Yatsunami R, Fukui T, Nakamura S** (2012) Mutational analysis of a CBM family 5 chitin-binding domain of an alkaline chitinase from *Bacillus* sp. J813. *Biosci Biotechnol Biochem* 76: 530-535. doi: 10.1271/bbb.110835
23. **Tews I, Terwisscha van Scheltinga, AC, Perrakis A, Wilson KS, Dijkstra BW** (1997) Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. *J Am Chem Soc* 119: 7954-7959. doi: 10.1021/ja970674i
24. **van Aalten DM, Komander D, Synstad B, Gåseidnes S, Peter MG, Eijsink VG.** (2001) Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-

- chitinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 98: 8979-8984. doi: 10.1073/pnas.151103798
25. **Synstad B, Gåseidnes S, Van Aalten DM, Vriend G, Nielsen JE, Eijsink VG.** (2004) Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. FEBS J 271: 253-262. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03923.x
 26. **Vaaje-Kolstad G, Houston DR, Rao FV, Peter MG, Synstad B, van Aalten DM, Eijsink VG.** (2004) Structure of the D142N mutant of the family 18 chitinase ChiB from *Serratia marcescens* and its complex with allosamidin. Biochim Biophys Acta 1696: 103-111. doi: org/10.1016/j.bbapap.2003.09.014
 27. **Zakariassen H, Hansen MC, Jøranli M, Eijsink VG, Sørli M.** (2011) Mutational Effects on Transglycosylating Activity of Family 18 Chitinases and Construction of a Hypertransglycosylating Mutant. Biochemistry 50: 5693-5703. doi: 10.1021/bi2002532
 28. **Vaaje-Kolstad G, Horn SJ, Sørli M, Eijsink VG.** (2013) The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* - a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. FEBS J 280: 3028-3049. doi: 10.1111/febs.12181
 29. **Brameld KA, Goddard WA 3rd.** (1998) The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. Proc Natl Acad Sci U S A. 95: 4276-4281.
 30. **Ohnuma T, Umemoto N, Nagata T, Shinya S, Numata T, Taira T, Fukamizo T.** (2014) Crystal structure of a “loopless” GH19 chitinase in complex with chitin tetrasaccharide spanning the catalytic center. Biochim Biophys Acta 1844: 793-802. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.02.013
 31. **Horn SJ, Sørbotten A, Synstad B, Sikorski P, Sørli M, Vårum KM, Eijsink VG** (2006) Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. FEBS J 273: 491-503. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.05079.x
 32. **Calvo P, Reglero A, Cabezas JA** (1978) Purification and properties of beta-N-acetylhexosaminidase from the mollusc *Helicella ericetorum* Müller. Biochem J. 175: 743-750.
 33. **Fuchs RL, McPherson SA, Drahos DJ** (1986) Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase. Appl Environ Microbiol 51: 504-509
 34. **Perrakis A, Tews I, Dauter Z, Oppenheim AB, Chet I, Wilson KS, Vorgias CE** (1994) Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. Structure 2: 1169-1180.

35. **Payne CM, Baban J, Horn SJ, Backe PH, Arvai AS, Dalhus B, Bjørås M, Eijsink VG, Sørli M, Beckham GT, Vaaje-Kolstad G** (2012) Hallmarks of processivity in glycoside hydrolases from crystallographic and computational studies of the *Serratia marcescens* chitinases. *J Biol Chem* 287: 36322-363230. doi: 10.1074/jbc.M112.402149
36. **Synstad B, Vaaje-Kolstad G, Cederkvist FH, Saua SF, Horn SJ, Eijsink VG, Sørli M** (2008) Expression and characterization of endochitinase C from *Serratia marcescens* BJL200 and its purification by a one-step general chitinase purification method. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 715-723. doi: 10.1271/bbb.70594
37. **Uchiyama T, Katouno F, Nikaidou N, Nonaka T, Sugiyama J, Watanabe T** (2001) Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase A from *Serratia marcescens* 2170. *J Biol Chem* 276: 41343-41349. doi: 10.1074/jbc.M103610200
38. **Fukuda S, Uchihashi T, Iino R, Okazaki Y, Yoshida M, Igarashi K, Ando T** (2013) High-speed atomic force microscope combined with single-molecule fluorescence microscope. *Rev Sci Instrum* 84: 073706. doi: 10.1063/1.4813280
39. **Hult EL, Katouno F, Uchiyama T, Watanabe T, Sugiyama J** (2005) Molecular directionality in crystalline beta-chitin: hydrolysis by chitinases A and B from *Serratia marcescens* 2170. *Biochem J* 388: 851-856. doi: 10.1042/BJ20050090
40. **Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS** (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 71: 773-782. doi: 10.1007/s00253-005-0183-7
41. **Killiny N, Prado SS, Almeida RP** (2010) Chitin utilization by the insect-transmitted bacterium *Xylella fastidiosa*. *Appl Environ Microbiol* 76: 6134-6140. doi: 10.1128/AEM.01036-10
42. **Tran HT, Barnich N, Mizoguchi E** (2011) Potential role of chitinases and chitin-binding proteins in host-microbial interactions during the development of intestinal inflammation. *Histol Histopathol* 26: 1453-1464. doi: 10.14670/HH-26.1453
43. **Didelot X, Barker M, Falush D, Priest FG** (2009) Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. *Syst Appl Microbiol* 32: 81-90. doi: 10.1016/j.syapm.2009.01.001
44. **Xu C, Wang BC, Yu Z, Sun M** (2009) Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins (Basel)* 6: 2732-2770. doi: 10.3390/toxins6092732

45. **Höfte H, Whiteley HR** (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 53: 242-255.
46. **Pardo-López L, Muñoz-Garay C, Porta H, Rodríguez-Almazán C, Soberón M, Bravo A** (2009) Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 30: 589-595. doi: 10.1016/j.peptides.2008.07.027
47. **Sampson MN, Gooday GW** (1998) Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology* 144: 2189-2194. doi: 10.1099 / 00221287-144-8-2189
48. **Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warren P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV** (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964. doi: 10.1038/35023079
49. **Manos J, Arthur J, Rose B, Bell S, Tingpej P, Hu H, Webb J, Kjelleberg S, Gorrell MD, Bye P, Harbour C** (2009) Gene expression characteristics of a cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm and planktonic growth. *FEMS Microbiol Lett* 292: 107-114. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01472.x
50. **Low D, Tran HT, Lee IA, Dreux N, Kamba A, Reinecker HC, Darfeuille-Michaud A, Barnich N, Mizoguchi E** (2013) Chitin-binding domains of *Escherichia coli* ChiA mediate interactions with intestinal epithelial cells in mice with colitis. *Gastroenterology* 145: 602-612. doi: 10.1053/j.gastro.2013.05.017
51. **Farber JM, Peterkin PI** (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* 55: 476-511.
52. **Cossart P** (2011) Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 19484-19491. doi: 10.1073/pnas.1112371108
53. **Leisner JJ, Larsen MH, Jørgensen RL, Brøndsted L, Thomsen LE, Ingmer H** (2008) Chitin hydrolysis by *Listeria* spp., including *L. monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 74: 3823-3830. doi: 10.1128/AEM.02701-07
54. **Chaudhuri S, Bruno JC, Alonzo F 3rd, Xayarath B, Cianciotto NP, Freitag NE** (2010) Contribution of chitinases to *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* 76: 7302-7305. doi: 10.1128/AEM.01338-10

55. **Paspaliari DK, Loose JS, Larsen MH, Vaaje-Kolstad G** (2015) *Listeria monocytogenes* has a functional chitinolytic system and an active lytic polysaccharide monooxygenase. *FEBS J* 282: 921-936. doi: 10.1111/febs.13191
56. **Chatterjee SS, Hossain H, Otten S, Kuenne C, Kuchmina K, Machata S, Domann E, Chakraborty T, Hain T** (2006) Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 74: 1323-1338. doi: 10.1128/IAI.74.2.1323-1338.2006
57. **Chaudhuri S, Gantner BN, Ye RD, Cianciotto NP, Freitag NE** (2013) The *Listeria monocytogenes* ChiA chitinase enhances virulence through suppression of host innate immunity. *MBio* 4: e00617-12. doi:10.1128/mBio.00617-12
58. **Frederiksen RF, Leisner JJ** (2015) Effects of *Listeria monocytogenes* EGD-e and *Salmonella enterica* ser. Typhimurium LT2 chitinases on intracellular survival in *Dictyostelium discoideum* and mammalian cell lines. *FEMS Microbiol Lett* 362. pii: fnv067. doi: 10.1093/femsle/fnv067
59. **Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F, Berche P, Bloecker H, Brandt P, Chakraborty T, Charbit A, Chetouani F, Couvé E, de Daruvar A, Dehoux P, Domann E, Domínguez-Bernal G, Duchaud E, Durant L, Dussurget O, Entian KD, Fsihi H, García-del Portillo F, Garrido P, Gautier L, Goebel W, Gómez-López N, Hain T, Hauf J, Jackson D, Jones LM, Kaerst U, Kreft J, Kuhn M, Kunst F, Kurapkat G, Madueno E, Maitournam A, Vicente JM, Ng E, Nedjari H, Nordsiek G, Novella S, de Pablos B, Pérez-Díaz JC, Purcell R, Rimmel B, Rose M, Schlueter T, Simoes N, Tierrez A, Vázquez-Boland JA, Voss H, Wehland J, Cossart P** (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294: 849-852. doi: 10.1126/science.1063447
60. **den Bakker HC, Bundrant BN, Fortes ED, Orsi RH, Wiedmann M** (2010) A population genetics-based and phylogenetic approach to understanding the evolution of virulence in the genus *Listeria*. *Appl Environ Microbiol* 76: 6085-6100. doi: 10.1128/AEM.00447-10
61. **den Bakker HC, Cummings CA, Ferreira V, Vatta P, Orsi RH, Degoricija L, Barker M, Petrauskene O, Furtado MR, Wiedmann M** (2010) Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics* 11: 688. doi: 10.1186/1471-2164-11-688

第 I 章 *L. innocua* キチナーゼ
様遺伝子の発現および，酵素化学
的性質の比較

1-1 はじめに

病原性細菌由来キチナーゼには、キチンを分解し窒素源や炭素源を取得する以外にも、病原性の増幅や細胞内での生存性の向上に寄与していることが知られている。しかし、詳細な酵素化学的性質の報告は少ない。この章では、病原性細菌 *L. monocytogenes* の感染時に発現量が、増加するキチナーゼ遺伝子と類似した推定アミノ酸配列を持つ非病原性細菌 *L. innocua* が発現するキチナーゼ様遺伝子、*lin0153* 遺伝子と *lin1996* 遺伝子を取得し、それら遺伝子産物を宿主大腸菌で発現させ、発現したタンパク質の酵素化学的性質を解析することを目的とした。

1-2 実験試料と方法

1-2-1 細菌と培地

L. innocua (ATCC No. 3309) は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) から購入し、ATCC 培地 (3.7% Bacto Brain Heart Infusion) を用いて 30 °C で培養した。遺伝子工学用と発現用には、それぞれ大腸菌 DH5 α と BL21 (DE3) を利用した。前培養は LB 培地 (1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl, pH 7.0) を用い、固体培地は、LB 培地に 1.5% の寒天を混合し調製した。大腸菌でのタンパク質発現用の液体培地は 2 \times YT 培地 (1.6% Bacto tryptone, 1% Bacto yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0) を用いた。また、必要に応じて抗生物質アンピシリン (50 μ g/ml) を培地に添加した。

1-2-2 遺伝子クローニングおよび試薬

遺伝子操作は、Sambrook と Russell によって記載された手順に従って実施した [1]。遺伝子工学の操作に使用した酵素は、TAKARA BIO INC. (Shiga, Japan) から購入した。培地調製で使用した試薬、Bacto tryptone, Bacto yeast extract と Brain Heart Infusion は、Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) から購入した。

1-2-3 キチナーゼ遺伝子の取得および発現ベクターの構築

L. innocua 菌体を Brain Heart Infusion 培地中 30 °C で培養し、得られた菌体から染色体 DNA を ISOPLANT II (Nippon Gene) を用いて取得した。染色体 DNA をテンプレートとし、PCR 法により *Lin1996*, *Lin0153* キチナーゼ様遺伝子を増幅した。PCR 法は、鋳型として染色体 DNA 24 ng, 15 pmol の各フォワード (Fw) およびリバース (Rv) プライマーと DNA ポリメラーゼの 1 U (KOD -Plus-, TOYOBO, Osaka, Japan) を使用して、94 °C, 2 分間を 1 サイクル、続いて 94 °C

で 10 秒, 60 °C で 30 秒, 68 °C で 2.5 分間を 35 サイクルで実施した. 各プライマーは, Glaser らによる報告に基づき, *lin0153* 遺伝子と *lin1996* 遺伝子の 5'末端または 3'末端に, それぞれ制限酵素 *Bam*HI, *Eco*RI の認識部位を付加するように設計した [2]. また, Rv プライマーは, 発現したタンパク質の C 末端にヒスチジンタグ [(His)₆ Tag] が付加されるように設計した. その配列を以下に示す.

lin0153 遺伝子用

Fw プライマー: 5'-CGGGATCCCGGCTGAAAATGTACCACAATATCG-3'

Rv プライマー: 5'-CGGAATTCCGATTTATTAACAACCAAGGACC-3'

lin1996 遺伝子用

Fw プライマー: 5'-CGGGATCCCGGCGACGGATGACGCTTCT-3'

Rv プライマー: 5'-CGGAATTCCGTTTAGTACCAAC GATTGGTCCATAA-3'

(下線は制限酵素認識部位を示す).

プライマーは, Sigma-Aldrich Life Science (Hokkaido, Japan) から購入した.

増幅した PCR 産物を *Bam*HI と *Eco*RI で処理し, pET21d(+) ベクター (Novagen, Madison, WI, USA) に挿入し, 発現ベクター pET-*lin0153* と pET-*lin1996* を取得した (図 1-2). 構築したプラスミドの塩基配列は, Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて確認した. 得られた *lin0153* 遺伝子と *lin1996* 遺伝子の塩基配列は, DDBJ/ EMBL/ GenBank データベースに申請し, それぞれアクセス番号 LC092875 と LC092876 として登録された.

1-2-4 *lin0153* 遺伝子産物 (LinChi78) と *lin1996* 遺伝子産物 (LinChi35) の発現および精製

pET-*lin0153* または pET-*lin1996* 発現ベクターで形質転換された大腸菌 BL21 (DE3) を, 37 °C, LB 培地中で一晚, 前培養し, その後, 新鮮な 2×YT 培地に接種した. 接種した細菌は, 培養液の濁度 600 nm (OD 600) が 0.8 になるまで 37 °C で増殖させ, その後, 誘導物質 isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) が終濃度 0.1 mM となるように添加し, 37 °C で 24 時間誘導した. 遠心分離により回収した菌体を, プロテイナーゼ阻害剤として Complete Mini (EDTA-free) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を含む TS 緩衝液 [20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl (pH 7.5)] に懸濁し, 氷浴中で超音波処理を施した (超音波破碎機 UD-201, TOMY SEIKO, Tokyo, Japan). 超音波処理後の粗抽出物を 20,000×g, 20 分間, 遠心分離し, 得られた抽出液の酵素活性およびタンパク質の発現を調べた. *lin0153* 遺伝子産物と *lin1996* 遺伝子産物の名称をそれぞれの推定分子量から, LinChi78 と LinChi35 とした. 発現した LinChi78 と LinChi35 は 10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) に供した後, Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250) で染色し, タンパク質の発現状況を調べた [3]. 遠心分離で得られた上清を, TS

緩衝液で平衡化した Ni Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare, Tokyo, Japan) カラムに吸着させ、カラムを 0.05 M imidazole を含有した TS 緩衝液 (pH 7.5) をカラム体積の 10 倍量用いて洗浄した。その後、結合したタンパク質を 0.5 M imidazole を含有した TS 緩衝液で溶出した。LinChi78 と LinChi35 の精製は 10% SDS-PAGE により確認した。精製酵素を含む画分を TS 緩衝液に対して透析し、4 °C で保存し、その後の実験に使用した。

1-2-5 酵素の活性測定およびタンパク質濃度測定

酵素活性は、合成発色基質 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside [4NP-(GlcNAc)₂] を 400 μ M の濃度で使用して決定した。反応溶液には、ジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解した基質溶液 [20 mM 4NP-(GlcNAc)₂] を 1 μ L, 酵素溶液 5 μ L, そして 50 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES)-NaOH 緩衝液 (LinChi78 は pH 6.0, LinChi35 は pH 5.0) を加え、反応溶液の全量を 50 μ L とした。反応温度 50 °C の条件で反応を開始し、反応初速度を測定できる適切な時間に、反応混合物に 1 M 炭酸ナトリウム水溶液を 30 μ L 添加し、反応を停止させた。加水分解の際に遊離した 4-nitrophenolate イオン濃度は、波長 405 nm の吸光度と標準物質 4-nitrophenol の検量線から算出した。1 ユニット (U) は 1 分間に 4-nitrophenol が 1 μ mol 遊離する活性量と定義した。タンパク質濃度は、標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用い、Bradford 法に基づいた micro-assay method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて測定した [4]。

1-2-6 LinChi78 と LinChi35 の pH および活性の温度依存性、ならびに pH および温度安定性

pH による活性への影響は、400 μ M 4NP-(GlcNAc)₂ を含んだ各緩衝液、50 mM acetate 緩衝液 (pH 3.0 - 6.0), 50 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 5.0 - 7.0), 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0 - 9.0) と、酵素溶液を混合することで、反応を開始し、測定し評価した。温度の活性への影響は、反応温度 20 °C - 70 °C の範囲で、LinChi78 は pH 6.0, LinChi35 は pH 5.0 の 50 mM MES-NaOH 緩衝液を用いて測定し、評価した。pH 安定性の測定は、酵素溶液を氷上で 1 時間、または 24 時間、50 mM acetate 緩衝液 (pH 3.0 - 6.0), 50 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 5.0 - 7.0), 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0-9.0), もしくは 50 mM sodium carbonate 緩衝液 (pH 10.0 - 11.0) 中で静置した。残存活性測定において、pH 処理時の各 pH の緩衝液の影響を最小にする為に、活性測定前に TS 緩衝液で処理溶液を希釈した後に、残存活性を測定した。熱安定性は、酵素溶液を 60 分間、50 mM MES-NaOH (pH 6.0 または pH 5.0) の条件下、種々の温度 (4 °C - 60 °C) で処理し、その後、迅速に冷却したのち、残存活性を測定した。

1-2-7 速度論パラメーターの算出

4NP-(GlcNAc)₂ の加水分解の初速度を 50 °C で測定した. 4NP-(GlcNAc)₂ に対する各酵素の速度論パラメーター (K_M 値と V_{max} 値) は, 基質濃度 0.05 - 2.0 mM の範囲で得られた初速度を, Michaelis-Menten 動力学モデルに対する非線形回帰法により算出した (使用ソフトウェア: DeltaGraph バージョン 6, Nihon Poladigital K.K.) 見かけの k_{cat} 値は各酵素の分子量を基に算出した. これらの実験を 3 回行った.

