

2017 年 2 月 24 日

論文審査要旨

化学応用学専攻 主査 小山文隆
副査 今村保忠
南雲紳史
澤村直哉

化学応用学専攻博士課程 3 年の本田翔太郎氏より申請のあった学位請求論文「細菌 *Listeria innocua* キチナーゼの発現と機能に関する解析」に対し、2017 年 2 月 16 日に、主査 小山文隆、副査 今村保忠、南雲紳史、澤村直哉（早稲田大学）出席のもと、公開発表会を行った。本田氏より、口頭の発表があり、その後質疑を行った。

本学位論文での研究対象は、非病原性細菌 *Listeria innocua* のキチナーゼ様遺伝子の翻訳産物 (LinChi78 と LinChi35) である。同じリステリア属の病原性細菌である *Listeria monocytogenes* の病原性に関与するキチナーゼが二つ報告されており、これらのタンパク質は、類似したアミノ酸配列を持つ。リステリア属の細菌の病原性におけるキチナーゼの機能的役割の理解のため、本学位論文では、病原性細菌 (*L. monocytogenes*) と非病原性細菌 (*L. innocua*) が共通して保有する二つのキチナーゼの詳細な特性解析が行われている。本田氏は、*L. innocua* の二つのキチナーゼをコードすると推定される遺伝子を組換えタンパク質として大腸菌で発現させ、それぞれがキチン分解活性を有し、キチナーゼであると同定した。さらに、酵素化学的性質や作用機序を解析し、構造、作用機序、そして多糖への結合でも異なる性質を持つことを明らかにしている。

論文は全 5 章で構成されている。序章は研究の背景で、キチン、キチナーゼ、キチナーゼの作用機序、細菌由来のキチナーゼの機能、そして、本研究の目的が述べられている。

第 I 章は、*L. innocua* から取得した染色体 DNA を大腸菌で発現し、精製し、その酵素化学的性質についてまとめている。本田氏は、この精製した組換えタンパク質 LinChi78 と LinChi35 が、キチン分解活性を有し、それぞれキチナーゼであることを同定している。さらに、人工基質に対し、LinChi78 と LinChi35 の pH 依存性などの酵素化学的性質が異なることを示した。

第 II 章は、コロイダルキチンとキチンオリゴ糖に対する作用機序についてまとめている。LinChi78 と LinChi35 によるコロイダルキチンとキチンオリゴ糖の加水分解産物を同定し、得られた分解産物の組成からキチナーゼの作用機序を示した。LinChi78 は、糖鎖の末端側から二量体単位で加水分解を行うエキソ型の分解様式を持ち、基質から離れずに再度分解反応を行うプロセッシブ型の分解様式を持つことを示した。他方、LinChi35 は不特定な箇所から反応が開始されるエンド型分解様式を持ち、加水分解後、酵素から遊離し再度結合し分解反応を行うノンプロセッシブ型であることを示した。

第 III 章では、LinChi78 と LinChi35 の多糖との結合能力について、他の細菌由来キチナーゼとの比較と共にまとめている。非結晶性多糖に対する結合能は、Carbohydrate-Binding Module (CBM) 5 を持つ LinChi78 のみならず、触媒ドメインのみの LinChi35 も高い結合能を有し、触媒ドメインのみでも多糖基質に結合することが可能であることを明らかにした。さらに、LinChi78 の結晶性多糖への結合特性を明らかにするため、異なる CBM を持つ *Bacillus thuringiensis* 由来キチナーゼ (BthChi74) を組換えタンパク質として発現し、結合能を比較し、CBM ファミリーの違いで結合能が異なることを示した。

第 IV 章は、総合考察で、本研究の意義をまとめている。本論文で、非病原性細菌 *L. innocua* 由来のキチナーゼ LinChi78 と LinChi35 の機能について調べてきた。*L. innocua* 由来キチナーゼの機能に違いがあり、CBM の有無、そしてその CBM ファミリーの違いにより、多糖に対する結合能力に違いがあることを示した。非病原性細菌 *L. innocua* 由来キチナーゼ LinChi78 と LinChi35 の酵素化学的基本特性の解明が、配列同一性が高い病原性細菌 *L. monocytogenes* 由来キチナーゼの病原因子としての理解に貢献することを意味する。

