

## 高度好塩性古細菌由来キチナーゼの耐塩機構の解明および耐塩性のさらなる向上

中村 聡, 八波 利恵

東京工業大学大学院生命理工学研究科

**概要** キチンは *N*-アセチル-D-グルコサミンが  $\beta$ -1,4 グリコシド結合で直鎖状に連なった多糖であり、その結合を加水分解する酵素がキチナーゼである。近年、高度好塩性古細菌 *Halobacterium* sp. NRC-1 株の全ゲノム解析が終了し、キチナーゼホモログ (ChiN1 と命名) をコードする ORF の存在が明らかとなった。これまでに高度好塩性古細菌が生産するキチナーゼの報告はなく、この ORF がコードするキチナーゼの実体も明らかではなかった。既知のキチナーゼとのアミノ酸配列比較により、ChiN1 はマルチドメイン酵素であり、*N* 末端側からキチン結合ドメイン、Polycystic kidney disease I ドメインおよび GH ファミリー 18 触媒ドメインの3つのドメインからなることが示唆された。一方、高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* TR-1 株の細胞表層には多量の糖タンパク質 (CSG) が存在する。これまでに、*csg* 遺伝子プロモーターを利用した *chiN1* 遺伝子の *Ha. japonica* における高効率分泌発現に成功し、組換え ChiN1 が高い耐塩性を有することを示す予備的結果を得ている。タンパク質の耐塩性はその表面に存在する酸性アミノ酸の数に関連しているといわれている。すなわち、分子表面の酸性アミノ酸が溶媒の水分子を強固に保持することで、塩析から逃がれていると考えられる。このように、耐塩タンパク質は水分含量の低い高塩濃度環境においても機能発現することから、有機溶媒中での利用も考えられる。本研究では、組換え ChiN1 の詳細な性質検討を行い、有機溶媒中での利用を模索した。また、ChiN1 にさらに多くの酸性アミノ酸を導入することで、ChiN1 の耐塩性のさらなる向上を試みた。

*Ha. japonica* が菌体外分泌した組換え ChiN1 を用いて性質検討を行った。ChiN1 の反応至適 pH は pH 4.5 付近、反応至適温度は 50°C であることがわかった。また、ChiN1 の反応至適 NaCl 濃度は 1.0 M であり、3.5 M NaCl 存在下においても最大活性の 40% 程度を保持する耐塩酵素であることが明らかとなった。さらに、ChiN1 は糖転移活性を有しており、糖転移反応は水-極性有機溶媒中において促進されることが明らかとなった。

立体構造モデルに基づき、ChiN1 の分子表面への酸性アミノ酸を導入した変異型酵素 N239D および Q242E (それぞれ、Asn239 の Asp への置換および Gln242 の Glu への置換を含む) を調製した。いずれの変異型酵素も野生型 ChiN1 と同様、1.0 M に反応至適 NaCl 濃度を有し、1.0 M より高い塩濃度においては活性が低下していく傾向が見られた。一方、1.5 M NaCl 以上の条件においては、いずれの変異型酵素も野生型 ChiN1 より高い相対活性を示すことがわかった。これより、ChiN1 の分子表面に酸性アミノ酸を導入することで、耐塩性が向上することが示唆された。

### 1. 研究目的

#### 1.1 高度好塩性古細菌とそのタンパク質

微生物は生育環境の塩濃度によって、いくつかに分類することが可能である<sup>[1]</sup>。大腸菌などの普通の微生物は、塩化ナトリウム (NaCl) 濃度が 0.2 M 以下で最もよく生育する。海水に相当する 0.2 ~ 0.5 M の濃度では、海洋細菌などの低度好塩菌が良好に生育する。また、0.5 ~ 2.5 M の