1-2-8 示差走査蛍光光度 (differential scanning fluorimetry, DSF) 分析

示差走査蛍光光度 (DSF) 分析は, リアルタイム PCR 装置 (Mx3005p; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) と MxPro ソフトウェア (Agilent Technologies) を用いて行った [5]. タンパク質溶液 39 μ L と DMSO で 10 倍希釈した SYPRO Orange 1 μ L (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) をチューブ内で混合し, 1 分間に 1 °C ずつ, 25 °C - 95 °C の間で上昇させ, その度に蛍光強度を測定するプログラムを用いて解析した. 検出には, SYPRO Orange の励起波長 492 nm, 蛍光波長 610 nm を利用した. タンパク質の熱転移温度 (T_m) は, 遷移曲線 [数式 (1)] に対する非線形回帰法により算出した (使用ソフトウェア: DeltaGraph バージョン 6) [6]. これらの実験は 2 回行った.

$$y = LL + \frac{(UL-LL)}{1+\exp\left(\frac{Tm}{a}\right)} \quad (1)$$

LL と UL は最小と最大の蛍光強度を示している.

1-3 結果

1-3-1 *L. innocua* 由来 *lin0153* と *lin1996* 遺伝子のクローニングと大腸菌での発現

図 1-1 は, 組換え LinChi78 (*lin0153* 遺伝子産物) と LinChi35 (*lin1996* 遺伝子産物) のタンパク質の模式図を示す. 両方のキチナーゼ遺伝子を, pET ベクターにクローニングし, 大腸菌を宿主として発現させた. その遺伝子産物は, 天然基質であるコロイダルキチンと人工基質 4NP-(GlcNAc)₂ に対する分解活性を示したことから, キチナーゼと同定した. その後, アフィニティークロマトグラフィーに供し, 精製した. 精製 LinChi78 と LinChi35 は, SDS-PAGE 分析により約 82kDa と 38kDa に単一のバンドがそれぞれ検出でき (図 1-3), 精製タンパク質を得ることができた. 検出されたバンドの移動度により算出された分子量は, pET ベクター由来の N 末端側または C 末端側の付加配列を考慮した推定分子量

(LinChi78: 81,573 と LinChi35: 37,949) と一致した.

1-3-2 リステリアキチナーゼ活性の至適温度, pH および速度論パラメーター

至適 pH 及び至適温度, 速度論パラメーターは, 4NP-(GlcNAc)₂ を基質として測定した. 図 1-4A および図 1-5A は, それぞれ, LinChi78 と LinChi35 の活性の pH 依存性を示した. LinChi78 の最大活性は pH 6.0 であり, pH 5.0 - 7.0 の間で高い活性を示した. LinChi35 の最適 pH は 5.0 で, pH 4.0 - 6.0 の pH 範囲で高い活性を示した.

温度依存性は, 20 - 70 °C の範囲の温度で活性への影響を調べた. 図 1-4B および図 1-5B は, LinChi78 と LinChi35 の最大活性が約 50 °C であることを示した.

図 1-4C および図 1-5C は, LinChi78 と LinChi35 の pH 安定性を示す. 両酵素は, 共に 4 °C, 1 時間処理の場合, 安定であった. 24 時間処理後, pH 3.5 における LinChi78 の残存活性は約 20% まで減少したが, 他の pH 条件では安定であった. LinChi35 は試験したすべての pH 範囲で, 24 時間後も完全な活性を保持していた.

キチナーゼの温度安定性を決定するために, 4 - 60 °C の範囲で 60 分間熱処理した後, 酵素の残存活性を 50 °C で測定した. その結果を, 図 1-4D および図 1-5D に示した. LinChi78 と LinChi35 の活性は, 40 °C までは 60 分間維持していた. しかし, 処理温度が 40 °C を超えると徐々に活性が低下し, 60 °C では未処理の活性の 30% 以下まで低下した. LinChi78 は, LinChi35 より安定性が低く, 60 °C, 60 分間の熱処理で, ほぼ活性が消失した. LinChi78 と LinChi35 の DSF 分析の結果, それぞれ T_m 値 51.5 °C, 60.8 °C を示した (図 1-6A, B). これらの結果は, 活性部位の立体構造とリステリアキチナーゼの全体的なタンパク質構造の安定性に相関があることを示唆した.

4NP-(GlcNAc)₂ に対するリステリアキチナーゼの定常状態の速度論パラメーターを決定した. 基質濃度と初速度の関係は Michaelis-Menten 動力学モデルに従い, DeltaGraph ソフトウェアによる非線形回帰から速度論パラメーターを算出した (図 1-7A, B, 表 1). 50 mM MES-NaOH 緩衝液中 (pH 6.0 または pH 5.0), 50 °C の条件の場合, LinChi78 と LinChi35 の k_{cat} 値は, それぞれ 10.4 s⁻¹ と 51.1 s⁻¹, K_M 値は, それぞれ 127 μM と 885 μM を示した. LinChi35 とその近縁の LmChiA の K_M 値は, 2~3 倍の範囲内で類似していたが, 他の既知のキチナーゼの値よりも高くなった. また, LinChi35 の k_{cat} 値は LinChi78 の値より 5 倍高かった.

1-4 考察

非病原性細菌 *L. innocua* の二つのキチナーゼ様遺伝子, *lin0153* と *lin1996*, をクローニングし, 大腸菌を宿主として活性を持つ酵素として発現することに成功した. LinChi78, LinChi35 は, それぞれ, 82 kDa と 39 kDa の分子量を有し, キチナーゼ活性の指標である人工基質と天然基質に対して分解活性を示したことから, *L. innocua* のキチナーゼと同定した. 発現したキチナーゼの酵素化学的性質を人工基質 4NP-(GlcNAc)₂ 用いて比較解析した. 両酵素共に広い pH 安定性と比較的高い熱安定性を示した. しかし, 至適 pH や速度論パラメーターが異なった. k_{cat} 値を他の細菌酵素と比較した場合, 大きく異なる SmChiA, SmChiB を除くと 5 倍以内で同様の数値を示した (表 1). LinChi35 は, LinChi78 よりも高い K_M 値を示したが, 基質濃度 400 μ M の場合, 約 2 倍高い比活性を示した. 同族の *L. monocytogenes* 由来キチナーゼ, LmChiA は, 弱酸性条件下に活性の至適条件を持つことが報告されている [7]. しかし, LmChiB の酵素化学的性質は未報告である.

LinChi35 活性の至適条件は pH 4.0 - 5.0, 一方, LinChi78 の至適条件は pH 6.0 を示した. LinChi35 は Asn202 を持ち, 同じく酸性側に至適活性をもつ SmChiC や *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Chi18A (LlChi18A) も同様に LinChi35 と相当する位置に Asn を保持している (図 1-8). LinChi78 と類似した酵素は, 相当する位置に Asp 残基を持ち, この Asp 残基の存在が中性付近へ至適活性を与えることが報告されている [8, 9]. LinChi78 と LinChi35 の結果は, この法則にあてはまる.

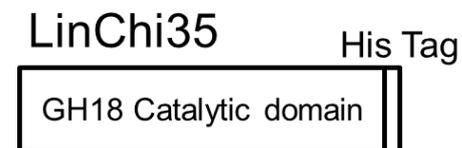
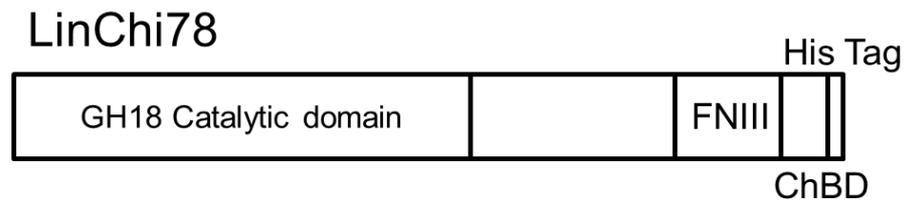


図 1-1. 大腸菌 BL21 で発現した *lin0153* 遺伝子産物 (LinChi78) と *lin1996* 遺伝子産物 (LinChi35) の模式図

上の図は LinChi78 を示し，下の図は LinChi35 を示している．Catalytic domain : GH18 触媒ドメイン，FNIII : フィブロネクチン III 型様ドメイン，ChBD : キチン結合ドメイン，His Tag : ベクター由来ヒスチジンタグを示している．

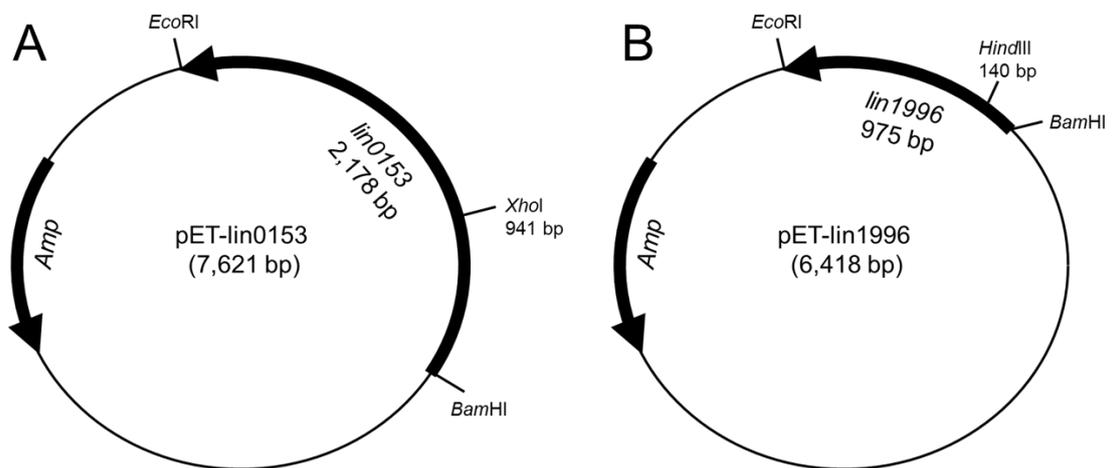


図 1-2. 作製した発現プラスミドの模式図

A: pET-lin0153, B: pET-lin1996. *Amp*: アンピシリン耐性遺伝子.

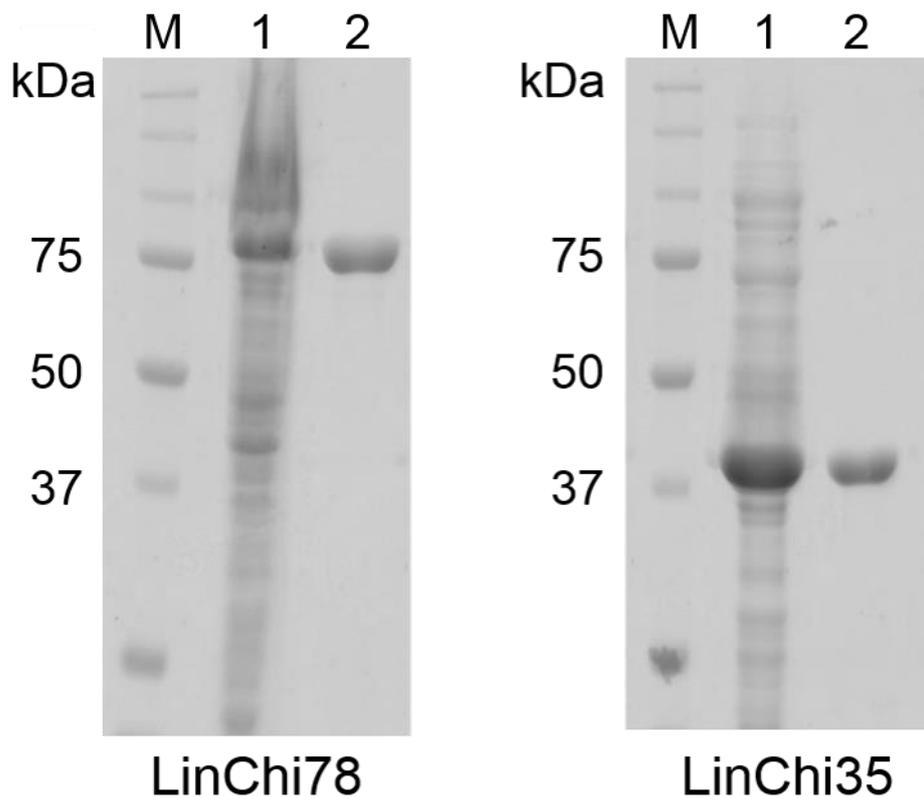


図 1-3. LinChi78 と LinChi35 の抽出液と精製酵素の SDS-PAGE の結果
 左は, LinChi78, 右は LinChi35 の結果を示している.

レーン M: 分子量マーカー (Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad, Osaka, Japan), レーン 1: 細菌破砕液の上清 (抽出液), レーン 2: Ni セファロース精製後の酵素溶液. 電気泳動図の隣にある数字は分子量マーカーのタンパク質バンドの分子量 (kDa) を示している.

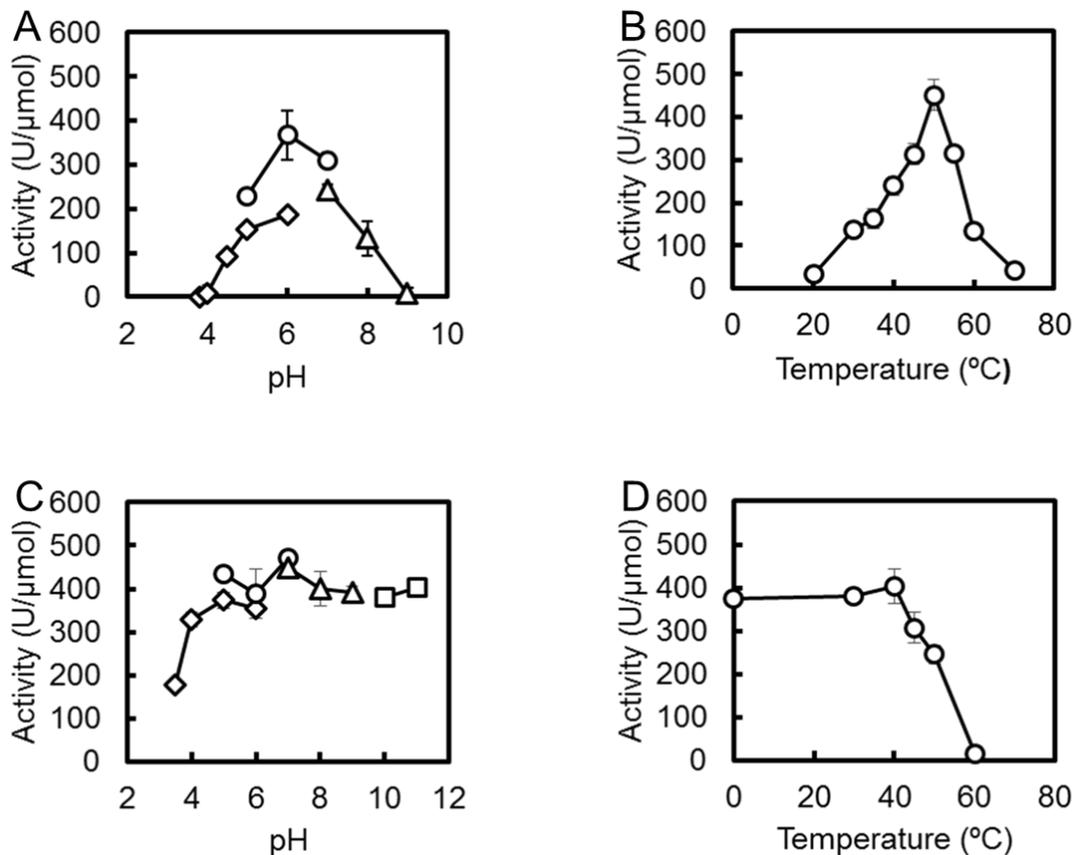


図 1-4. LinChi78 の pH 依存性と温度安定性および pH 安定性と温度安定性

A: 異なる pH 緩衝液, 50 mM acetate 緩衝液 (pH 3.5-6.0, ◇), 50 mM MESNaOH 緩衝液 (pH 5.0-7.0, ○), または 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.09.0, △) を用い, 50 °C での LinChi78 の活性を測定した. B: 各温度 (20 °C-70 °C) での LinChi78 の活性を測定した. LinChi78 を各 pH 緩衝液 50mM acetate 緩衝液 (pH 3.5-6.0, ◇), 50 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 5.0-7.0, ○), 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0-9.0, △), 50mM carbonate-NaOH 緩衝液 (pH10-11, □) で, 4 °C で 24 時間静置した. TS 緩衝液で希釈後, 50 °C での残存活性を測定した. D : 4 °C-60 °C で 60 分間静置し, 冷却後, 50 °C で残存活性を測定した. この実験はそれぞれ 3 回ずつ行った. それぞれの試験の平均値を, 標準偏差と共に示した.