以上をまとめると、本田氏は、非病原性細菌 *Listeria innocua* のキチナーゼ様遺伝子を大腸菌で発現し、キチナーゼと同定した。そして詳細な酵素化学的解析を行い、それぞれの構造と機能が異なることを示した。今後展開される病原性細菌 *L. monocytogenes* のキチナーゼの標的解明、そしてその感染対策に貢献することが期待される。

本学位論文は、LinChi78 と LinChi35 の構造と機能について述べたものであり、キチン分解酵素に関する知見を与え、病原性細菌キチナーゼの標的解明につながるものである。以上のことから、本論文は博士（工学）の学位請求論文として充分価値があり、合格と判断できる。

博士学位論文概要書

細菌*Listeria innocua*キチナーゼの
発現と機能に関する解析

工学研究科 化学応用学専攻 博士後期課程
生命工学研究室

学籍番号 BD14003

氏名 本田 翔太郎

指導教員 小山文隆 教授

目次

序論	1
第 I 章 <i>L. innocua</i> キチナーゼ様遺伝子の発現と精製, および酵素化学的性質の比較	2
第 II 章 LinChi78 と LinChi35 の多糖, オリゴ糖に対する作用機序.....	3
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の比較	4
第 IV 章 総合考察	5

序論

キチンとは *N*-acetyl-D-glucosamine が β -1,4 グリコシド結合をした多糖で、自然界で 2 番目に多いバイオマスである。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、細菌、カビ、植物、昆虫、そしてほ乳類などの幅広い生物のゲノム上に存在していることが報告されている。Carbohydrate-Active enZYmes Database (CAZY) 上で、一次構造や推定される立体構造の違いから、キチナーゼは Glycoside hydrolases family (GH) 18 と GH19 に分類される。GH18 キチナーゼは様々な生物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ゲノム上でのみで見出されている。GH18 キチナーゼには、 $(\beta/\alpha)_8$ バレル (トリオースリン酸イソメラーゼバレル) 構造の触媒ドメインと、キチン結合ドメイン (ChBD) やフィブロネクチン III 型様ドメイン (FNIII) などの複数のドメインを持つことが知られている。

上述したように、キチナーゼは様々な生物が生産しているが、その中でも細菌由来のキチナーゼは、炭素源や窒素源をキチンから取得する為に生産されている。一方で、宿主への感染や、様々な人の疾患にも関与する報告があり、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する。

リステリア属の細菌は、幅広い環境に分布している通性嫌気性グラム陽性の真正細菌であり、ヒトに感染するとリステリア症を引き起こす。リステリア症を引き起こす病原菌 *Listeria monocytogenes* が生産するキチナーゼは、その病原性に関与することが報告されている。*Listeria monocytogenes* は、LmChiA (*lmo1883* 遺伝子産物) と LmChiB (*lmo0105* 遺伝子産物) という二つのキチナーゼを生産する。両酵素共にキチンキチンまたはキチンオリゴマーの加水分解に関与し、特に LmChiA は病原性を高め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が報告されている。一方、LmChiB は、感染初期に役割を持つ

ことが提案されている。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。

Bacillus thuringiensis は微生物殺虫剤として知られ、内毒素である Cry タンパク質を生産する。この 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。近年、キチナーゼが中腸の上皮細胞を覆う、キチン質のペリトロフィック膜に孔を形成し、Cry タンパク質の上皮細胞へ浸潤を促進し、毒性を向上させることが報告されている。

L. innocua は非溶血性および非病原性細菌で、*L. innocua* と *L. monocytogenes* は共通の祖先から進化し、病原性の差異は *L. innocua* の病原性遺伝子の欠失に起因している。*L. innocua* のキチナーゼ様遺伝子の *lin0153* と *lin1996* は *L. monocytogenes* の二種のキチナーゼ遺伝子 *lmo0105*, *lmo1883* とそれぞれ 99%, 97% の高い同一性を示す。リステリア属の詳細な酵素化学的性質の解析は、リステリア属細菌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必要と考え、非病原性細菌 *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、人工基質や天然基質を用い、遺伝子産物の酵素化学的性質、作用機序、そして多糖への結合能力を解析した。

