学位論文審査結果の報告書

氏　　名	新家　粧子
生年月日	(昭和)・平成　62 年　12 月　13日
本籍（国籍）	和歌山県
学位の種類	博　士（　農　学　）
学位記番号	農　第 201 号
学位授与の条件 （博士の学位）	学位規程第５条該当
論文題目	Ligand-binding studies on chitinolytic enzymes by nuclear magnetic resonance spectroscopy （核磁気共鳴法を用いたキチン質分解酵素のリガンド結合に関する研究）

審査委員

（主　査）	深溝　慶	印
（副主査）	内海　龍太郎	
（副主査）	北山　隆	
（副　査）		印
（副　査）		印

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質の構造生物学的研究において，X線結晶構造解析により得られるデータは，立体構造情報とともに分子間相互作用など，非常に有用な知見をもたらす．しかしながら，中には結晶化が困難なタンパク質もあり，標的化合物との複合体結晶を得ることが困難な場合もある．X線結晶構造解析と相補的に用いられる核磁気共鳴(NMR)法では，タンパク質中で容易に検出できる^{1}Hシグナルを追跡することによって，リガンドの結合や変性などに伴う微細な構造変化を原子レベルで鋭敏にとらえることができ，さらには，溶液中での立体構造情報をも得ることができる．

一方，キチン系バイオマスの有効利用のために注目されているキチン質加水分解酵素，キチナーゼやキトサナーゼについては，基質との複合体構造に関する知見が得られておらず，相互作用機構の解明が遅れていた．本論文では，これらキチナーゼとキトサナーゼについて，NMR を用いた基質との相互作用解析により，それらのメカニズムに関する新たな知見を得ることに成功したので，以下に要約する．

(1) コケ由来キチナーゼのキチンオリゴ糖結合様式

キチナーゼは，キチンのβ-1,4-結合を加水分解する酵素であり，そのアミノ酸配列相同性に基づいて，2 つの糖質加水分解酵素ファミリーGH18 と GH19 に分類されている．GH18 キチナーゼにおいては，基質あるいは阻害剤との複合体の結晶構造解析によりそれらの酵素反応機構について詳細な研究が行われてきた．しかし，GH19 キチナーゼにおいては，基質との複合体結晶構造が明らかになっておらず，また，有効な阻害剤が見出されていなかったことから，触媒反応機構に関する理解は比較的遅れていた．

まず，比較的分子量が低いコケ由来キチナーゼ(BcChi-A)を用いて，キチンオリゴ糖[$(GlcNAc)_n$]との溶液状態での結合性を調べた．通常の方法に従って安定同位体ラベルを行い，^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを測定したところ，シグナルの分離状態は良好であり，ほぼ全ての主鎖シグナルについて帰属することができた．BcChi-A に対して $(GlcNAc)_2$ を滴定した結果，基質結合クレフト中のサブサイト-2 と-1 近傍に存在するアミノ酸残基のシグナルに明確な化学シフト変化が観測され，$(GlcNAc)_2$ はこれらのサブサイトに結合することが明らかになった．さらに興味深いことに，BcChi-A の基質結合クレフトの裏側にあたる領域にも，$(GlcNAc)_2$ 結合によるシグナルの化学シフト変化がみられ，BcChi-A が基質と結合する際に，タンパク質構造全体で基質を挟み込むようなコンフォメーション変化が起こることが示唆された．

(2) コケ由来キチナーゼの *N*-アセチルキトビオシルモラノリン結合様式

次に，リゾチームの新規阻害剤として見出された *N*-アセチルキトビオシルモラノリン[$(GlcNAc)_2$-M]について，リゾチームと類似したフォールドを有する BcChi-A に対する溶液中での結合様式およびその阻害活性について調べた．

(1)の章で得られた同位体ラベル BcChi-A を用いて, NMR による$(GlcNAc)_2$-M の滴定実験を行った結果, 基質結合クレフト中に存在するいくつかのアミノ酸残基に対応するシグナルの線幅が広がり検出が不可能になった. BcChi-A が$(GlcNAc)_2$-M と強く結合し, これらアミノ酸残基の動的状態を変化させていることが示された. また, 結合による影響がみられたアミノ酸残基は, サブサイト-2, -1 に加え, サブサイト+1 にもおよんでおり, $(GlcNAc)_2$-M はサブサイト-2 から+1 へ結合し, モラノリン残基は活性中心からずれて, サブサイト+1 に位置することがわかった. このような結合様式が, $(GlcNAc)_2$-M の BcChi-A に対する阻害力を弱めているものと考えられた. (IC_{50}= 620 μM)