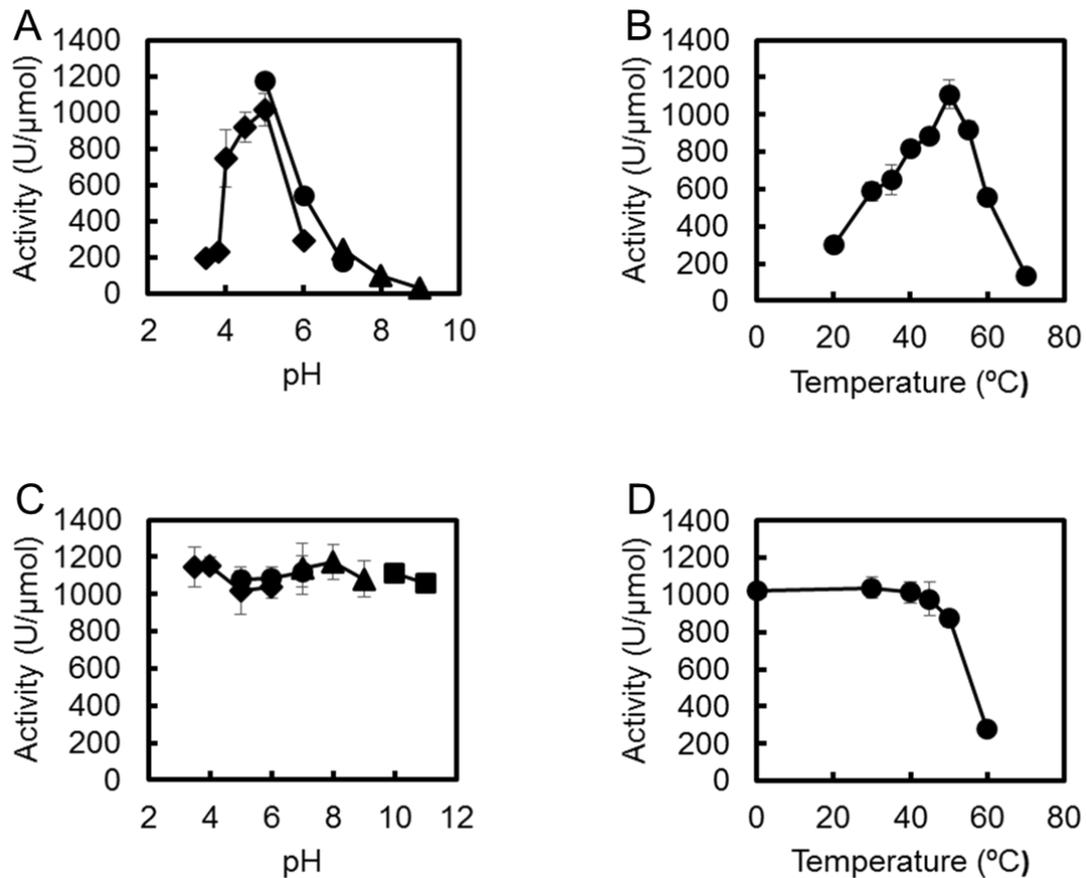


図 1-5. LinChi35 の pH 依存性と温度安定性および pH 安定性と温度安定性
 A: 異なる pH 緩衝液, 50 mM acetate 緩衝液 (pH 3.5-6.0, ◆), 50 mM MESNaOH 緩衝液 (pH 5.0-7.0, ●), または 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0-9.0, ▲) を用い, 50 °C での LinChi35 の活性を測定した. B: 各温度 (20 °C -70 °C) での LinChi35 の活性を測定した. LinChi35 を各 pH 緩衝液 50mM acetate 緩衝液 (pH 3.5-6.0, ◆), 50 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 5.0-7.0, ●), 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0-9.0, ▲), 50mM carbonate-NaOH 緩衝液 (pH10-11, ■) で, 4 °C で 24 時間静置した. TS 緩衝液で希釈後, 50 °C での残存活性を測定した. D: 4 °C-60 °C で 60 分間静置し, 冷却後, 50 °C で残存活性を測定した. この実験はそれぞれ 3 回ずつ行った. それぞれの試験の平均値を, 標準偏差と共に示した.

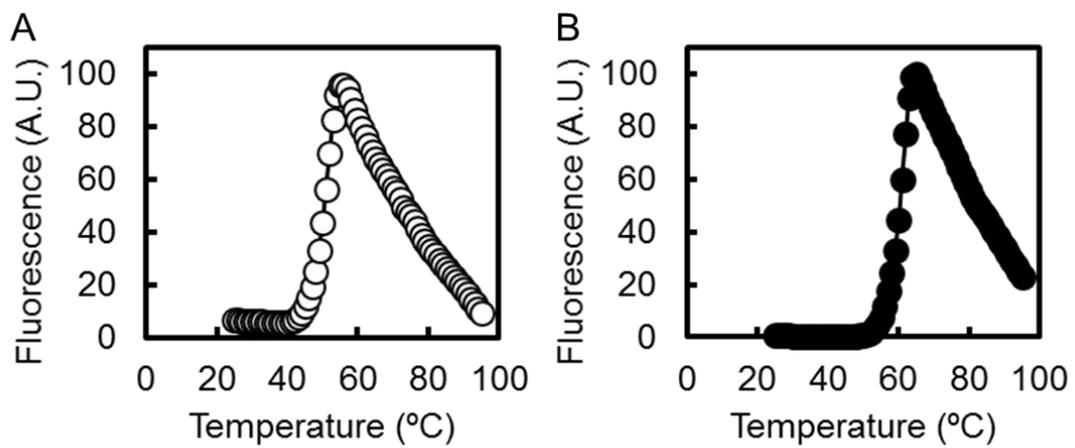


図 1-6. LinChi78 と LinChi35 の DSF 分析

LinChi78 は○, LinChi35 は●で示している. 値は 2 回試行した値の平均値を示している

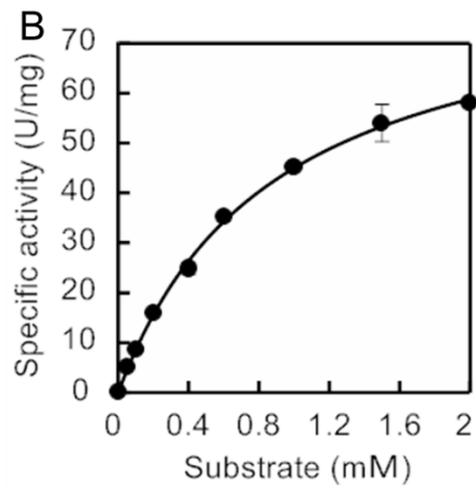
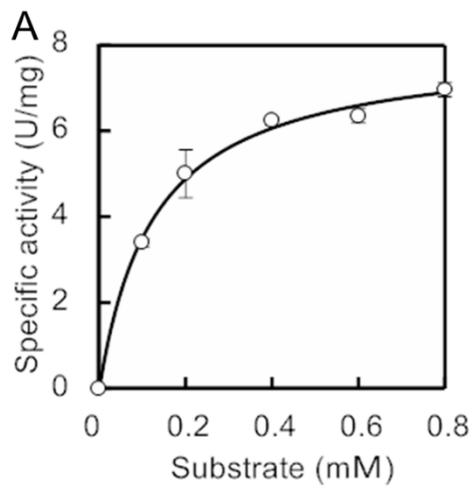


図 1-7. 基質 4NP-(GlcNAc)₂ 濃度に対するの LinChi78 と LinChi35 のキチナーゼ活性

LinChi78 は○, LinChi35 は●で示している. この操作は 3 回行った結果の平均値を示している

表 1. 4NP-(GlcNAc)₂ に対するキチナーゼの速度論の比較

Enzymes	k_{cat} (s ⁻¹)	K_{M} (μM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (s ⁻¹ μM^{-1})	pH	Temp (°C)
LinChi78	10.4 ± 0.4	127 ± 0.8	0.08	6.0	50
LinChi35	51.1 ± 0.02	885 ± 25	0.06	5.0	50
LmChiA	21.6	1600 ± 300	0.01	6.0	30
SmChiA	331 ± 6.2	52 ± 2	6.37	6.8	42
SmChiB	1.4 ± 0.5	181 ± 35	0.01	6.1	37
BceNCUT	20.9	74	0.28	6.0	25

種々のキチナーゼの速度論パラメーター値とその測定条件, および参考文献は以下である: LinChi78 (本研究), LinChi35 (本研究), LmChiA [7], SmChiA (*Serratia marcescens* chitinase A) [10], SmChiB (*Serratia marcescens* chitinase B) [11] and BceNCUT (*Bacillus cereus* chitinase NCUT) [12]

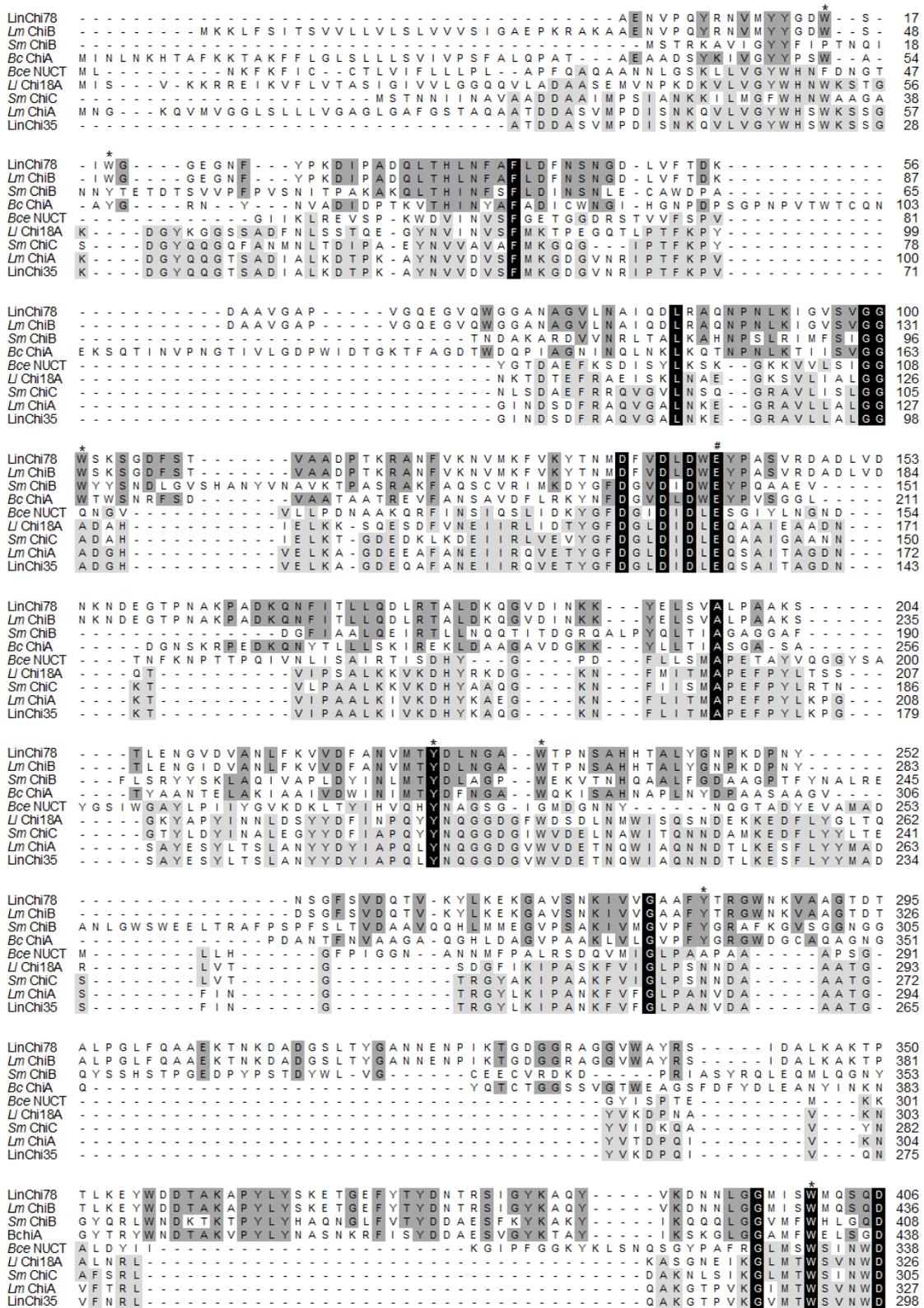


図 1-8 LinChi78 と LinChi35 および GH18 細菌キチナーゼのアラインメント
各細菌由来キチナーゼの触媒ドメインアラインメントを示している。酵素

(accession number) は LinChi78: *L. innocua lin0153* 遺伝子産物 (本研究), LmChiB: *L. monocytogenes* chitinase B (CAC98320), SmChiB: *S. marcescens* Chitinase B (CAA85292), BcChiA: *B. circulans* WL-12 Chitinase A1 (AAA81528), BceNUCT: *B. cereus* chitinase NCUT (BAB16890), LlChi18A: *L. lactis* ssp.*lactis* Chitinase 18A (AAK06048), SmChiC: *S. marcescens* Chitinase C (BAA76623), LmChiA: *L. monocytogenes* Chitinase A (CAC99961), LinChi35: *L. innocua lin1996* 遺伝子産物 (本研究). # は触媒残基を意味している. BcChiA [13] で報告されている基質と相互作用する推定残基 (サブサイト) は*, すべての酵素で保存されているアミノ酸は白抜き文字, LinChi78 を含む 4 つの酵素中 3 個以上保存されているアミノ酸残基は濃い影, 同様に, LinChi35 を含む 4 つの酵素で 3 個以上保存されているアミノ酸残基は薄い影で色づけしている.

参考文献

1. **Sambrook J, Russell DW** (2012) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 4th edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
2. **Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F, Berche P, Bloecker H, Brandt P, Chakraborty T, Charbit A, Chetouani F, Couvé E, de Daruvar A, Dehoux P, Domann E, Domínguez-Bernal G, Duchaud E, Durant L, Dussurget O, Entian KD, Fsihi H, García-del Portillo F, Garrido P, Gautier L, Goebel W, Gómez-López N, Hain T, Hauf J, Jackson D, Jones LM, Kaerst U, Kreft J, Kuhn M, Kunst F, Kurapkat G, Madueno E, Maitournam A, Vicente JM, Ng E, Nedjari H, Nordsiek G, Novella S, de Pablos B, Pérez-Díaz JC, Purcell R, Rimmel B, Rose M, Schlueter T, Simoes N, Tierrez A, Vázquez-Boland JA, Voss H, Wehland J, Cossart P** (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294: 849-852. doi: 10.1126/science.1063447
3. **Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, doi:10.1038/227680a0
4. **Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7: 248-254
5. **Niesen FH, Berglund H, Vedadi M** (2007) The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc* 2: 2212-2221, doi:10.1038/nprot.2007.321
6. **Sakaguchi M, Osaku K, Maejima S, Ohno N, Sugahara Y, Oyama F and Kawakita M**(2014) Highly conserved salt bridge stabilizes a proteinase K subfamily enzyme, Aqualysin I, from *Thermus aquaticus* YT-1. *AMB Express* 4: 59. doi: 10.1186/s13568-014-0059-2
7. **Leisner JJ, Larsen MH, Ingmer H, Petersen BO, Duus JØ, Palcic MM** (2009) Cloning and comparison of phylogenetically related chitinases from *Listeria monocytogenes* EGD and *Enterococcus faecalis* V583. *J Appl Microbiol* 107: 2080-2087. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04420.x
8. **Synstad B, Gåseidnes S, Van Aalten DM, Vriend G, Nielsen JE, Eijsink VG** (2004) Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *Eur J Biochem* 271: 253-262. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03923.x
9. **Papanikolaou Y, Prag G, Tavlas G, Vorgias CE, Oppenheim AB, Petratos K**

- (2001) High resolution structural analyses of mutant chitinase A complexes with substrates provide new insight into the mechanism of catalysis. *Biochemistry* 40: 11338-11343. doi: 10.1021/bi010505h
10. **Krokeide IM, Synstad B, Gåseidnes S, Horn SJ, Eijsink VG, Sørli M** (2007) Natural substrate assay for chitinases using high-performance liquid chromatography: a comparison with existing assays. *Anal Biochem* 363: 128-134. doi:10.1016/j.ab.2006.12.044
 11. **Vaaje-Kolstad G, Bunaes AC, Mathiesen G, Eijsink VG** (2009) The chitinolytic system of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* comprises a nonprocessive chitinase and a chitin-binding protein that promotes the degradation of alpha- and beta-chitin. *FEBS J* 276:2402-2415. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.06972.x
 12. **Hsieh YC, Wu YJ, Chiang TY, Kuo CY, Shrestha KL, Chao CF, Huang YC, Chuankhayan P, Wu WG, Li YK, Chen CJ** (2010) Crystal structures of *Bacillus cereus* NCTU2 chitinase complexes with chitooligomers reveal novel substrate binding for catalysis: a chitinase without chitin binding and insertion domains. *J Biol Chem* 285: 31603-31615. doi: 10.1074/jbc.M110.149310
 13. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S** (2013) MEGA6:molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729. doi:10.1093/molbev/mst197

第 II 章 LinChi78 と LinChi35 の 多糖，オリゴ糖に対する作用機序

2-1 はじめに

GH18 キチナーゼによるコロイダルキチンやキチンオリゴ糖の分解に関する解析は多く報告されている。序論で述べたように、キチナーゼ生産菌である *S. marcescens* のキチナーゼを用いて詳細な研究がなされており、分解産物の組成からその作用機序が考察されている。*S. marcescens* が生産する SmChiA, SmChiB と SmChiC を用いて、 β -キチンを基質として加水分解反応を行うと、SmChiA や SmChiB は (GlcNAc)₂ や少量の GlcNAc と (GlcNAc)₃ を生産し、エキソ型の分解様式を持つのに対し、SmChiC は GlcNAc から (GlcNAc)₅ までのキチンオリゴ糖を生産することから、SmChiC はエンド型の分解様式であると示された [1, 2]。また、蛍光顕微鏡や分子間力顕微鏡分析によると、SmChiA と SmChiB は、それらの加水分解反応が連続的に行われるプロセッシブ型であることが提唱されている。これらの結果から GH18 キチナーゼの作用は、エキソ型もしくはエンド型、そしてプロセッシブ型もしくはノンプロセッシブ型の組み合わせで進行する [1]。この章では、*L. innocua* 由来キチナーゼの作用機序を決定するために、コロイダルキチンやキチンオリゴ糖を基質として加水分解し、その生産物の同定を行い、得られた分解産物の組成から LinChi78 と LinChi35 の分解様式を決定し、分解産物アノマーを解析することにより、酵素の反応点も併せて調べた。

