

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)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻：	生物プロセス	専攻	申請学位（専攻分野）：	博士	（ 工学 ）
Department of			Academic Degree Requested	Doctor of	
学生氏名：	遠山 絹華		指導教員（主）：	中村 聡	教授
Student's Name			Academic Supervisor(main)		
			指導教員（副）：		
			Academic Supervisor (sub)		

要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

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、関連しないことが明らかとなった。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻：	生物プロセス	専攻	申請学位(専攻分野)：	博士	(工学)
Department of			Academic Degree Requested	Doctor of	
学生氏名：	遠山 絹華		指導教員(主)：	中村 聡	
Student's Name			Academic Supervisor(main)		
			指導教員(副)：		
			Academic Supervisor(sub)		

要旨(英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Chitin is a β -1,4-linked polysaccharide composed of *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) units in a linear form. Chitinases hydrolyze β -1,4 glycosidic bonds of chitin.

Alkaliphilic actinomycete *Nocardioopsis* sp. strain F96 has been found to produce a chitinase (ChiF1). The nucleotide sequence of cloned *chiF1* gene revealed that ChiF1 had a single domain structure composed of a GH18 catalytic domain (without CID). The recombinant ChiF1 was expressed in *Escherichia coli* and characterized. Recently, the genome sequencing of strain F96 was completed. And three other GH18 chitinase gene homologs (*chiF2*, *chiF3* and *chiF4*) were found. Especially, mature ChiF3 is composed of three domains, CBM2 chitin binding domain, fibronectin typeIII-like domain and GH18 catalytic domain (including CID). It is the most various domain components among the four GH18 chitinases. In this study, to clarify functions of various domains in ChiF3, some mutants were characterized and compared with wildtype ChiF1 and ChiF3.

The mutants which is deleted ChBD-FnIIID from ChiF3 [ChiF3(CatD)] and which is added ChBD-FnIIID to ChiF1 (BFChiF1) were characterized and compared with ChiF1 and ChiF3. From pH profiles, the relative activities of BFChiF1 and ChiF3 in alkaline condition were higher than that of ChiF3(CatD) and ChiF1, while the relative activities of BFChiF1 and ChiF3 in acidic condition were lower. Insoluble chitin binding rates of BFChiF1 and ChiF3 were greatly higher than that of ChiF3(CatD) and ChiF1. The ratio of specific activities toward insoluble and soluble substrates [Insoluble/Soluble] were calculated. The ratio of ChiF3 was 15.2 times higher than ChiF1, while ChiF3(CatD) has no activity toward insoluble chitin. However, the ratio of BFChiF1 was 6.4 times higher than ChiF1. From these results, the differences in these characteristics of chitinases were mainly dependent on the existence or absence of ChBD-FnIIID.

The mutant which is inserted CID from ChiF3 into ChiF1 (ChiF1CID) was compared with ChiF1. The reaction products of chitinases were analyzed by TLC. From GlcNAc-oligomer spots on TLC, the amount of 3mer produced by ChiF1CID was decreased compared with ChiF1. It indicates that ChiF1CID has exo-type degradation pattern because 3mer is only produced by endo-type degradation.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).