濃度では、味噌や醤油といった NaCl 含量の高い食品中に含まれるような中度好塩菌が生育する。そして、これらよりも高い 2.5 ~ 5.2 M の濃度で生育するのが高度好塩菌である。高度好塩菌は高塩濃度の環境を好んで生育し、反対に低い塩濃度の環境では生育することが困難になる。高塩濃度を好んで生育する高度好塩菌は、その大部分が古細菌に属している。高度好塩性古細菌が生産するタ

ンパク質は高塩濃度下で機能することができる。一般に、好塩菌タンパク質は非好塩菌タンパク質に比べ、酸性アミノ酸 (Asp や Glu) を多く含む<sup>[1,2]</sup>。立体構造形成時には酸性アミノ酸がタンパク質表面に露出した親水性の高い構造をとり、これがタンパク質の耐塩機構に関与しているともいわれている。すなわち、好塩菌タンパク質は分子表面の酸性アミノ酸が溶媒の水分子を強固に保持することで、水分含量の低い高塩濃度環境においても構造を崩すことなく機能すると考えられている。

高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* TR-1 株は、石川県能登半島の塩田土壌より分離された<sup>[2,3]</sup>(Fig. 1)。本菌は NaCl 濃度 2.6~4.3 M で生育可能 (3.4 M 付近で最も良好に生育する) であり、一辺が約 1~2  $\mu\text{m}$ 、厚さが 0.1~0.2  $\mu\text{m}$  程度の三角形平板状という特徴的な形態を有する。その特徴的な形態から、細胞形態維持機構や細胞分裂機構の解明を目指した研究が展開されてきた。*Ha. japonica* 細胞表層の解析を行ったところ、他の高度好塩性古細菌と同様、細胞表層糖タンパク質 (CSG: Cell surface glycoprotein) が多量に存在していることが明らかとなった。CSG は *Ha. japonica* の細胞表層に多量に存在していることから、*csg* 遺伝子における強力なプロモーターの存在が示唆された。これまでに、*Ha. japonica* の形質転換系を確立し、*csg* 遺伝子プロモーターを利用した *Ha. japonica* (親株) における外来遺伝子発現が試みられてきた<sup>[2]</sup>。

## 1. 2 キチナーゼ

キチンは *N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) が  $\beta$ -1,4 グリコシド結合で直鎖状に連なった多糖、すなわち  $\beta$ -1,4-ポリ-*N*-アセチル-D-グルコサミンである (Fig. 2)。甲殻類・真菌類・昆虫等に多く含まれ、生物の構造多糖として地球上の広い範囲に存在している。自然界において、キチンは GlcNAc と D-グルコサミン (GlcN) との共重合体の形で存在していることが多い。キチンの  $\beta$ -1,4 グリコシド結合を加水分解する酵素がキチナーゼである。糖質加水分解酵素は、アミノ酸一次構造に基づく疎水性クラスター解析により 120 余りの GH (Glycoside hydrolase) ファミリーに分類されている [<http://www.cazy.org/>]。その中で、キチナーゼは GH ファミリー 18 と 19 に分布する。GH ファミリー 18 キチナーゼは GlcNAc-GlcNAc および GlcNAc-GlcN 間の結合を特異的に切断するのに対し、GH ファミリー

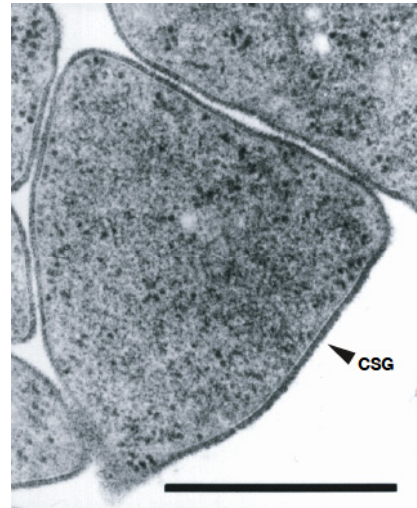


Fig. 1. TEM image of extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica* TR-1