2-2 実験試料と方法

2-2-1 実験試薬

キチンオリゴ糖は Seikagaku Corporation (Tokyo, Japan) から購入した。特に指定がない限り、他の試薬は Wako Pure Chemicals (Tokyo, Japan) および Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入し使用した。

2-2-2 LinChi78 と LinChi35 の発現と精製

1-2-3 および 1-2-4 に準じて LinChi78 と LinChi35 の発現と精製を行った。

2-2-3 コロイダルキチンの調製

キチン粉末 20 g を 5 °C 以下に冷却した濃塩酸 800 mL に攪拌しながら加え、粉末の分散を確認した後、37 °C まで加温した。溶液に熱を加え、徐々に透明度が増していくのを確認し、未溶解キチンの濁りが残っている段階で、ガラスフィルターでろ過した。ろ液が中性になるまで、残渣を純水で置換した。中性になった残渣は、所定濃度になるように純水に懸濁し、実験に使用した [3]。

2-2-4 多糖由来またはキチンオリゴ糖の生産物の分析

コロイダルキチンを多糖基質とし、終濃度 2 mg/ml の基質を含んだ 50 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 6.0 または 5.0) に 5 pmol の精製酵素を添加し、反応を開始し、50 °C で 1 時間または 24 時間反応させた。その後、10 分間 95 °C の熱処理を施し、反応を停止した。

オリゴ糖基質として、三量体から六量体のキチンオリゴ糖 [(GlcNAc)_n, n=3-6] を終濃度 160 μM で使用した。所定濃度の基質を含んだ 50 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 6.0 または 5.0) に、約 1 pmol の精製酵素を添加し、反応を開始した。反応温度は 50 °C で、10 分間もしくは 30 分間反応後、10 分間 95 °C で熱処理することで反応を停止した。

Jackson の方法を基に、加水分解産物を蛍光物質 8-aminonaphthalene-1, 3,6-trisulphonic acid (ANTS, Life technologies, Tokyo, Japan) で標識し、high-resolution PAGE によって分離した [4]。キチンオリゴ糖を同様に標識し、電気泳動分析の標準物質として使用した。

2-2-5 生産物のアノマー分析

キチンオリゴ糖 五量体 (GlcNAc)₅ または 六量体 (GlcNAc)₆ を基質とし、終濃度 800 μM の基質を含んだ 50 mM の MES-NaOH 緩衝液中 (pH 6.0 または 5.0) に、25 pmol の LinChi78 または 15 pmol の LinChi35 を添加し、反応を開始し、25 °C で 1 分間反応させた。その後、反応混合物の一定量 (15 μL) を直ちに TSK-GEL AMIDE-80 column (4.6 × 250 mm, Tosoh, Tokyo, Japan) に供した [5]。HPLC システムは以下である。

ポンプ: LC-10AD (Shimadzu, Kyoto, Japan),

カラムオーブン: CTO-6A (Shimadzu, Kyoto, Japan),

UV 検出器: SPD-6A (Shimadzu, Kyoto, Japan).

UV 検出器で 210 nm の吸光度の変化を継続的に検出し、ソフトウェア Chromato-PRO (Run Time Corporation, Tokyo, Japan) で分析した。分離条件はアセトニトリル : 水 (7:3 v/v), 25 °C, 1.0 mL/分の流速で反応産物を分離した。

2-3 結果

2-3-1 コロイダルキチンとキチンオリゴ糖に対するリステリアキチナーゼの加水分解活性

多糖およびオリゴ糖基質に対するリステリアキチナーゼの作用機序を調べるために、酵素加水分解後の生産物を、PAGE 法を用いて分析した。図 2-1A, B は基質にコロイダルキチンを使用した場合の分解産物を示した。両キチナーゼ活性による生産物解析結果は、主に二量体 (GlcNAc)₂, そして少量の単量体 GlcNAc

が検出された。生産物の組成は、1時間と24時間の反応時間で変化は見られなかった。これらの結果は、両酵素の多糖基質の加水分解の様式が他のキチナーゼと類似していることを示唆している。しかし、LinChi35は、少量の四量体までのオリゴ糖を生産したが、LinChi78では検出されなかった。これは、LinChi35はエンド型分解活性(図2-1B)を有することを示唆している。

リステリアキチナーゼのキチンオリゴ糖基質に対する作用様式を評価するために、50°C、10分間または30分間、加水分解反応を行い、得られたキチンオリゴ糖由来の生産物を分析した(図2-2から2-5)。図2-2Aと2-2Bは、六量体(GlcNAc)₆由来の生産物を示している。LinChi78は、二量体と単量体を素早く生産した。10分間の六量体(GlcNAc)₆分解時、四量体は検出されなかった。これは、LinChi78のキチン分解様式がプロセッシブ型であることを示唆している。一方、LinChi35は、六量体(GlcNAc)₆をゆっくりと加水分解し、泳動上、二量体、三量体および四量体が認められた。五量体(GlcNAc)₅を基質とした場合、LinChi78とLinChi35は、どちらも主に二量体および三量体を生成した。LinChi78により産生した三量体の量はわずかに10分よりも30分で減少していたことから、生産した三量体を、LinChi78がさらに加水分解し、単量体と二量体に分解したことを示唆している(図2-3A)。LinChi35は五量体(GlcNAc)₅に対し、10分間の反応後でも基質である五量体が残存し、検出されていることから、LinChi78より五量体に対して低い活性を示すことも明らかになった(図2-3B)。五量体(GlcNAc)₅と六量体(GlcNAc)₆分解の結果から、LinChi35はノンプロセッシブ型分解様式で加水分解することを示唆した。

四量体(GlcNAc)₄を基質とした場合、LinChi78は(GlcNAc)₄を効率良く加水分解し、二量体と微量の単量体と三量体を生産した(図2-4A)。一方、LinChi35は四量体(GlcNAc)₄に対し、非常にゆっくりと反応し、主生産物として二量体と少量の単量体と三量体を生産した(図2-4B)。三量体(GlcNAc)₃を基質とした場合、LinChi78はゆっくりと三量体(GlcNAc)₃を加水分解し、徐々に単量体と二量体が生産されたが、LinChi35は三量体(GlcNAc)₃に対し、ほぼ不活性だった(図2-5A,B)。基質濃度160 μMの場合、LinChi35は、三量体(GlcNAc)₃や四量体(GlcNAc)₄のような短いオリゴ糖に対し、非常に弱い活性を持つことが明らかになった。

2-3-2 反応生産物の分析とアノマーの分析

図2-6と図2-7は、五量体(GlcNAc)₅と六量体(GlcNAc)₆を、それぞれ二種のキチナーゼにより分解した生産物とそのアノマー分布を示している。五量体(GlcNAc)₅と六量体(GlcNAc)₆の反応前(0 min)のアノマー比(α:β)は約6:4の割合で検出された。LinChi78とLinChi35による五量体(GlcNAc)₅の加水分解

後の反応産物のうち、二量体 (GlcNAc)₂ は β アノマーのみを示し、三量体 (GlcNAc)₃ の比率は 5.5 : 4.5 で、いずれの酵素もアノマー保持反応で反応が進行していること、その切断パターンから、両酵素共に五量体 (GlcNAc)₅ の非還元末端側から二番目のグリコシド結合を加水分解することが示された。六量体 (GlcNAc)₆ を 1 分間加水分解した結果 (図 2-7), LinChi78 が生産した加水分解産物のアノマー比は 2 : 8 [二量体 (GlcNAc)₂], 4 : 6 [三量体 (GlcNAc)₃], 5.5 : 4.5 [四量体 (GlcNAc)₄]だった。LinChi35 のアノマー比の場合、0 : 10 [二量体 (GlcNAc)₂], 4 : 6 [三量体 (GlcNAc)₃], 4.5 : 5.5 [四量体 (GlcNAc)₄]だった。これらのアノマー比から、LinChi78 と LinChi35 は、六量体 (GlcNAc)₆ の非還元末端側から数えて二番目と三番目のグリコシド結合を加水分解することが示された。

2-4 考察

コロイダルキチンを基質とした際、LinChi78 は主に二量体 (GlcNAc)₂ を生産した。基質が六量体 (GlcNAc)₆ の場合、主に二量体と少量の単量体が検出されたが、四量体は検出されなかった (図 2-2A, 2-4A, 図 2-7)。四量体を基質とした場合、LinChi 78 は、試験した反応時間内で、主に二量体を生成した。つまり、六量体分解の結果は、六量体 (GlcNAc)₆ を分解し、二量体と四量体が生産された後に、短時間に四量体が分解されたことを意味している。一方、五量体 (GlcNAc)₅ 分解の際に、検出された三量体が反応時間を延長した 30 分で減少していること、三量体分解でゆっくりと反応が進行し、単量体と二量体を生産することより、五量体から生産された三量体も分解されていることを意味する。これらの結果から、LinChi78 はプロセッシブ型の酵素であることを示唆する。

LinChi78 の触媒ドメインの一次構造は、他の細菌のプロセッシブ型酵素である *Bacillus circulans* WL-12 由来キチナーゼ A1 (BcChiA1) と 33 %, そして *Serratia marcescens* 由来キチナーゼ B (SmChiB) と 30 %の同一性を示す [1, 6-10]。BcChiA1 で提唱されている、基質を認識に関係するアミノ酸残基、サブサイト-5 から+2 は LinChi78 にも保存されている: Tyr56 (Trp19), Trp53 (Trp16), Trp433 (Trp401), Tyr279 (Tyr226), Trp164 (Trp101), Trp285 (Trp233) [BcChiA1 アミノ酸番号 (LinChi78 番号)] (図 1-8)。Watanabe らの報告では、BcChiA1 の Trp164 (サブサイト+1) と Trp285 (サブサイト+2) は、プロセッシブ型の酵素に必須であることが示唆されている [7]。この結果の他にも、LinChi78 の Trp101 に対応している SmChiB の Trp97 が Ala へ置換された場合、プロセッシブ型の分解様式を失ったことが報告されている [8]。加えて、LinChi78 の持つ触媒ドメインの挿入された α+β 挿入ドメインが、エキソ型分解様式とプロセッシブ型の分解様式に関与することも示されている (図 0-8B) [11]。LinChi78 のアノマー解析の結果、

オリゴ糖に対し非還元末端側から加水分解を行うことが示された (図 2-6, 2-7). 興味深いことに, BcChiA1 はオリゴ糖基質の非還元末端から加水分解が行われるのに対し, 多糖基質 β -キチンナノファイバーの場合では, 還元末端側から反応が行われる [12]. 従って, オリゴ糖に対しては非還元末端側から加水分解する LinChi78 が, 多糖に対してどちら側から反応を開始するのか, 興味深い.

LinChi35 がコロイダルキチンや六量体 (GlcNAc)₆ を加水分解した結果, LinChi35 活性による生産物は主に二量体であったが, 単量体から四量体までのキチンオリゴ糖も検出され, エンド型酵素に類似の生産物組成を示した (図 2-1B, 2-2B). LinChi35 と細菌由来のエンド型キチナーゼの触媒ドメインの一次構造とを比較すると, SmChiC とは 65%, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 由来キチナーゼ A (LlChi18A) とは 62%の同一性がある (図 1-8). SmChiC と LlChi18 の触媒ドメインは浅い基質結合クレフトを持つ (図 0-8C) [9, 13]. アラインメント分析によると, エンド型キチナーゼでは, エキソ型キチナーゼ SmChiB の Trp97 (サブサイト+1) にあたる部位が Ala, Gly の様な小さいアミノ酸残基である傾向が強いことが報告されている [14]. 一方, エキソ型キチナーゼの場合では, 上述のように Trp 残基である. つまり, 配列アラインメントの上で LinChi35 はエンド型酵素と言える. LinChi35 がエンド型酵素であると後押しする構造上の事実は, LinChi35 がエキソ型の分解様式に寄与する α + β 挿入ドメインを持たないことである [15]. また, 図 1-8 に示すアラインメント上で, LinChi35 の Trp209 は LinChi78 のサブサイト+2 の Trp233 に対応しているが, SmChiC では Trp216 である. SmChiC の結晶構造上でこの Trp216 は触媒残基から離れた位置に存在しており, Payne らは SmChiC のサブサイト+1 とサブサイト+2 の芳香族アミノ酸は失われていると指摘している [9]. LinChi35 が六量体 (GlcNAc)₆ 加水分解すると, 二量体と四量体が産生するが, その四量体は加水分解されづらい結果であった (図 2-2B). この結果から, LinChi35 はノンプロセッシブ型の酵素だと考えられる. 配列アラインメント上, 上述のプロセッシブ型加水分解に関与する SmChiB の Trp97 (サブサイト+1) 対応するアミノ酸残基は, LinChi35 では Ala99 であり, SmChiC でも Ala 残基である. LinChi35 のエンド型の分解様式は本研究ではつきりと示すことができないが, コロイダルキチン加水分解の生産物分析の結果は, そのエンド型の分解様式の結果と一致している.

キチンオリゴ糖を加水分解した結果, 両酵素は共に非還元末端側を認識するアノマー保持酵素ということが示された. LinChi78 と LinChi35 は, Cazy データベース上で GH18 キチナーゼに分類されるが, 触媒ドメインの系統樹解析からも, 異なるサブファミリーに分類された (図 1-8, 2-8). つまり, LmChi78 はエキソ型とプロセッシブ型の分解様式を持ち, LinChi35 はエンド型とノンプロセッシブ型異なる分解様式を持ち, 機能が異なる酵素であることが明らかになった.

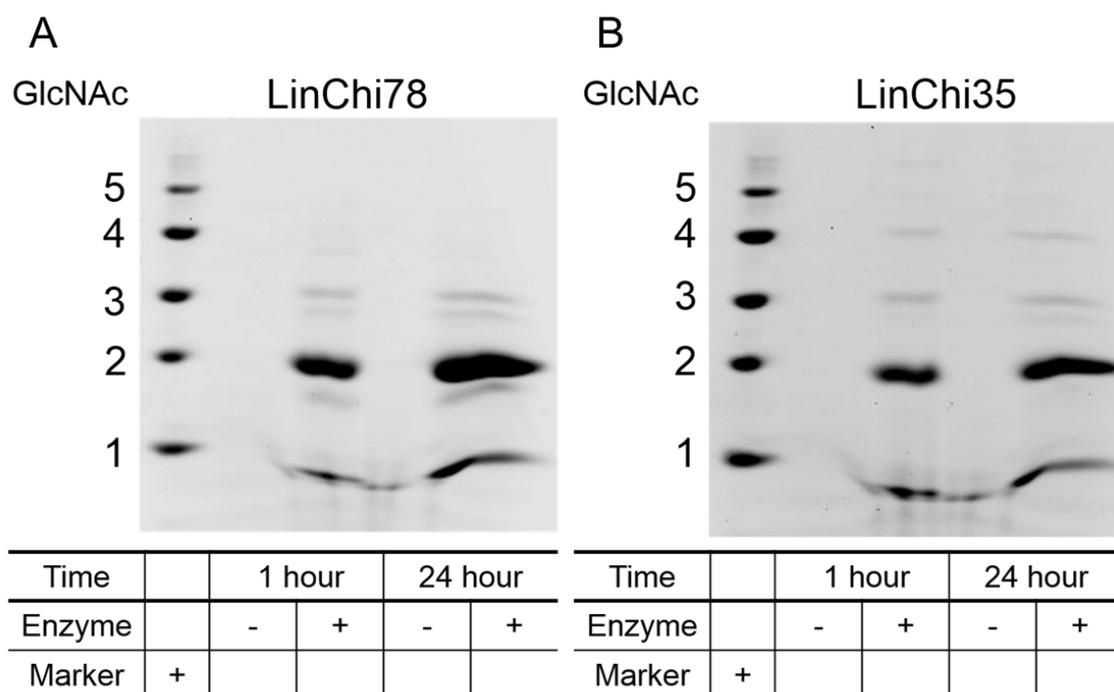


図 2-1. LinChi78 (A) と LinChi35 (B) によるコロイダルキチンの分解産物

加水分解反応は反応時間 1 時間と 24 時間，反応温度 50 °C で行った．生産されたキチン断片は 2-2-4 記載された方法で標識し，PAGE 法で分離した．キチンオリゴ糖を標準物質として使用した．

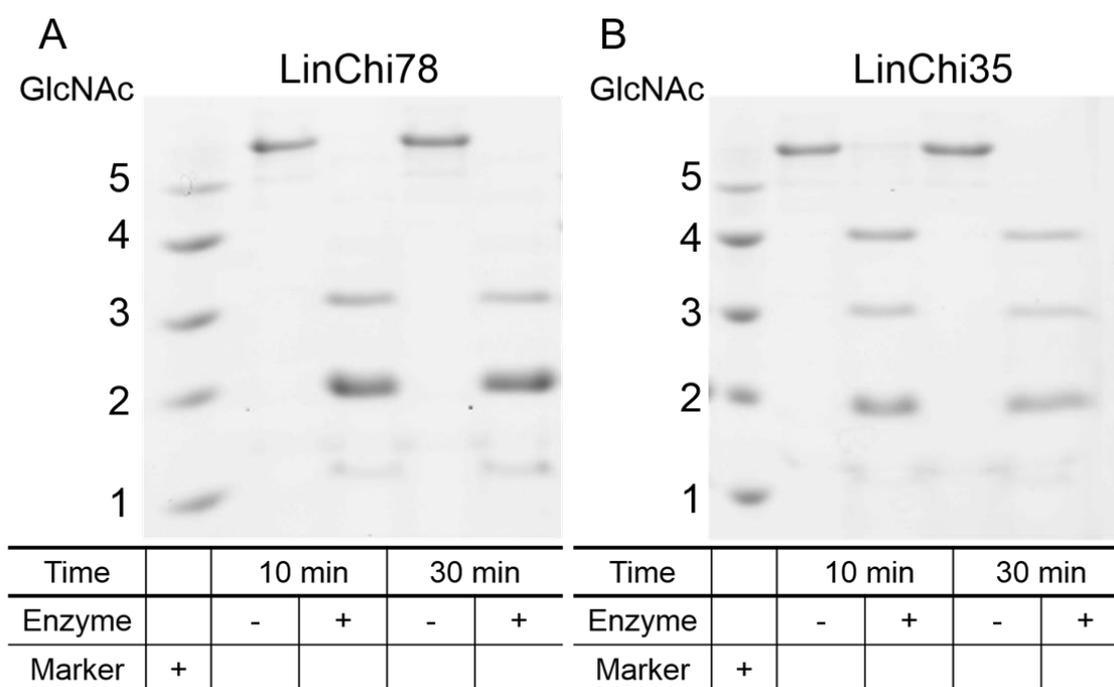


図 2-2. LinChi78 (A) と LinChi35 (B) による六量体 (GlcNAc)₆ の分解産物
 加水分解反応は反応時間 10 分と 30 分, 反応温度 50 °C で行った. 生産されたキチン断片は 2-2-4 記載された方法で標識し, PAGE 法で分離した. キチンオリゴ糖を標準物質として使用した.