第 I 章 *L. innocua* キチナーゼ様遺伝子の発現と精製、および酵素化学的性質の比較

lin0153 遺伝子産物 (LinChi78) は推定分子量 78 kDa のタンパク質で、アミノ酸配列を基にしたドメイン予測により、GH18 触媒ドメイン、FNIII と ChBD の計 3 つのドメインで構成されることが推定された。一方、*lin1996* 遺伝子産物

(LinChi35) は推定分子量 35 kDa のタンパク質で、GH18 触媒ドメインのみで構成されることが推定された。そこで、このサイズの異なる二つのキチナーゼの機能を明らかにするために、非病原性細菌 *L. innocua* から染色体 DNA を抽出した。これを鋳型として、それぞれ二種のプライマーを用いて PCR 法でそれぞれの遺伝子を増幅した。得られた二種のキチナーゼ様遺伝子を、大腸菌を宿主として発現させた。LinChi78, LinChi35 共に可溶性タンパク質として取得できた。キチナーゼの活性検出に用いられる人工基質 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside [4NP-(GlcNAc)₂] や天然基質 コロイダルキチンを用いて加水分解活性を調べたところ、LinChi78 と LinChi35 は人工基質や天然基質に対しキチン分解活性を有していたことから、キチナーゼと同定した。また、pH 依存性と温度依存性を調べたところ、LinChi78 と LinChi35 はそれぞれ中性または酸性条件下、50 °C で最大の活性を示した。pH や温度に対する安定性では両酵素共に広い範囲の pH に安定性を持ち、40 °C までの熱安定性を示した。速度論解析より、LinChi78 は 4NP- (GlcNAc)₂ に対する K_M 値は 127 μ M, k_{cat} 値は 10.4 s⁻¹ を示した。一方、LinChi35 の k_{cat} 値および K_M 値は、51.1 s⁻¹ と 885 μ M を示し、LinChi78 より高い値であった。これらの結果から、両酵素の pH 依存性や人工基質に対する反応性が異なることが明らかになった。

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

GH18 キチナーゼは、エキソ型もしくはエンド型とプロセッシブ型もしくはノンプロセッシブ型の分解様式を組み合わせた分解様式を持つ。この章では多糖やオリゴ糖を基質として加水分解反応を行い、その生産物の組成からキチナーゼの作用機序を決定した。また、キチンオリゴ糖の分解産物のアノマーを分析することにより、酵素の反応開始点を決定した。

天然基質であるコロイダルキチンを分解した場合、両酵素は主に二量体を生

産したが、LinChi35 の生産物には微量ながらも三量体と四量体が検出された。両酵素の生産物の組成から LinChi78 はエキソ型、LinChi35 はエンド型の分解様式を持つことが示唆された。それぞれ推定した分解様式は、既知のエキソ形やエンド型のキチナーゼとの一次構造比較からも支持される。次に、六量体から三量体までのキチンオリゴ糖を基質とした際の生産物の組成から、LinChi78 と LinChi35 はそれぞれプロセッシブ型、ノンプロセッシブ型の分解様式を示した。最後に分解産物のアノマーを分析した結果、両酵素共はアノマー保持酵素で、キチンオリゴ糖の非還元末端から加水分解反応が開始されることが明らかになった。

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の比較

LinChi78 は GH18 触媒ドメイン、FNIII と ChBD で構成され、LinChi35 は GH18 触媒ドメインのみである。そこで、両酵素の各種多糖に対する結合能力を調べた。

比較対象酵素の *B. thuringiensis* 由来キチナーゼ (BthChi74) のドメイン構成は GH18 触媒ドメイン、FNIII、ChBD であり、LinChi78 と類似している。しかし、LinChi78 と BthChi74 の ChBD は異なる Carbohydrate-Binding Module family (CBM) に分類され、LinChi78 の ChBD は CBM5 に対し、BthChi74 の ChBD は CBM2 である。種々の多糖基質 (キチンビーズ、 α -キチン、セルロース) に対する結合能力を解析した結果、LinChi78 は高い割合でキチンビーズに結合し、 α -キチン、セルロースにも結合した。触媒ドメインのみの LinChi35 は、LinChi78 と比べ、キチンビーズにはほぼ同等の割合で結合したが、 α -キチン、セルロースに対する結合能は低かった。つまり、触媒ドメインはキチンビーズなど多糖に結合することができるが、結晶性多糖への結合には FNIII か ChBD、もしくはその両方が

