T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	好アルカリ性放線菌および高度好塩性古細菌由来GHファミリー18キチナーゼの解析
Title(English)	
著者(和文)	遠山絹華
Author(English)	Kinuka Toyama
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10818号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:中村 聡,丹治 保典,和地 正明,福居 俊昭,八波 利恵
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10818号, Conferred date:2018/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

好アルカリ性放線菌および高度好塩性古細菌由来 GH ファミリー 18 キチナーゼの解析

生物プロセス専攻　遠山 絹華

好アルカリ性放線菌 *Nocardiopsis* sp. F96 株の全ゲノム解析の結果、すでにクローニングと性質検討がなされている GH ファミリー 18 キチナーゼ ChiF1 の他に、さらに 3 つのホモログ (ChiF2、ChiF3 および ChiF4) が見出された。これら 4 つの酵素は、ドメイン構成や触媒ドメイン領域のアミノ酸配列が互いに異なる。特に ChiF3 は、キチン結合ドメイン (ChBD)、フィブロネクチンタイプ III 様ドメイン (FnIIID) そして GH ファミリー 18 に属する触媒ドメインから構成されるマルチドメイン酵素であり、触媒ドメイン内にはキチナーゼ付加ドメイン (CID) も存在する。本研究では、最も構成ドメイン数の多い ChiF3 に着目し、各種付加ドメインの機能解明を目的とした。すなわち、野生型 ChiF1、ChiF3 ならびに ChiF3 由来の各種付加ドメインを欠失・付加した変異型酵素の性質検討を行うこととした。

高度好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum* NRC-1 株のゲノム上に見出された GH ファミリー 18 キチナーゼ ChiN1 は、すでに類縁菌 *Haloarcula japonica* における高効率分泌発現と性質検討がなされている。組換え ChiN1 は 1.0 M NaCl に反応至適塩濃度をもち、1.0～5.0 M NaCl 存在下でも安定な耐塩酵素であった。タンパク質の耐塩性はその分子表面の酸性アミノ酸と Lys の数に関係するといわれている。本研究では、ChiN1 の分子表面に新たに酸性アミノ酸を導入する、もしくは分子表面に露出している Lys を除去することで、その耐塩性の向上を目指すこととした。また、高度好塩性古細菌由来の酵素は高塩濃度環境と同じく水分含量の低い有機溶媒中でも機能することが期待されるため、同時に有機溶媒耐性の向上も目指すこととした。

ChiF3 を調製し、その性質を ChiF1 と比較した。ChiF1 はアルカリ性域でも活性を有するが、酸性での活性が最も高かった。一方、ChiF3 はアルカリ性での活性が高く、その反応至適 pH は pH 8.5 と、既報の放線菌由来キチナーゼの中で最も高かった。また、ChiF1 および ChiF3 の不溶性キチン結合率は、それぞれ 33.8% および 83.7% であり、ChiF3 の方が高値を示した。さらに、ChiF1 は可溶性キチンを好んで加水分解し、ChiF3 は不溶性キチンを好んで加水分解することがわかった。両酵素のこれらの性質の違いは、主として ChBD の有無に関係があると推察された。

ChiF3 の ChBD-FnIIID 領域を欠失した変異型酵素 ChiF3(CatD)、ならびに

ChiF1 に付加した変異型酵素 BFChiF1 を調製し、野生型 ChiF1 および ChiF3 との詳細な性質比較を行った。ChBD-FnIIID 領域をもつ酵素 (BFChiF1 および ChiF3) はもたない酵素 [ChiF3(CatD) および ChiF1] に比して、アルカリ性領域での相対活性が高まる一方、酸性領域での相対活性が低下した。また、ChBD-FnIIID 領域をもつ酵素は不溶性キチン結合能が極めて高かった。さらに、ChBD-FnIIID 領域をもつ酵素は不溶性キチンを好んで加水分解し、もたない酵素は可溶性キチンを好んで加水分解することが示された。

ChiF3 の CID 領域を ChiF1 に挿入した変異型酵素 ChiF1CID を調製し、野生型 ChiF1 との詳細な性質比較を行った。$(GlcNAc)_6$ を基質とした場合、ChiF1CID の反応産物として 3 糖が生成しにくくなっていた。このことから、ChiF1CID においては、CID の挿入によりエキソ型の切断様式が強まったと考えられた。

ChiN1 触媒ドメイン領域の立体構造モデルに基づき、分子表面に酸性アミノ酸を導入した各種変異型 ChiN1、ならびに分子表面に存在する Lys を除去した各種変異型 ChiN1 を調製し、耐塩性ならびに有機溶媒耐性との関連を調べた。

いずれの変異型 ChiN1 も野生型 ChiN1 と同程度または 1/2 から 2/3 程度の比活性を有していた。また、各種変異型 ChiN1 の反応 NaCl 濃度依存性および安定性を調べた結果、変異型酵素 N357D のみ野生型と違いがみられ、高塩濃度下での相対活性の向上と 1.0 M NaCl 存在下での安定性の減少が観察された。キチン加水分解における DMSO の添加効果を調べたところ、一部の変異型 ChiN1 において、20% DMSO 添加時に野生型 ChiN1 に比して大幅な活性向上が認められた。

以上より、本研究において ChiN1 に導入したアミノ酸置換は反応 NaCl 濃度依存性および NaCl 濃度安定性よりも、DMSO 存在下における活性向上に有効であることが示唆された。すなわち、耐塩性と有機溶媒 (DMSO) 耐性とは、相関しないことが明らかとなった。