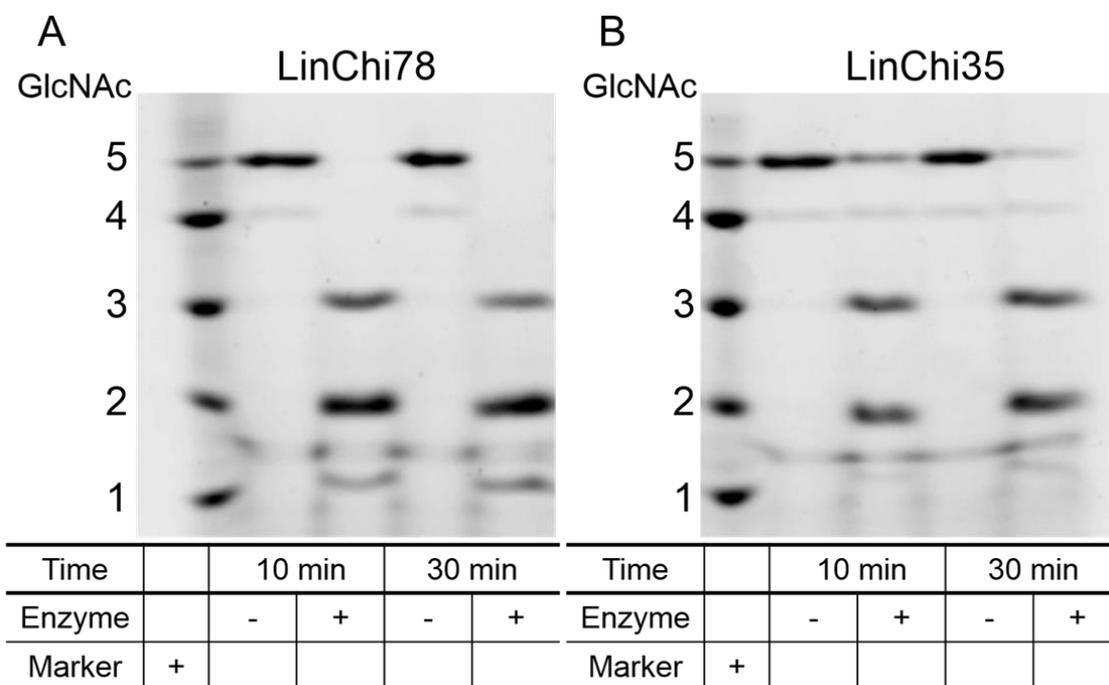


図 2-3. LinChi78 (A) と LinChi35 (B) による五量体 (GlcNAc)₅ の分解産物
 加水分解反応は反応時間 10 分と 30 分, 反応温度 50 °C で行った. 生産されたキチン断片は 2-2-4 に記載された方法で標識し, PAGE 法で分離した. キチンオリゴ糖を標準物質として使用した.

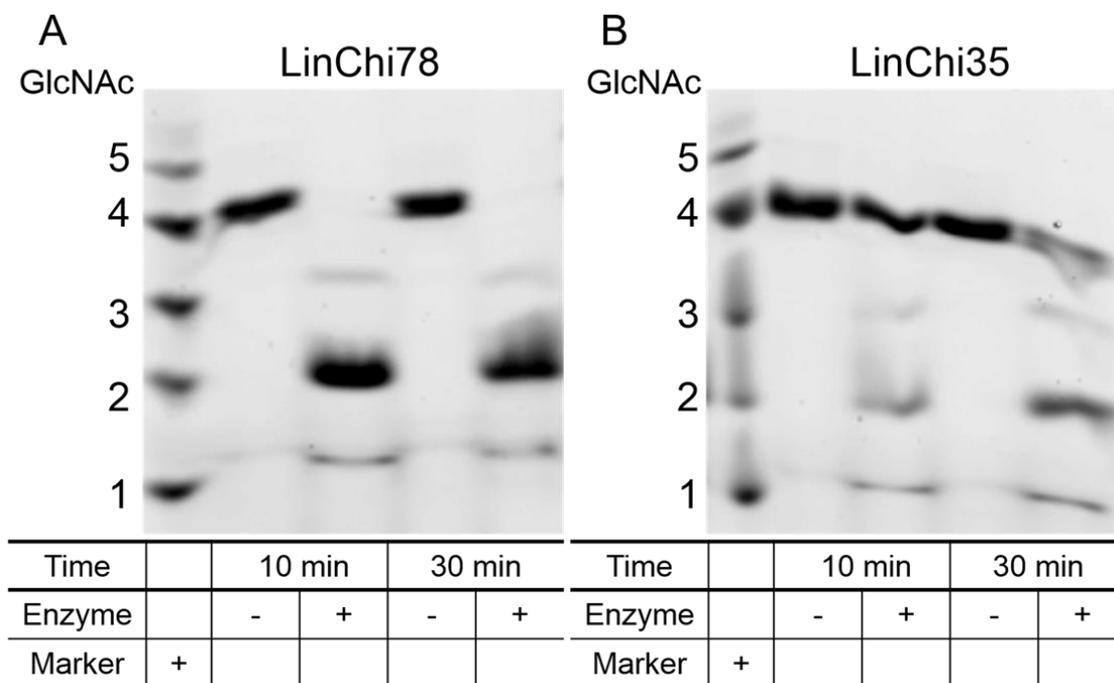


図 2-4. LinChi78 (A) と LinChi35 (B) による四量体 (GlcNAc)₄ の分解産物
 加水分解反応は反応時間 10 分と 30 分, 反応温度 50 °C で行った. 生産されたキチン断片は 2-2-4 に記載された方法で標識し, PAGE 法で分離した. キチンオリゴ糖を標準物質として使用した.

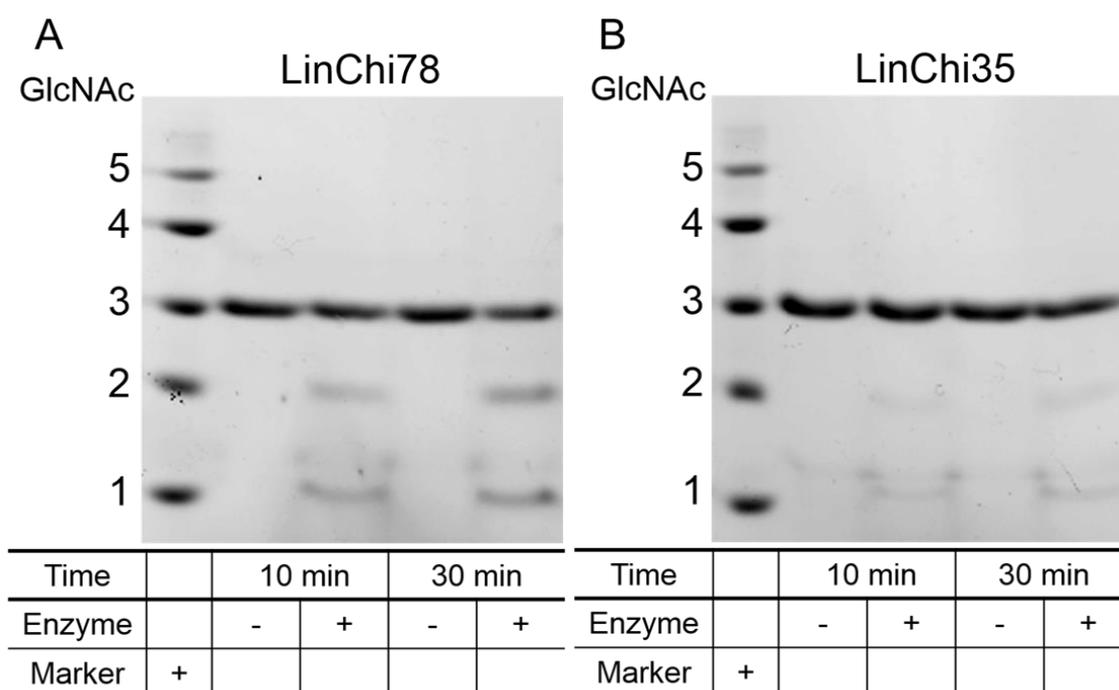


図 2-5. LinChi78 (A) と LinChi35 (B) による三量体 (GlcNAc)₃ の分解産物
 加水分解反応は反応時間 10 分と 30 分, 反応温度 50 °C で行った. 生産されたキチン断片は 2-2-4 に記載された方法で標識し, PAGE 法で分離した. キチンオリゴ糖を標準物質として使用した.

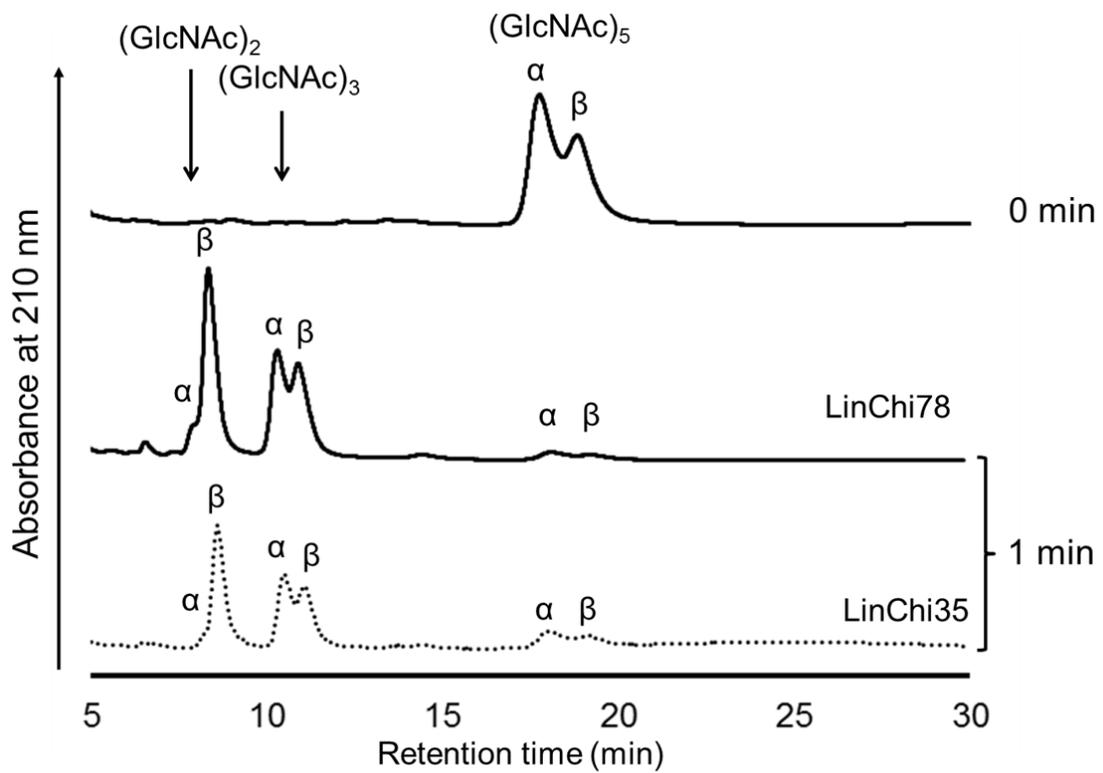


図 2-6. 五量体分解産物のアノマー分析

矢印は $(\text{GlcNAc})_n$ ($n=2-4$) が溶出する位置を示している. 各ピークに, 帰属したアノマー (α または β) を示す.

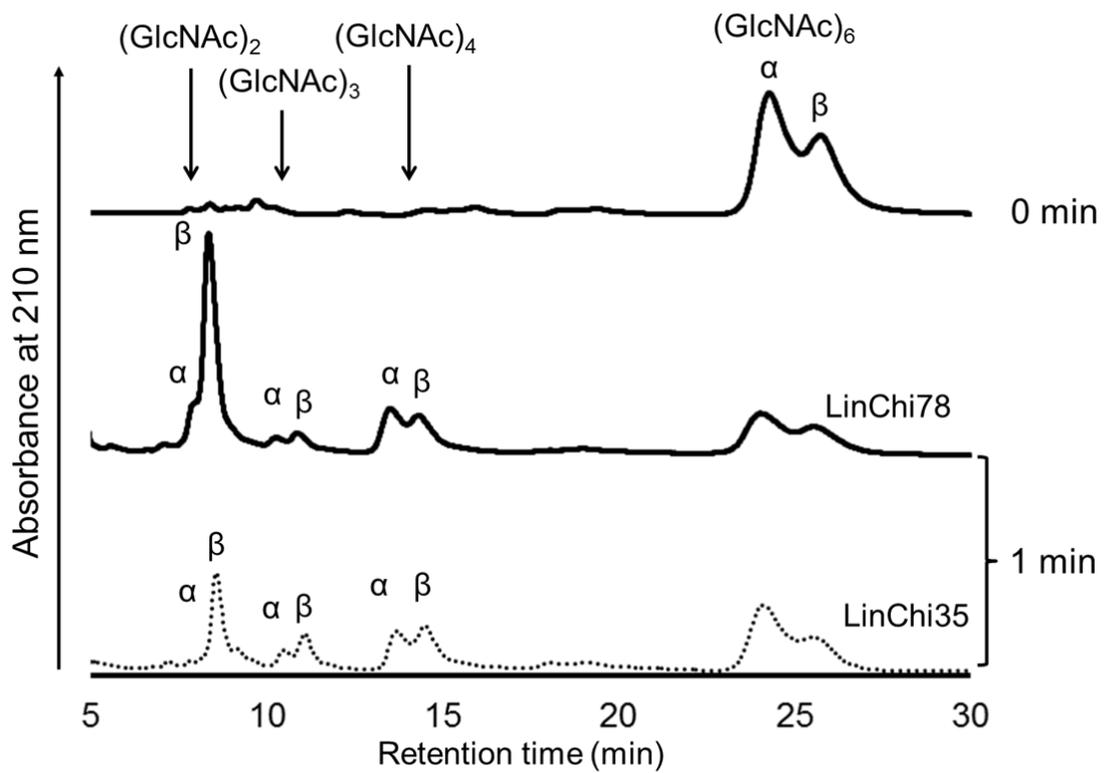


図 2-7. 六量体分解産物のアノマー分析

矢印は(GlcNAc)_n(n=2-4) が溶出する位置を示している. 各ピークに, 帰属したアノマー (α または β) を示す.