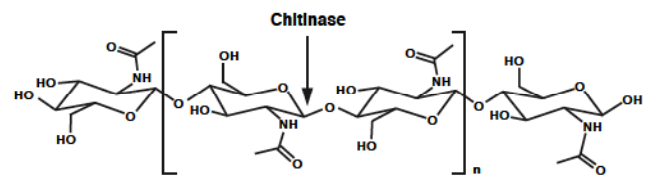


Fig. 2. Chemical structure of chitin

19キチナーゼは GlcNAc-GlcNAc および GlcN-GlcNAc 間を切断し、両ファミリーキチナーゼの切断特異性は互いに異なる。GH ファミリー 18 キチナーゼは細菌から動物・植物まで幅広い生物種に見られるのに対し、GH ファミリー 19 キチナーゼは植物およびごく一部の細菌によって生産される。

## 1. 3 高度好塩性古細菌由来キチナーゼ

これまでに種々の生物由来のキチナーゼに関する研究が行われてきたが、古細菌のキチナーゼに関する報告はほとんど知られていない。わずかに超好熱性古細菌のゲノム配列中に見出されたキチナーゼホモログについて性質検討が行われているものの、高度好塩性古細菌由来のキチナーゼは報告されていなかった。近年、高度好塩性古細菌としては初めて、*Halobacterium* sp. NRC-1 株の全ゲノム解析が終了した<sup>[4]</sup>。その結果、NRC-1 株ゲノム上にキチナーゼホモログ (ChiN1 と命名) をコードする 1,638 bp のオープンリーディングフレームが存在することがわかった (データ示さず)<sup>[5]</sup>。データベースを用いたシグナル領

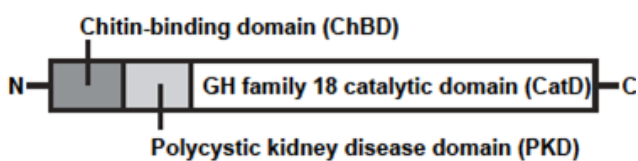
域の検索結果により、ChiN1 は N 末端側に 28 アミノ酸からなるシグナルペプチドが結合した前駆体の形で生産され、膜通過の際にシグナルペプチドが切断された後、菌体外に分泌されるものと考えられた。また、成熟型 ChiN1 と他のキチナーゼとのアミノ酸配列比較により、成熟型 ChiN1 はマルチドメイン構造をとることがわかった。すなわち、N 末端側には 40 アミノ酸からなるキチン結合ドメインが位置しており、その下流には 61 アミノ酸からなる Polycystic kidney disease ドメイン、さらに C 末端側には触媒ドメインが存在し、合計 3 つのドメインから構成されている (Fig. 3)。ChiN1 の触媒ドメインのアミノ酸配列は GH ファミリー 18 に属するキチナーゼと比較的高い相同性を有することから、本酵素も GH ファミリー 18 に分類されるものと考えられた。一方で、ChiN1 は同じ GH ファミリー 18 に属する他のキチナーゼと比べて著しく高い酸性アミノ酸含量を示し、ChiN1 は典型的な耐塩タンパク質であることが示唆された。

これまでに、本助成研究者らは NRC-1 株ゲノム DNA より *chiN1* 遺伝子をクローニングし、*Ha. japonica* *csg* 遺伝子プロモーターを利用した *chiN1* 遺伝子の *Ha. japonica* における高効率分泌発現を行ってきた<sup>[5]</sup>。そして、組換え ChiN1 が高い耐塩性を有することを示す予備的結果を得ている。耐塩タンパク質は水分含量の低い高塩濃度環境においても機能発現することから、有機溶媒中での利用も考えられる。本助成研究では、組換え ChiN1 の詳細な性質検討を行い、有機溶媒中での利用を模索した。また、ChiN1 にさらに多くの酸性アミノ酸を導入することで、ChiN1 の耐塩性のさらなる向上を試みた。