必要であることを示唆した。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同等の割合で結合した。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、 α -キチンおよびセルロースに対し、LinChi78 よりも高い結合能を示した。既知の立体構造上、CBM5 は三重逆平行 β シートで折りたたまれており、その狭い領域に基質の結合に関与する 2 つの Trp 残基が位置している。LinChi78 の CBM5 のアミノ酸配列上にもこの 2 つの Trp 残基が保存されている。CBM2 は、4 本鎖の β シート 2 つからなる β サンドイッチ構造で、平坦な表面の広い領域に基質結合に関与する 3 つの Trp 残基を持ち、BthChi74 にも 3 つの Trp が保存されている。この CBM 上の基質との相互作用に関与する Trp 残基の数と CBM の表面構造の違いにより多糖に対する結合能力が異なることが示唆された。

第 IV 章 総合考察

ヒトリステリア症の病原性に関与する *L. monocytogenes* 由来キチナーゼと 97% 以上の同一性を持つ、非病原性細菌 *L. innocua* 由来二種のキチナーゼ (LinChi78 と LinChi35) を大腸菌中で可溶性タンパク質として発現させ、得られたキチナーゼの機能を解析した。酵素化学的性質を調べた結果、LinChi78 は 50 °C、中性条件下で最大の活性を示す、エキソ型プロセッシブ型キチナーゼであった。一方、LinChi35 は 50 °C、酸性条件下で最大の活性を示す、エンド型ノンプロセッシブ型キチナーゼであることを明らかにした。これらの結果から、二つの *L. innocua* 由来キチナーゼの機能に違いがあることを明らかにした。また、キチン結合ドメイン (CBM) の有無、そしてファミリーの違いにより、多糖に対する結合能力に違いがあることを示した。最後に、本研究で得られた、LmChiA と LmChiB ととても高い同一性を持つ LinChi35 と LinChi78 の基本特性は、これからのリステリアキチナーゼや関連する糖質分解酵素の理解に貢献すると考えて

いる。

Characterization of two *Listeria innocua* chitinases that expressed in *Escherichia coli*

Shotaro Honda

Biotechnology Laboratory, Graduate School of Engineering, Kogakuin University

Chitinases (EC 3.2.1.14) are glycosyl hydrolases that catalyze the hydrolysis of the β -1,4-linkages in chitin. Bacterial chitinases play important roles in infectious disease as pathogens. Two chitinase, LmChiA and LmChiB, from the pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes* were reported to be involved in pathogenesis in non-chitinous organisms. *Listeria innocua*, a nonpathogenic bacterium, also has two putative chitinase genes, *lin0153* and *lin1996*, which are close homologs of *L. monocytogenes* chitinase genes. To further understand the functional roles of *Listeria* chitinase, detailed characterization of the putative *L. innocua* chitinase genes was conducted. Two putative chitinase genes from *L. innocua* were successfully expressed in *Escherichia coli*, and were purified. The *lin0153* gene product, LinChi78, and the *lin1996* gene product, LinChi35, exhibited hydrolytic activity toward artificial and natural substrates, indicating that LinChi78 and LinChi35 behaved as chitinases of *L. innocua*. LinChi78 and LinChi35 displayed optimum catalytic activity under neutral and weak acidic conditions at 50 °C, respectively, and were stable over a broad pH and temperature range. LinChi35 showed higher k_{cat} and K_{M} values for 4NP-(GlcNAc)₂ than LinChi78. Degradation products from colloidal chitin and chitin oligosaccharides, (GlcNAc)₃₋₆, by each enzyme suggested that LinChi78 and LinChi35 could hydrolyze oligomeric substrates in a processive exo- and non-processive endo manner, respectively. The binding assays between chitinases and chitin bead, α -chitin or cellulose suggested that both chitinases could bind to non-crystalline chitin beads, but LinChi35 showed lower binding ability to crystalline α -chitin and cellulose than LinChi78. In addition, comparative analysis about binding abilities with other bacterial chitinase suggested that carbohydrate binding modules (CBMs) were involved in binding to crystalline polysaccharides. These findings will be compared with those of other related chitinases and will contribute to extending the understanding on *Listeria* chitinases and related enzymes.