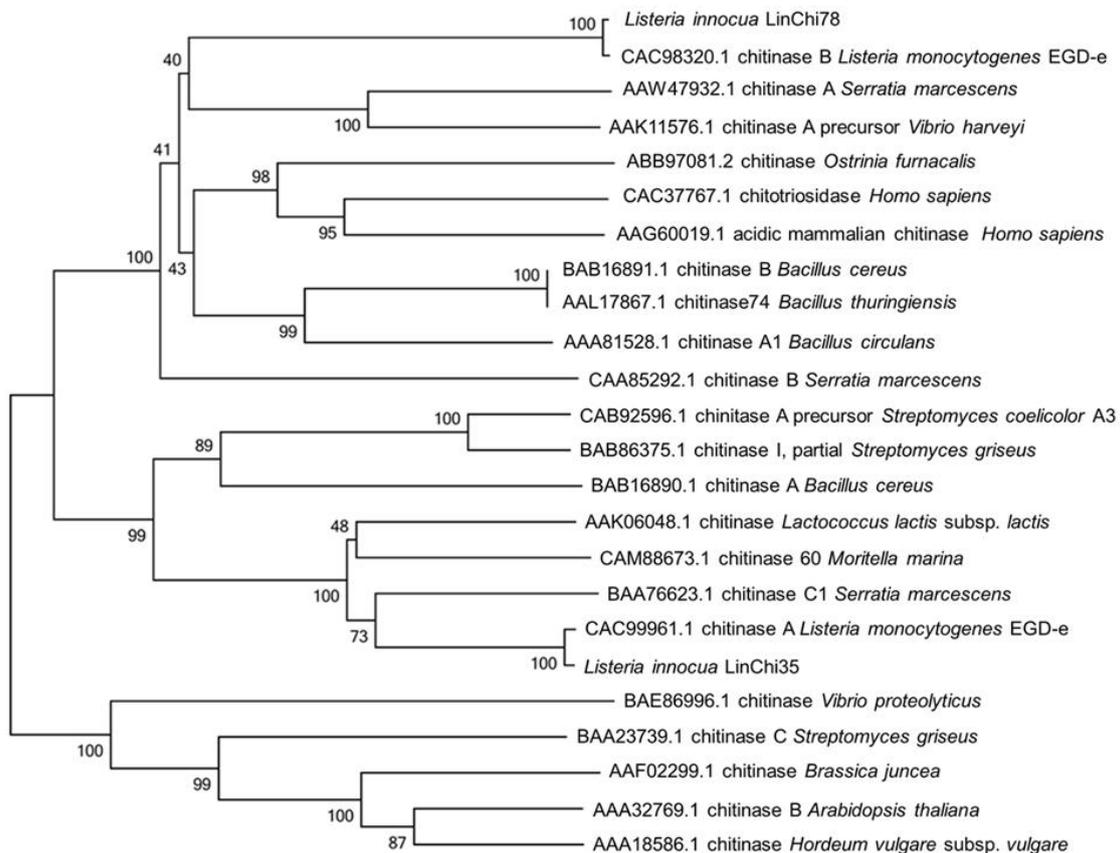


図 2-8. キチナーゼの触媒ドメインの系統樹

この系統樹は MEGA6 [16] 上で neighbor-joining 法を用いて構築した。同プログラムでブーツストラップ法を 1000 回行い、各節に計算結果を示している。細菌の由来 GH18 キチナーゼのアクセシオンナンバー、酵素名 生物名の順を示している。

参考文献

1. **Horn SJ, Sørbotten A, Synstad B, Sikorski P, Sørli M, Vårum KM, Eijsink VG** (2006) Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. FEBS J 273: 491-503. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.05079.x
2. **Synstad B, Vaaje-Kolstad G, Cederkvist FH, Saua SF, Horn SJ, Eijsink VG, Sørli M** (2008) Expression and characterization of endochitinase C from *Serratia marcescens* BJL200 and its purification by a one-step general chitinase purification method. Biosci Biotechnol Biochem. 72: 715-723. doi: 10.1271/bbb.70594
3. **キチン,キトサン研究会** (1988) 最後のバイオマス キチン, キトサン, 技報堂出版, 第1版: 13
4. **Jackson P** (1990) The use of polyacrylamide-gel electrophoresis for the high-resolution separation of reducing saccharides labelled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1, 3, 6-trisulphonic acid. Detection of picomolar quantities by an imaging system based on a cooled charge-coupled device. Biochem J 270: 705-713
5. **Ishisaki K, Honda Y, Taniguchi H, Hatano N, Hamada T** (2012) Heterogeneous expression and characterization of a plant class IV chitinase from the pitcher of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. Glycobiology 22: 345-351. doi:10.1093/glycob/cwr142
6. **Uchiyama T, Katouno F, Nikaidou N, Nonaka T, Sugiyama J, Watanabe T** (2001) Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase A from *Serratia marcescens* 2170. J Biol Chem 276: 41343-41349. doi: 10.1074/jbc.M103610200
7. **Watanabe T, Ariga Y, Sato U, Toratani T, Hashimoto M, Nikaidou N, Kezuka Y, Nonaka T, Sugiyama J** (2003) Aromatic residues within the substrate-binding cleft of *Bacillus circulans* chitinase A1 are essential for hydrolysis of crystalline. Biochem J 376: 237-244. doi: 10.1042/BJ20030419
8. **Horn SJ, Sikorski P, Cederkvist JB, Vaaje-Kolstad G, Sørli M, Synstad B, Vriend G, Vårum KM, Eijsink VG** (2006) Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. Proc Natl Acad Sci USA 103: 18089-18094. doi: 10.1073/pnas.0608909103
9. **Payne CM, Baban J, Horn SJ, Backe PH, Arvai AS, Dalhus B, Bjørås M, Eijsink VG, Sørli M, Beckham GT, Vaaje-Kolstad G** (2012) Hallmarks of

- processivity in glycoside hydrolases from crystallographic and computational studies of the *Serratia marcescens* chitinases. *J Biol Chem* 287: 36322-36330. doi: 10.1074/jbc.M112.402149
10. **Igarashi K, Uchihashi T, Uchiyama T, Sugimoto H, Wada M, Suzuki K, Sakuda S, Ando T, Watanabe T, Samejima M** (2014) Two-way traffic of glycoside hydrolase family 18 processive chitinases on crystalline chitin. *Nat Commun* 5: 3975. doi: 10.1038/ncomms4975
 11. **Li H, Greene LH** (2010) Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitinbinding. *PLoS One* 13: e8654. doi:10.1371/journal.pone.0008654
 12. **Imai T, Watanabe T, Yui T, Sugiyama J** (2002) Directional degradation of β -chitin by chitinase A1 revealed by a novel reducing end labelling technique. *FEBS Lett* 510: 201-205. doi: 10.1016/S0014-5793(01)03249-5
 13. **Vaae-Kolstad G, Bunaes AC, Mathiesen G, Eijsink VG** (2009) The chitinolytic system of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* comprises a nonprocessive chitinase and a chitin-binding protein that promotes the degradation of alpha- and beta-chitin. *FEBS J* 276: 2402-2415. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.06972.x
 14. **Hsieh YC, Wu YJ, Chiang TY, Kuo CY, Shrestha KL, Chao CF, Huang YC, Chuankhayan P, Wu WG, Li YK, Chen CJ** (2010) Crystal structures of *Bacillus cereus* NCTU2 chitinase complexes with chitooligomers reveal novel substrate binding for catalysis: a chitinase without chitin binding and insertion domains. *J Biol Chem* 285: 31603-15. doi: 10.1074/jbc.M110.149310
 15. **Zees AC, Pyrpassopoulos S, Vorgias CE** (2009) Insights into the role of the (alpha+beta) insertion in the TIM-barrel catalytic domain, regarding the stability and the enzymatic activity of chitinase A from *Serratia marcescens*. *Biochim Biophys Acta*. 1794:23-31. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.09.018
 16. **Frederiksen RF, Leisner JJ** (2015) Effects of *Listeria monocytogenes* EGD-e and *Salmonella enterica* ser. Typhimurium LT2 chitinases on intracellular survival in *Dictyostelium discoideum* and mammalian cell lines. *FEMS Microbiol Lett* 362. pii: fnv067. doi: 10.1093/femsle/fnv067

第 III 章 各種多糖に対する結合 能力の解析および、他の細菌由来 キチナーゼと比較

3-1 はじめに

GH18 キチナーゼには、触媒ドメインだけではなく、フィブロネクチン III 型ドメイン (FNIII) やキチン結合ドメイン (ChBD) などの他のドメインを併せ持つ。序論でも述べたように、大腸菌由来キチナーゼ EcChiA の ChBD は腸上皮細胞への接着を促進し、その病原性を高める [1]。また、*P. aeruginosa* の生産するキチン結合タンパク質 (CBP) は、触媒ドメインを持たないが、細胞接着の初期段階で重要な役割を持つことが報告されている [2]。つまり、キチン結合ドメインは感染時に重要な役割を持つ可能性が示唆されている。

L. monocytogenes は二つのキチナーゼを生産し、それぞれ病原性や生存性に関与することが示唆されている [3, 4]。しかし、キチン結合ドメインの機能や両タンパク質のドメイン構造の違いに関しては、明らかにされていない。*L. innocua* が生産する LinChi78 は、*L. monocytogenes* キチナーゼのドメイン構成と同様、触媒ドメインと FNIII と Carbohydrate-Binding Module (CBM) 5 に分類される ChBD で構成され、LinChi35 は触媒ドメインのみで構成されている (図 1-1)。

本章では、*L. innocua* キチナーゼの非結晶性多糖であるキチンビーズ、結晶性多糖の α -キチンやセルロースに対する結合能力を調べた。また、LinChi78 の CBM5 の結合能力を、LinChi78 と類似したドメインで構成され、ChBD が CBM2 に分類される *B. thuringiensis* 由来キチナーゼ (BthChi74) と比較解析した。

3-2 実験試料と方法

3-2-1 実験試薬

結合実験で基質としたキチンビーズは、New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) から購入し、セルロースは DAICEL (Osaka, Japan) から提供されたものを使用した。特に指定がない限り、他の試薬は Wako Pure Chemicals (Tokyo, Japan) および Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入し、使用した。

3-2-2 LinChi78 と LinChi35 の発現と精製

1-2-3 および 1-2-4 に準じて、LinChi78 と LinChi35 の発現と精製を行った。

3-2-3 BthChi74 キチナーゼ遺伝子の取得および発現ベクターの構築

American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) から購入した *B. thuringiensis* Berliner (serovar israelensis) の染色体 DNA (ATCC No. 35646 D-5) を鋳型として、PCR 法により *B. thuringiensis* 由来キチナーゼ遺伝子 (*BthChi74* 遺伝子) を増幅した。PCR 法は 1-2-3 の操作に従い、行った。*BthChi74* 遺伝子の 5

'末端または 3'末端に *EcoRI* と *SalI* と制限酵素認識部位が付加された形で増幅するように Fw プライマーと Rv プライマーの設計を行った。

BthChi74 遺伝子用

Fw プライマー: 5'-CGGAATTCCGATGGCTATGAGGTCTCAAAAAT-3'

Rv プライマー: 5'-ACGCGTCGACGTTTTTCGCTAATGACGGCATTAAA-3'

(下線は制限酵素認識配列 (*EcoRI*, *SalI*)を示す)。

また、Rv プライマーは、pET 発現用ベクターに挿入した時に、発現したタンパク質の C 末端側にヒスチジンタグ [(His)₆ Tag]が付加されるように設計し、増幅したキチナーゼ遺伝子の名称は *BthChi74* とした。プライマーは、Sigma-Aldrich Life Science (Hokkaido, Japan) から購入した。

増幅した PCR 産物を *EcoRI* と *SalI* で処理し、pET21d(+) ベクター (Novagen, Madison, WI, USA) に挿入し、発現ベクター pET-*BthChi74* を構築した (図 3-1)。*BthChi74* 遺伝子の塩基配列は、Eurofins Genomics (Tokyo, Japan) に依頼し、確認した。得られた *BthChi74* 遺伝子の塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank データベースに申請し、それぞれアクセス番号 LC194873 として登録された。

3-2-4 *BthChi74* の発現と精製

1-2-4 の操作に従い、pET-*Bthchi74* を大腸菌で発現させ、培養抽出液を得た。培養抽出液を 50 mM Tris-HCl, 1 M (NH₄)₂SO₄ (pH 8.0) に対して透析した後、疎水クロマトグラフィー (HiTrap™ Butyl FF; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) に供し、硫酸アンモニウム濃度 1 M から 0 M への直線濃度勾配で、吸着したタンパク質を溶出した。得られた活性画分を、20 mM Tris-HCl (pH 8.5) に対して透析した。透析した画分を、陰イオン交換クロマトグラフィー (HiTrap™ Q HP, GE Healthcare) に供した。吸着したタンパク質は、NaCl 濃度を 0 M から 1 M へと直線的に濃度を変化させ、溶出した。疎水クロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーシステム (Hiload system) 構成は、以下である。

ポンプ: PUMP P-50 (Pharmacia, NJ, USA),

UV 検出機: LKB-OpticalUnitUV-1 (Pharmacia, NJ, USA)

LKB Control Unit UV-1 (Pharmacia, NJ, USA),

ペンレコーダー: LKB-REC102 (Pharmacia, NJ, USA).

活性の高い画分および電気泳動上均一に精製された活性酵素画分を、TS 緩衝液 [20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl (pH 7.5)]に対して透析し、4 °C で保存し、実験に使用した。

3-2-5 キチンビーズ, α -キチンとセルロースに対する結合解析

エビの殻由来の結晶 α -キチンとセルロースは 250 μm の粒子サイズに Wiley mill (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) で粉末化した。キチンビーズ (100 μL), α -キチン (3 mg) またはセルロース (3 mg) を結合緩衝液 (20 mM Tris-Cl, 0.5 M NaCl (pH 7.5)) で平衡化した後, 酵素溶液 (1 μM) を加え, その混合物を 60 分間, 4 °C で静置し, 15 分毎に緩やかに攪拌した。その後, 遠心分離 (20,000 \times g, 4 °C, 5 分) し, 上清 (非結合画分) と沈殿 (結合画分) に分離した。沈殿は結合緩衝液で 10 回洗浄し, 洗浄溶液は洗浄画分として回収した。多糖結合タンパク質, 非結合画分, 洗浄画分を SDS sample 緩衝液と混合した後, 10% SDS-PAGE で分析した。また, 結合したタンパク質の量は, 結合実験前の酵素活性から, 非結合画分と洗浄画分の酵素活性の和を差し引くことで算出した。

3-3 結果

3-3-1 BthChi74 の発現

図 3-2A は, 組換え BthChi74 タンパク質の模式図を示す。キチナーゼ遺伝子は, pET ベクターにクローニングし, 大腸菌を宿主として発現させた。その遺伝子産物は活性を持つ酵素として得られた。その後, 疎水クロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーに供して精製した。SDS-PAGE で分離し, 約 74 kDa に単一のバンドが検出でき, 精製 BthChi74 とした (図 3-2B)。

3-3-2 LinChi78, LinChi35, および BthChi74 の各種多糖に対す結合

リステリアキチナーゼが, 様々な多糖類とどのように相互作用するかを調べるために, キチンビーズ, α -キチン, およびセルロースとの結合活性の測定を行った (図 3-3, 3-4)。LinChi78 は, 効率良くキチンビーズと結合し (89%), 結晶性の α -キチンやセルロースとはキチンビーズほど結合しなかった (57%, 31%)。これらの結果は, 以前に他のキチナーゼで報告された結合実験の結果と類似している [5, 6]。一方, LinChi35 は, LinChi78 と同程度キチンビーズと結合することができるが (83%), 結晶性の α -キチンとセルロースに対する結合性は低かった (それぞれ 25%と 23%)。これは, LinChi35 が触媒ドメインのみで構成されており, 触媒ドメインのみでもキチンビーズに結合することが可能であること, ChBD は結晶性基質に対する結合能力を高めることが報告されていることから, この結果の妥当性を示している [7-9]。

最後に, BthChi74 は, キチンビーズ, α -キチン, およびセルロースにそれぞれ高い結合能力を示した (98%, 89% および 88%) (図 3-5)。キチンビーズ, α -キチン, およびセルロースに, それぞれ 89%, 57%, および 31%結合した LinChi78

の結合特性と比較すると、キチンビーズに対する結合能は類似していたが、BthChi74の α -キチンおよびセルロースに対する結合能がLinChi78の結合能より高いことが明らかとなった。一方で、LinChi78はBthChi74よりもキチンに選択的に結合していることが示唆された。

3-4 考察

LinChi78は高い割合でキチンビーズに結合し、ある程度 α -キチンとセルロースに結合した。LinChi78のChBDはCBM5に分類され、触媒ドメインがGH19ファミリーに分類される*Streptomyces griseus*由来キチナーゼC(SgChiC)のCBM5と46%の同一性を示す。CBMにおいて、Trp残基のような芳香族側鎖が、糖質との結合に重要な役割を持つことが知られている。SgChiCのCBM5では、2つの連続したTrp残基がその機能を果たしており、三重反平行 β シートからなるドメインの表面上で糖質との結合に関与する[10-12]。アラインメント分析では、LinChi78のCBM5上に存在するTrp706およびTrp707がSgChiCの2つのTrp残基に相当する。これは、この2つのTrp残基が糖質との結合に関与することを示唆している(図3-6A)[10, 11]。

BthChi74は、キチンビーズ、 α -キチン、およびセルロースに対し、高い結合能力を示した。このキチナーゼの持つChBDはCBM2に分類され、他の細菌のCBM2と一次構造を比べると、*Bacillus cereus*由来キチナーゼCW(BcChiCW)[13]と97%、*Streptomyces lividans*由来キチナーゼCとは35%[14]の同一性を示した。CBM2ドメインは、一般的に4本鎖の β シート2つからなる β サンドイッチ折り畳みドメインで構成されている[15-17]。BthChi74のCBM2上に基質との結合に関与する可能性のある4つのTrp残基を持つ。そのうちTrp591, Trp626, Trp645の3つのTrp残基は*Pycococcus furiosus*由来キチナーゼ(PfChi)のCBM2上に存在する基質結合に関与するTrp残基と同じ位置に保存されている[16](図3-6B)。また、BthChi74のTrp612も他のCBM2においても保存されているが、PfChiの結晶構造から、その表面近くに位置しないため結合能に寄与しないと考えられる[15-17]。図3-7Aに示すように、CBM5は狭い領域に位置する2つのTrp残基を持つ。一方、CBM2は平坦な表面構造を持ち、その広い領域に3つのTrp残基が位置している(図3-7B)。これらCBM上の相互作用に関与するTrp残基の数と表面性の違いが、結合する多糖に対する能力の違いを生じていると考えられる。

CBM5の結合能は、CBM2と比べ、キチンの選択性が高いと言える。Nakamuraらは、PfChiのCBM2の基質と結合に関与する芳香族アミノ酸の周辺のAspやGluの電荷を持つアミノ酸に変異を導入が、セルロースの選択性に影響を与えず

に、キチンの選択性のみを減少させることを報告している [16]. この様に、基質の結合選択性には Trp 残基の数や配置だけではなく、基質と相互作用するアミノ酸周辺の側鎖も選択性に寄与する. 本研究が示した, CBM5 や CBM2 の基質選択性の違いをより理解するには, 結合周辺のアミノ酸の影響も試験していく必要がある.

本研究で明らかにした種々の基質に対する結合活性特性の詳細な分析は今後の研究におけるキチナーゼおよび, 他の糖質分解酵素の ChBD の役割の理解につながると考えている.

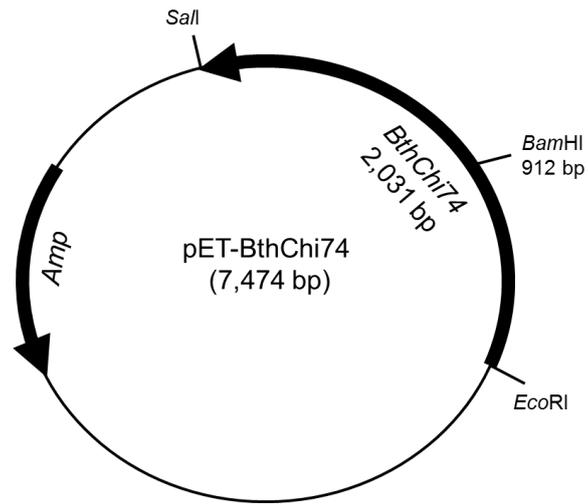


図 3-1. 作製した発現プラスミドの模式図

作製した pET-BthChi74 を示している. *Amp*: アンピシリン耐性遺伝子.