(3) *Paenibacillus* キトサナーゼで初めて見出されたキトサン結合モジュールの結合特性

糖質加水分解酵素のなかには, 触媒モジュールに加え, 触媒活性をもたない糖質結合モジュール(CBM)を有するものがある. これらの CBM は, 糖質と結合し触媒モジュールを基質へと誘導することにより, 酵素活性を補助するものと考えられている. 近年, 土壌細菌である *Paenibacillus* sp. IK-5 が分泌するキトサナーゼが, 糖質加水分解酵素ファミリー8 に分類される触媒モジュールの N 末端側に, 2 つの CBM (DD1 および DD2)をもつことが明らかになった. 本章では, DD1 および DD2 について, NMR 法を用いた糖との結合実験を行い, リガンド特異性およびキトサンオリゴ糖との結合性について明らかにすることを試みた.

まず, 同位体ラベルを施した DD1 と DD2 を作製し, 得られた試料の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルのシグナル帰属を行った. DD1 と DD2 ともに 92 %の主鎖シグナルを帰属することができた. 次に, キトサンオリゴ糖, セロオリゴ糖, およびラミナリオリゴ糖の NMR 滴定実験を行った結果, DD1 はキトサンに対して高い特異性を示すことが明らかになった. 一方, DD2 はこれら 3 種のオリゴ糖全てに対して結合性を示し, 幅広い特異性を有しているものと考えられた. また, 等温滴定型熱量計(ITC)を用いて DD1 および DD2 とキトサンオリゴ糖との結合力を測定した結果, DD1 は明らかに DD2 よりも強くキトサンと結合することがわかった. NMR 滴定実験で得られた基質結合力と ITC で得られた基質結合力はほぼ一致しており, これらのデータが信頼性の高いものであると考えられた.

(4)キトサン結合モジュール DD1 および DD2 の溶液構造

本章では, DD1 と DD2 の NMR 溶液構造解析を行い, 得られた構造に基づいて, リガンド結合に重要なアミノ酸残基を特定することを試みた.

DD1 と DD2 それぞれにおいて, ^{15}N-edited NOESY, ^{13}C-edited NOESY, HCCH-TOCSY, および CCH-TOCSY などのスペクトルを解析し, それぞれ 792 と 780 個の NOE 情報を得た. さらに主鎖シグナルに基づいて二面角情報を得た後, CYANA によって溶液構造の計算を行った. その結果, DD1 および DD2 ともに, 2 枚のβ-シートからなるβ-サンドウィッチ構造を有し, その上部に突き出すよ

うにフレキシブルないくつかのループ構造をもつことがわかった. さらにNMR滴定実験の結果より, DD1とDD2ともに, βコア構造の上部のループ領域にキトサンオリゴ糖が結合することが明らかになった. DD1とDD2の結合部位の比較を行ったところ, DD1の36番目のグルタミン酸残基がDD2ではチロシン残基に置換されていることがわかった. そこで, DD1のGlu36をTyrへ(DD1-E36Y), DD2のTyr36をGluへ(DD2-Y36E)と変異導入を行い, 各変異体についてNMRとITCを用いたキトサン4糖の結合実験の結果を行った. その結果, DD1ではGlu36のチロシンへの変異が親和性大きく低下させ, また, DD2のTyr36のグルタミン酸への変異が親和性の増大をもたらした.

以上のように, 部位特異的変異によってCBMのリガンド特異性のコントロールが可能であることが示唆された. また, このような特異性のコントロールによりキチナーゼおよびキトサナーゼに新たな機能を付加させることが可能となり, さらにはキチン系バイオマスの効果的な分解を促進するものと考えられる.

論 文 審 査 結 果の 要 旨

新家粧子氏による本論文は、バイオマス変換利用においてまだ未開拓の領域であるキチンキトサンを分解する酵素群に関して、高分解能NMRを用いた研究を展開し、X線結晶構造解析に匹敵する構造データを得、さらにはこれらの酵素反応のメカニズムに関しても新規の情報を得ている。以下にその要旨を示す。