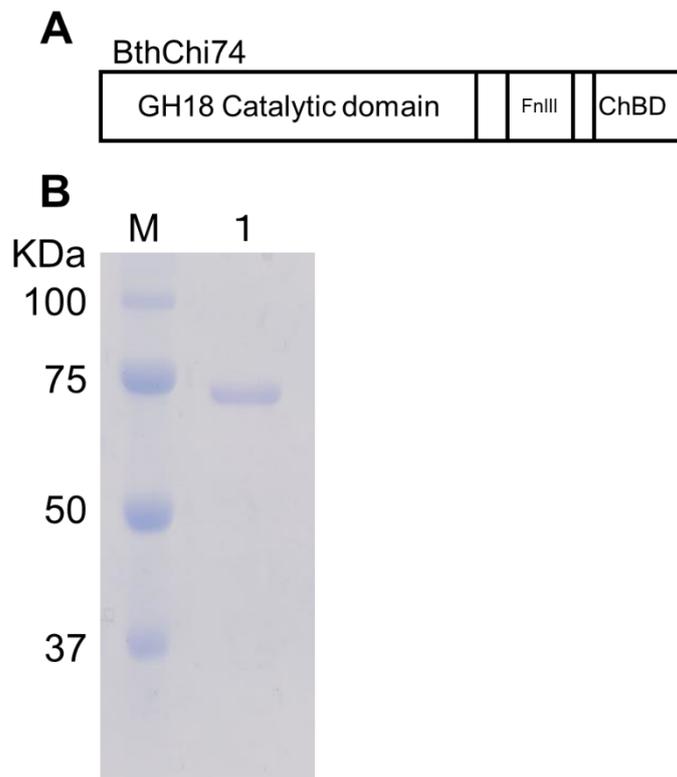


図 3-2. 大腸菌 BL21 で発現した BthChi74 の模式図と SDS-PAGE の結果

A: BthChi74 を示している。GH18 Catalytic domain : GH18 触媒ドメイン, FNIII : フィブロネクチン III 型様ドメイン, CBM2 : キチン結合モジュール 2, His Tag : ベクター由来ヒスチジンタグを示している。B: 精製した BthChi74 の SDS-PAGE の結果を示している。レーン M: 分子量マーカー (Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad, Osaka, Japan), レーン 1 : Ni セファロースでの精製後の酵素溶液。電気泳動図の隣にある数字は分子量マーカーのタンパク質バンドの分子量 (kDa) を示している。

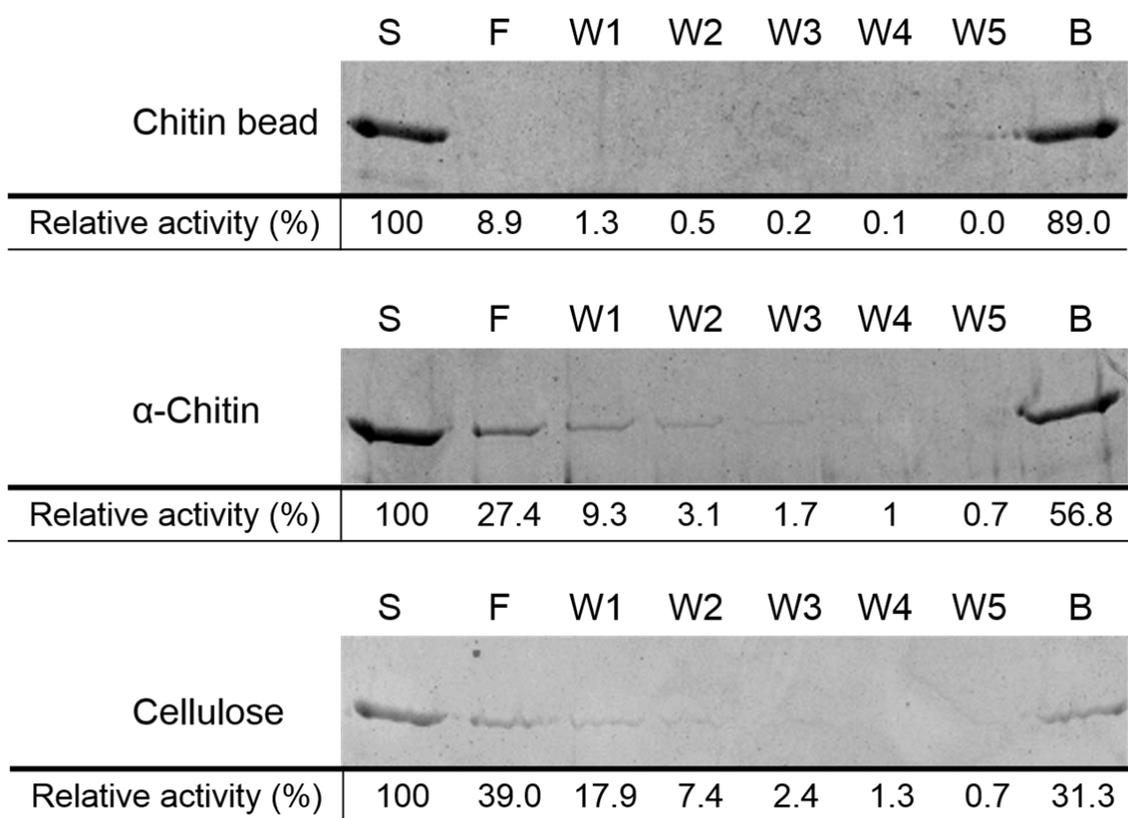


図 3-3. LinChi78 のキチンビーズ, α -キチン, セルロースに対する結合活性
 S: 結合前画分, F:非結合画分, W: 洗浄画分, B: 結合画分を示す. Relative activity
 の値は S 画分を分解活性の初速度を 100%とした際の, それぞれの画分の活性
 の初速度を表している.

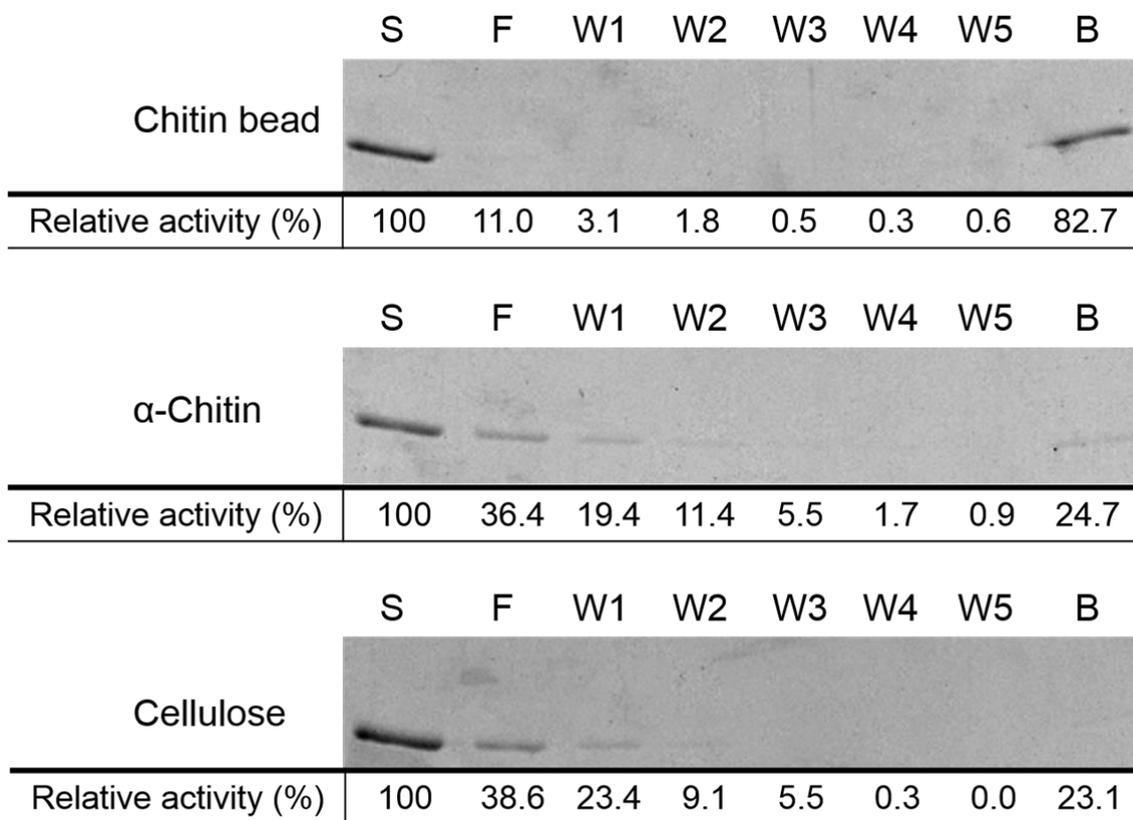


図 3-4. LinChi35 のキチンビーズ, α -キチン, セルロースに対する結合活性
 S: 結合前画分, F:非結合画分, W: 洗浄画分, B: 結合画分を示す. Relative activity
 の値は S 画分を分解活性の初速度を 100%とした際の, それぞれの画分の活性
 の初速度を表している.

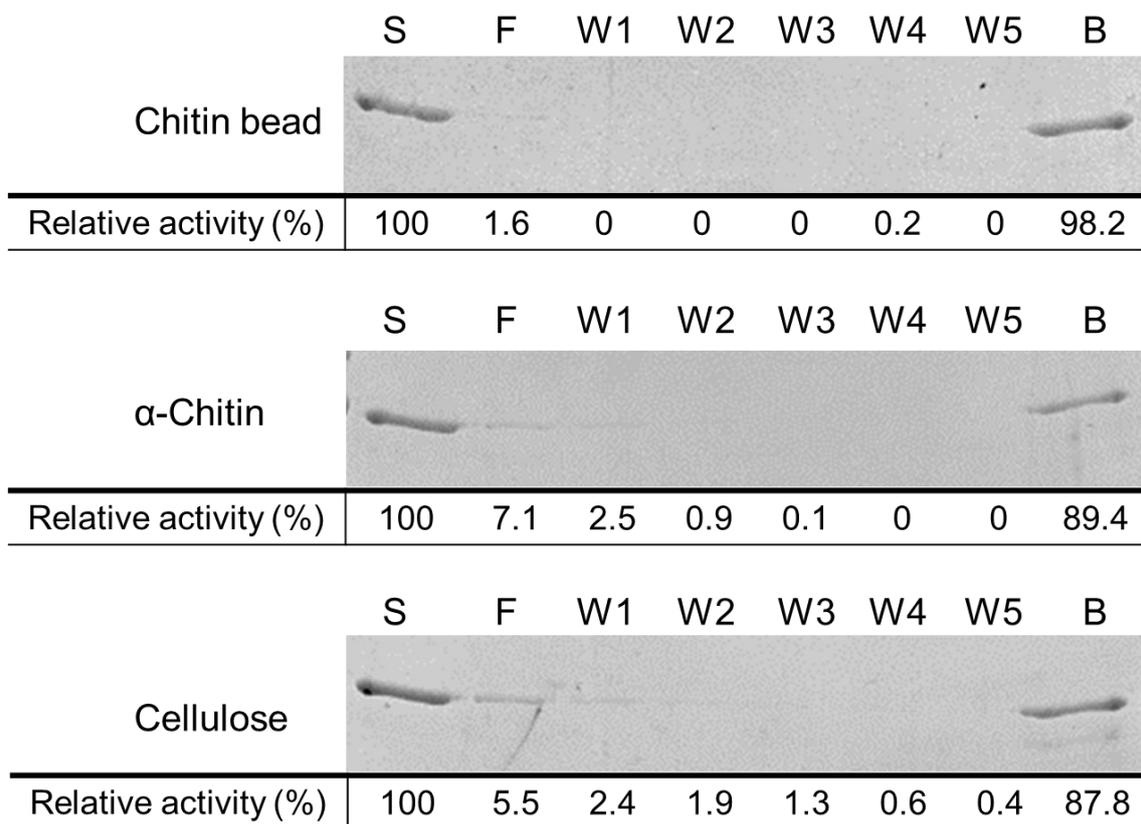


図 3-5. BthChi74 のキチンビーズ, α -キチン, セルロースに対する結合活性
 S: 結合前画分, F:非結合画分, W: 洗浄画分, B: 結合画分を示す. Relative activity
 の値は S 画分を分解活性の初速度を 100%とした際の, それぞれの画分の活性
 の初速度を表している.

A

LinChi78 CBM5	P A W D A A K T Y N K G D R V S Y K G K T Y E A Q W W T Q G N E P G A E Q W G P W - - - -	721
SgChiC CBM5	T A W S S S S V Y T N G G T V S Y N G R N Y T A K W W T Q N E R P G T S D V - - W - - - -	72
SmChiB CBM5	P A Y V P G T T Y A Q G A L V S Y Q G Y V W Q T K W G Y I T S A P G S D S A - - W L K V G	496

B

BthChi74	- T A T F S V T S N W G S G Y N F S I I I K N N G T I P I K N W K L E F D Y S G - - N L T Q V W D S K I	630
BcChiCW	G T A T F S V T S N W G S G Y N F S I I I K N N G T T P I K N W K L E F D Y S G - - N L T Q V W D S K I	628
<i>Streptomyces lividans</i> ChiC	- - - - - S D W G T G F G G S W T V K N T G T T S L S S W T V E W D F P T G T K V T S A W D A T V	85
<i>S. coelicolor</i> ChiC	- - - - - S D W G T G F G G S W T V K N T G T T S L S S W T V E W D F P T G T K V T S A W D A T V	85
<i>Cellulomonas uda</i> chitinase A	- - - - - G D W G T G H Q A S V T V T N G T T S T A S T W T L E F D L P A G T T I T S S W D A D V	108
<i>Pyrococcus furiosus</i> chitinase	- - - - - V N D W G S G A E Y D V T L N L D - - G Q Y D W T V K V K L A P G A T V G S F W S A N K	312
<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD CBD2-1	- - - - - D W G N - T E Y D V T L N L G - - G T Y D W V V K V K L K D G S S V S S F W S A N K	673
<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD CBD2-2	- - - - - Q D W G S - T E Y D V T L N L G - - G T Y D W V V K V K L K D G S A V S S V W S A N K	816
<i>C. fimi</i> xylanase B	C Q V L W G - V N Q W N T G F T A N V T V K N T S S A P V D G W T L T F S F P S G Q Q V T Q A W S S T V	427
<i>C. fimi</i> endoglucanase	C R V D Y A V T N Q W P G G F G A N V T I T N L - G D P V S S W K L D W T Y T A G Q R I Q Q L W N G T A	85
<i>C. fimi</i> endo-(1 → 4) beta-xylanase	C S V T A T R A E E W S D R E N V T Y S V S - - - - G S S A W T V N L A L N G S Q T I Q A S W N A N V	265

BthChi74	S S K T N N H Y V I T N A G W N G E I P P G G S I T I G G A G T G N - - - - -	664
BcChiCW	S S K T N N H Y V I T N A G W N G E I P P G G F I T I G G A G T G N - - - - -	662
<i>Streptomyces lividans</i> ChiC	T - N S G D H W T A K N V G W N G T L A P G A S V S F G F N G S G P G - - - S P S N C K L N G G S C	131
<i>S. coelicolor</i> ChiC	T - N S G D H W T A K N V G W N G T L A P G A S V S F G F N G S G P G - - - S P S N C K L N G G S C	131
<i>Cellulomonas uda</i> chitinase A	T - R T G T H Y K V T S K S W A G P F A P G A T Q T W G Y I G S G P F - - A - Q P T G C T V N G A T	154
<i>Pyrococcus furiosus</i> chitinase	Q - E G N G Y V I F T P V S W N - - - - K G P T A T F G F I V N G P Q G D K V E E I T L E I N G Q - -	356
<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD CBD2-1	A - E E G G Y V V F T P V S W N - - - - R G P T A T F G F I A T - - - - -	700
<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD CBD2-2	A - E E G G Y V V F T P V S W N - - - - K G P T A T F G F I A T - - - - -	843
<i>C. fimi</i> xylanase B	T - Q S G S A V T V R N A P W N G S I P A G G T A Q F G F N G S H T G T N A - A P T A F S L N G T P C	476
<i>C. fimi</i> endoglucanase	S - T N G G Q V S V T S L P W N G S I P T G G T A S F G F N G S W A G S N P - T P A S F S L N G - - -	131
<i>C. fimi</i> endo-(1 → 4) beta-xylanase	T - G S G S T R T V T - - - - - P N G S G N T F G V T V M K N G S S T - T P A A - - - - -	328

図 3-6. CBM5 (A) と CBM2 (B) のアラインメント

A:CBM5 アライメントを示している. 酵素 (accession number) は, LinChi78 CBM5 (LC092875); SgChiC CBM5 (BAA23739); SmChiB CBM5 (CAA85292).

B:CBM2 アライメントを示している. BthChi74 (LC194873); BcChiCW (AF41657); *Streptomyces lividans* ChiC (BAA02168); *S. coelicolor* ChiC (CAB94547); *Cellulomonas uda* chitinase A (AAG27061); PfChi (AAL81357); *Thermococcus kodakarensis* KOD CBD2-1 (BAD85954); *Thermococcus kodakarensis* KOD CBD2-2 (BAD85954); *C. fimi* xylanase B (AEA30147); *C. fimi* endoglucanase (AEE47298); と *C. fimi* endo-1, 4 beta-xylanase (CAA54145) . 基質と相互作用を行う推定芳香族アミノ酸を赤で示している. 保存されているアミノ酸は薄い影で示している.