キチナーゼは，キチンのβ-1,4-結合を加水分解する酵素であり，そのアミノ酸配列相同性に基づいて，2 つの糖質加水分解酵素ファミリーGH18 と GH19 に分類されている．GH18 キチナーゼについては，酵素反応機構について詳細な研究が行われてきたが，GH19 キチナーゼにおいては，基質との複合体結晶構造が明らかになっておらず，触媒反応機構に関する理解が比較的遅れていた．そこで，比較的分子量が低いコケ由来 GH19 キチナーゼ(BcChi-A)を用いて，キチンオリゴ糖[$(GlcNAc)_n$]との溶液状態での結合性を調べた．通常の方法に従って安定同位体ラベルを行い，^1H-^{15}N HSQC スペクトルを測定し，ほぼ全ての主鎖シグナルについて帰属した．BcChi-A に対して $(GlcNAc)_2$ を滴定した結果，基質結合クレフト中のサブサイト-2 と-1 近傍に存在するアミノ酸残基のシグナルに明確な化学シフト変化が観測され，$(GlcNAc)_2$ はこれらのサブサイトに結合することが明らかになった．さらに，BcChi-A の結合クレフトの裏側にも，$(GlcNAc)_2$ 結合による影響がみられ，BcChi-A が基質と結合する際に，タンパク質構造全体で基質を挟み込むようなコンフォメーション変化が起こることが示唆された．

次に，リゾチームの新規阻害剤として見出された *N*-アセチルキトビオシルモラノリン[$(GlcNAc)_2$-M]について，リゾチームと類似したフォールドを有する BcChi-A に対する溶液中での結合様式およびその阻害活性について調べた．NMR による$(GlcNAc)_2$-M の滴定実験を行った結果，基質結合クレフト中に存在するいくつかのアミノ酸残基に対応するシグナルの線幅が広がり検出が不可能になった．このことから，BcChi-A が$(GlcNAc)_2$-M と強く結合し，これらアミノ酸残基の動的状態を変化させていることが示された．また，結合による影響は，サブサイト-2 と-1 に加え，サブサイト+1 にもおよんでおり，$(GlcNAc)_2$-M はサブサイト-2 から+1 へ結合し，モラノリン残基は活性中心からずれて，サブサイト+1 に位置することがわかった．このような結合様式が，$(GlcNAc)_2$-M の BcChi-A に対する阻害力を弱めているものと考えられた．(IC_{50}= 620 μM)

土壌細菌 *Paenibacillus* sp. IK-5 が分泌するキトサナーゼが有する 2 つの糖質結合モジュール，CBM (DD1 および DD2)について，NMR 法を用いた糖との結合実験を行い，リガンド特異性およびキトサンオリゴ糖[$(GlcN)_n$]との結合性を明らかにした．まず，同位体ラベルを施した DD1 と DD2 を作製し，^1H-^{15}N HSQC スペクトルのシグナル帰属を行った．次に，$(GlcN)_n$，セロオリゴ糖，およびラミナリオリゴ糖の NMR 滴定実験を行った結果，DD1 は$(GlcN)_n$に対して高い特異性を示す一方，

DD2 はこれら 3 種のオリゴ糖全てに対して幅広い特異性を示した. また, 等温滴定型熱量計(ITC)を用いて DD1 および DD2 と$(GlcN)_n$との結合力を測定した結果, DD1 は明らかに DD2 よりも強く$(GlcN)_n$と結合することがわかった. つぎに, DD1 と DD2 のリガンド結合部位を明らかにするため, NMR 溶液構造解析を行った. それぞれにおいて, ^{15}N-edited NOESY, ^{13}C-edited NOESY, HCCH-TOCSY, および CCH-TOCSY などのスペクトルを解析し, NOE 情報および二面角情報を得た後, CYANA によって溶液構造の計算を行った. その結果, DD1 と DD2 ともに, 2 枚のβ-シートからなるβ-サンドウィッチ構造を有し, その上下に突き出すようにフレキシブルないくつかのループ構造をもつことがわかった. さらに NMR 滴定実験の結果より, βコア構造の上部のループ領域にキトサンオリゴ糖が結合することが明らかになった. DD1 と DD2 の結合部位の比較を行ったところ, DD1 の 36 番目のグルタミン酸残基が DD2 ではチロシン残基に置換されていることがわかった. そこで, DD1 の Glu36 を Tyr へ(DD1-E36Y), DD2 の Tyr36 を Glu へ(DD2-Y36E)と変異導入を行い, 各変異体について NMR と ITC を用いた$(GlcN)_4$の結合実験の結果を行った. その結果, DD1 では Glu36 のチロシンへの変異が親和性を大きく低下させ, また, DD2 の Tyr36 のグルタミン酸への変異が親和性の増大をもたらした.

以上、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および博士論文公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成27年2月7日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。