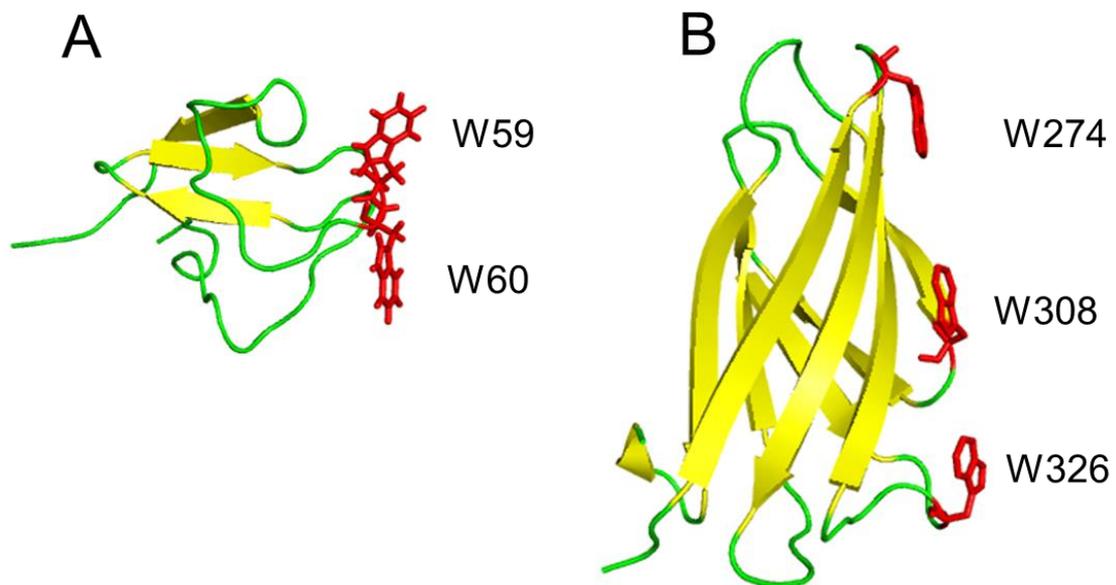


図 3-7. *S. griseus* chitinase C の CBM5 (A) と *P. furiosus* chitinase の CBM5 (B) の結晶構造

A: *S. griseus* 由来キチナーゼ (PDB No. 2D49), B: *P. furiosus* 由来キチナーゼの CBM2 (PDB: 2CWR) を示している. キチン結合側鎖は赤色で示している.

参考文献

1. **Low D, Tran HT, Lee IA, Dreux N, Kamba A, Reinecker HC, Darfeuille-Michaud A, Barnich N, Mizoguchi E** (2013) Chitin-binding domains of *Escherichia coli* ChiA mediate interactions with intestinal epithelial cells in mice with colitis. *Gastroenterology* 145: 602-612. doi: 10.1053/j.gastro.2013.05.017
2. **Manos J, Arthur J, Rose B, Bell S, Tingpej P, Hu H, Webb J, Kjelleberg S, Gorrell MD, Bye P, Harbour C** (2009) Gene expression characteristics of a cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm and planktonic growth. *FEMS Microbiol Lett* 292: 107-114. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01472.x
3. **Chaudhuri S, Gantner BN, Ye RD, Cianciotto NP, Freitag NE** (2013) The *Listeria monocytogenes* ChiA chitinase enhances virulence through suppression of host innate immunity. *MBio* 4: e00617-12. doi:10.1128/mBio.00617-12
4. **Frederiksen RF, Leisner JJ** (2015) Effects of *Listeria monocytogenes* EGD-e and *Salmonella enterica* ser. Typhimurium LT2 chitinases on intracellular survival in *Dictyostelium discoideum* and mammalian cell lines. *FEMS Microbiol Lett* 362. pii: fnv067. doi: 10.1093/femsle/fnv067
5. **Watanabe T, Ito Y, Yamada T, Hashimoto M, Sekine S, Tanaka H** (1994) The roles of the C-terminal domain and type III domains of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in chitin degradation. *J Bacteriol* 176: 4465-4472.
6. **Morimoto K, Karita S, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K** (1997) Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding *Clostridium paraputrificum* chitinase ChiB and analysis of the functions of novel cadherin-like domains and a chitin-binding domain. *J Bacteriol* 179: 7306-7314.
7. **Suzuki K, Taiyoji M, Sugawara N, Nikaidou N, Henrissat B, Watanabe T** (1999) The third chitinase gene (chiC) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. *Biochem J* 343: 587-596. doi: 10.1042/bj3430587
8. **Kashimura A, Kimura M, Okawa K, Suzuki H, Ukita A, Wakita S, Okazaki K, Ohno M, Bauer PO, Sakaguchi M, Sugahara Y, Oyama F** (2015) Functional properties of the catalytic domain of mouse acidic mammalian chitinase expressed in *Escherichia coli*. *Int J Mol Sci* 16: 4028-4042. doi: 10.3390/ijms16024028
9. **Lin FP, Wu CY, Chen HN, Lin HJ** (2015) Effects of C-terminal domain truncation on enzyme properties of *Serratia marcescens* chitinase C. *Appl Biochem Biotechnol* 175: 3617-3627. doi: 10.1007/s12010-015-1530-5

10. **Akagi K, Watanabe J, Hara M, Kezuka Y, Chikaishi E, Yamaguchi T, Akutsu H, Nonaka T, Watanabe T, Ikegami T** (2006) Identification of the substrate interaction region of the chitin-binding domain of *Streptomyces griseus* chitinase C. *J Biochem* 139: 483-493. doi: 10.1093/jb/mvj062
11. **Itoh Y, Watanabe J, Fukada H, Mizuno R, Kezuka Y, Nonaka T, Watanabe T** (2006) Importance of Trp59 and Trp60 in chitin-binding, hydrolytic, and antifungal activities of *Streptomyces griseus* chitinase C. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 1176-1184. doi: 10.1007/s00253-006-0405-7
12. **Kezuka Y, Ohishi M, Itoh Y, Watanabe J, Mitsutomi M, Watanabe T, Nonaka T** (2006) Structural studies of a two-domain chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037. *J Mol Biol* 358: 472-484. doi: 10.1016/j.jmb.2006.02.013
13. **Huang CJ, Wang TK, Chung SC, Chen CY** (2005) Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. *J Biochem Mol Biol* 38: 82-88. doi: 10.5483/BMBRep.2005.38.1.082
14. **Fujii T, Miyashita K** (1993) Multiple domain structure in a chitinase gene (chiC) of *Streptomyces lividans*. *J Gen Microbiol* 139: 677-686. doi: 10.1099/00221287-139-4-677
15. **Millward-Sadler SJ, Poole DM, Henrissat B, Hazlewood GP, Clarke JH, Gilbert HJ** (1994) Evidence for a general role for high-affinity non-catalytic cellulose binding domains in microbial plant cell wall hydrolases. *Mol Microbiol* 11: 375-382. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00317.x
16. **Nakamura T, Mine S, Hagihara Y, Ishikawa K, Ikegami T, Uegaki K** (2008) Tertiary structure and carbohydrate recognition by the chitin-binding domain of a hyperthermophilic chitinase from *Pyrococcus furiosus*. *J Mol Biol* 381: 670-80. doi: 10.1016/j.jmb.2008.06.006
17. **Hanazono Y, Takeda K, Niwa S, Hibi M, Takahashi N, Kanai T, Atomi H, Miki K** (2016) Crystal structures of chitin binding domains of chitinase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *FEBS Lett* 590: 298-304. doi: 10.1002/1873-3468.12055

第 IV 章 総合考察

病原性細菌である *L. monocytogenes* が生産するキチナーゼは病原性に重要な役割を持つ病原因子の一つであることが知られており、本研究では、近縁の非病原性 *L. innocua* の二種のキチナーゼ様遺伝子の特性解析を行った。非病原性細菌 *L. innocua* 由来のキチナーゼ様遺伝子 *lin0153* と *lin1996* を取得し、大腸菌中で可溶性タンパク質として発現させることに成功した。それぞれの遺伝子産物はキチン分解能をもつことから、キチナーゼと同定でき、その分子量から LinChi78 (*lin0153* 遺伝子産物) と LinChi35 (*lin1996* 遺伝子産物) と命名した。これらの精製酵素を研究材料として、人工基質を用いた酵素化学的解析、多糖であるキチンやキチンオリゴ糖を用いた酵素の分解機序、そして多糖に対する結合性を解析した。

LinChi78 と LinChi35 は、人工基質 4NP-(GlcNAc)₂ に対して、中性と弱酸性条件下約 50 °C で最大の活性を示した。多糖基質やオリゴ糖基質の分解産物の組成から作用機序を解析した結果、LinChi78 はエキソ型プロセッシブ型、LinChi35 はエンド型ノンプロセッシブ型の分解様式を持つことが示唆され、両者の機能が異なることが明らかになった。また、複数のドメインを持つ LinChi78 と触媒ドメインのみの LinChi35 の α -キチンやセルロースに対する結合能力を検証した結果、LinChi35 は上記多糖に対し LinChi78 よりも低い結合能力を示し、ChBD は結晶性 α -キチンの認識に関与していることを明らかにした。

L. innocua の LinChi78 と LinChi35 に対応する病原性細菌の *L. monocytogenes* 由来の LmChiB (*lmo0105*) と LmChiA (*lmo1883*) は、マウスの肝臓と脾臓内への細菌の定着に必要で、リステリア菌の感染に関与する [2-4]。特に、LmChiA は感染時にその生産量が増加し、自然免疫で重要な役割を担う inducible nitric oxide synthase (iNOS) の発現を阻害し、マウス組織への感染を促進する [4]。本研究で解析した非病原性の *L. innocua* の LinChi35 は、マクロファージのような弱酸性条件 (pH4.5-6.2) でも安定性を示し、酵素活性を示すことが明らかになった [5]。この酵素は LmChiA と 97%の同一性を示すことから、LmChiA と同様に iNOS の抑制を引き起こすかどうかは興味深い。

最近の研究では、*L. monocytogenes* の LmChiA と LmChiB は、本研究で用いた、一般的にキチナーゼ解析で用いられる人工基質 4NP-(GlcNAc)₂ よりも反応性は低いが、GalNAc β -1.4-GlcNAc- β -tetramethylrhodamine (LacdiNAc-TMR) を加水分解し、GalNAc β -1.4-GlcNAc と TMR を生産することが報告された。この LacdiNAc 構造は、ほ乳類グライコーム (glycome) の 1 つで、ほ乳類糖タンパク質の N 型糖鎖に見出され、無脊椎動物の糖質でもある。この結果は、LmChiA と LmChiB が *N*-acetyl-D-glucosamine のエピマーを認識することを示唆している。さらに、LmChiB は β -1, 6 結合を持つ LacNAc β -1.6-LacNAc- β -TMR

も加水分解する [10]. さらに, Paspaliari らは, LmChiB が (GlcNAc)₃ GlcNAc1A (GlcNAc1A: *N*-acetylglucosaminic acid) を加水分解することを明らかにしている [11]. これらの報告はとても興味深く, LmChiB と LinChi78 は広い範囲の基質に働きかけることを意味し, また, 加水分解する能力は低くとも, 上記のような糖質に結合できることも示唆している. キチンやキトサンは, ほ乳類にほぼ存在しないことから, LmChiA や LinChi35 も含めて, これらキチナーゼがキチンやキトサン以外の糖鎖もターゲットとして相互作用する可能性がある.

序論で述べたように, 大腸菌が生産するキチナーゼ EcChiA のキチン結合ドメイン (ChBD) は, キチナーゼ様タンパク質 (CHI3L1) と結合し, 細菌の細胞への接着を促進する [7]. また, *L. monocytogenes* のキチナーゼ LmChiB は, キチン質を持たないキイロタマホコリカビの感染初期の細菌の生存性に関与する [6]. LmChiB の ChBD がカビへの感染初期に必須であるかは明らかになっていないが, LmChiB や LinChi78 の ChBD が細菌の接着を促進する可能性も考えられる. LmChiB と LinChi78 は, 触媒ドメインとフィブロネクチン III 型様ドメイン (FnIII) の間に機能未知の領域を持つ (図 1-1). この領域は, リステリアキチナーゼ以外では, 病原性細菌 *Enterococcus* 属キチナーゼに見出される. その中でも *E. faecalis* はヒトなどのほ乳類の腸内に共生する病原性細菌の一種で [8], LinChi78 と LinChi35 のアミノ酸配列と同一性 54% と 68% を示す推定キチナーゼを保持する [1]. 現在の所, *E. faecalis* キチナーゼの機能は明らかになっていないが, 腸内に共生する細菌がこの機能未知の領域を持つのは興味深い. 大腸菌キチナーゼで報告されているように, 病原因子としての生体内でのキチナーゼの機能を知るために, 触媒ドメインだけではなく, ChBD や FnIII と機能未知領域などのドメインの解析も今後視野にに入れておく必要がある.

ここまで述べてきたように, 二つのリステリアキチナーゼは, 構造上でも, 作用機序でも, さらに多糖への結合能でも異なる性質を有していることが明らかになった. 病原因子として, 病原性細菌の宿主感染時に機能するキチナーゼの宿主上の標的は未解明であるが, 本研究で明らかになった両キチナーゼの基本特性が, キチン分解酵素全般に関する知見にとどまらず, 今後展開される病原因子キチナーゼの標的解明, そして病原性細菌の感染対策に貢献することが期待される.

参考文献

1. **Leisner JJ, Larsen MH, Ingmer H, Petersen BO, Duus JØ, Palcic MM** (2009) Cloning and comparison of phylogenetically related chitinases from *Listeria monocytogenes* EGD and *Enterococcus faecalis* V583. *J Appl Microbiol* 107: 2080-2087. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04420.x
2. **Chaudhuri S, Bruno JC, Alonzo F 3rd, Xayarath B, Cianciotto NP, Freitag NE** (2010) Contribution of chitinases to *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* 76: 7302-7305. doi: 10.1128/AEM.01338-10
3. **Chaudhuri S, Gantner BN, Ye RD, Cianciotto NP, Freitag NE** (2013) The *Listeria monocytogenes* ChiA chitinase enhances virulence through suppression of host innate immunity. *MBio* 4: e00617-12. doi:10.1128/mBio.00617-12
4. **Chatterjee SS, Hossain H, Otten S, Kuenne C, Kuchmina K, Machata S, Domann E, Chakraborty T, Hain T** (2006) Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 74: 1323-1338. doi: 10.1128/IAI.74.2.1323-1338.2006
5. **Vandal OH, Nathan CF, Ehrt S** (2009) Acid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 191: 4714-4721. doi: 10.1128/JB.00305-09.
6. **Frederiksen RF, Leisner JJ** (2015) Effects of *Listeria monocytogenes* EGD-e and *Salmonella enterica* ser. Typhimurium LT2 chitinases on intracellular survival in *Dictyostelium discoideum* and mammalian cell lines. *FEMS Microbiol Lett* 362. pii: fnv067. doi: 10.1093/femsle/fnv067
7. **Low D, Tran HT, Lee IA, Dreux N, Kamba A, Reinecker HC, Darfeuille-Michaud A, Barnich N, Mizoguchi E** (2013) Chitin-binding domains of *Escherichia coli* ChiA mediate interactions with intestinal epithelial cells in mice with colitis. *Gastroenterology* 145: 602-612. doi: 10.1053/j.gastro.2013.05.017
8. **Yuen GJ, Ausubel FM** (2014) *Enterococcus* infection biology: lessons from invertebrate host models. *J Microbiol.* 52: 200-10. doi: 10.1007/s12275-014-4011-6
9. **Tran HT, Barnich N, Mizoguchi E** (2011) Potential role of chitinases and chitin-binding proteins in host-microbial interactions during the development of intestinal inflammation. *Histol Histopathol* 26: 1453-1464.
10. **Frederiksen RF, Yoshimura Y, Storgaard BG, Paspaliari DK, Petersen BO, Chen K, Larsen T, Duus JØ, Ingmer H, Bovin NV, Westerlind U, Blixt O, Palcic MM, Leisner JJ** (2015) A diverse range of bacterial and eukaryotic chitinases hydrolyzes the LacNAc (gal β -(1 \rightarrow 4) GlcNAc) and LacdiNAc

- (GalNAc β -(1 \rightarrow 4) GlcNAc) motifs found on vertebrate and insect cells. *J Biol Chem* 290: 5354-5366. doi: 10.1074/jbc.M114.607291
11. **Paspaliari DK, Loose JS, Larsen MH, Vaaje-Kolstad G** (2015) *Listeria monocytogenes* has a functional chitinolytic system and an active lytic polysaccharide monooxygenase. *FEBS J* 282: 921-936. doi: 10.1111/febs.13191
 12. **Frederiksen RF, Paspaliari DK, Larsen T, Storgaard BG, Larsen MH, Ingmer H, Palcic MM, Leisner JJ** (2013) Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors. *Microbiology*. 159:833-847. doi: 10.1099/mic.0.051839-0
 13. **Asensio JL, Ardá A, Cañada FJ, Jiménez-Barbero J** (2013) Carbohydrate-aromatic interactions. *Acc Chem Res*. 46:946-954. doi: 10.1021/ar300024d
 14. **Horn SJ, Sørbotten A, Synstad B, Sikorski P, Sørlie M, Vårum KM, Eijsink VG** (2006) Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS J* 273: 491-503. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.05079.x

謝辞

本研究を遂行するにあたり、6年間熱心なご指導していただき、終始暖かく、真剣に見守って下さった小山文隆教授に心から感謝いたします。

この生命工学研究室に配属されてから、一から実験の操作や、研究に対する考え方をご指導していただき、ここまで育てていただいた、坂口政吉講師に心から感謝いたします。

日頃から、研究内容へのご指摘や研究機材の操作のご指導をいただき、惜しみないご協力を頂き、菅原康里準教授に心から感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、様々なご意見ご助言をいただき、論文を完成させることができました。川喜田正夫先生に深く感謝いたします。

本学位論文の副査を担当していただき、適切なご意見ご助言いただきました今村保忠教授、南雲紳史教授、澤村直哉早稲田大学準教授に深く感謝いたします。

私が研究室にいる間、共に研究を行い、様々なご指摘をくださった、大川一明、脇田悟誌をはじめ研究室の皆様、有難うございます。

最後になりましたが、いつも温かく見守り、経済的にも援助をしていただいた両親と祖父母に感謝いたします。