## 2. 研究の方法、結果および考察

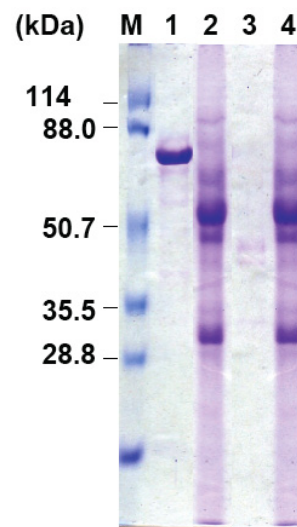
### 2.1 組換え ChiN1 の調製

高度好塩性古細菌および大腸菌のシャトルベクターである pWL102 を使用した。また、pChiN9 は高度好塩性古



**Fig. 3.** Molecular architecture of ChiN1 from *Halobacterium* sp. NRC-1

細菌用 *chiN1* 遺伝子発現型プラスミドであり、*Ha. japonica* *csg* 遺伝子プロモーター領域および *chiN1* 構造遺伝子全領域を pWL102 に連結した構造をとる<sup>[5]</sup>。pWL102 ないし pChiN9 を含む *Ha. japonica* 形質転換体の培養を行い、菌体外および全菌体画分を調製した。各画分を SDS-PAGE に供し、CBB 染色を行った。その結果、pChiN9 を有する *Ha. japonica* の菌体外画分を泳動したレーンにのみ、分子質量 70 kDa の位置に濃いタンパク質バンドが観察された (Fig. 4)。これより、ChiN1 は *Ha. japonica* において高効率に菌体外分泌されたことが明らかとなった。以後の検討では、培養上清を限外濾過濃縮したものを組換え ChiN1 粗酵素標品として用いることとした。なお、遺伝子配列より類推されるアミノ酸配列からは、成熟型 ChiN1 の分子質量は 57 kDa と計算される。SDS-PAGE において ChiN1 の分子質量が大きく見積もられたのは、そのアミノ酸組成に起因すると考えられよう。ChiN1 は 17% にもおよぶ酸性アミノ酸を含んでいる。一般に酸性アミノ酸を多く含むタンパク質は SDS が結合しにくいため、SDS-PAGE において分子質量が大きく見積もられることが知られている<sup>[2,3]</sup>。



**Fig. 4.** Extracellular production of recombinant ChiN1 in *Ha. japonica*. Lane M, molecular mass markers; lane 1, extracellular fraction of *Ha. japonica* carrying pChiN9; lane 2, whole cell fraction of *Ha. japonica* carrying pChiN9; lane 3, extracellular fraction of *Ha. japonica* carrying pWL102; lane 4, whole cell fraction of *Ha. japonica* carrying pWL102.

## 2. 2 ChiN1 の性質検討

基質として 70% 脱アセチル化キチンを用い、1.0 M NaCl 存在下、37°Cにおける反応 pH 依存性を調べた。その結果、ChiN1 は pH 4.5 付近に反応の至適を有することが明らかとなった (Fig. 5A)。また、pH 9 付近においても最大活性の 50% 程度の活性を保持していることがわかった。1.0 M NaCl 存在下、pH 6.0 における反応温度依存性を調べた。その結果、ChiN1 の反応至適温度は 50°C であることが明らかとなった (Fig. 5B)。pH 6.0、37°C における反応 NaCl 濃度依存性を調べた。その結果、ChiN1 の反応至適 NaCl 濃度は 1.0 M であることが明らかとなった (Fig. 6)。また、NaCl 濃度が 0 M 付近では最大活性の 20% 程度まで活性が低下しており、ChiN1 は活性発現に高濃度の NaCl を必要とすることがわかった。一方、NaCl 濃度 3.5 M においても最大活性の 40% 程度を保持しており、本酵素は耐塩性を有することも明らかとなった。また、本酵素は NaCl 濃度 1.0 ~ 4.8 M の広範囲において安定であったものの、0 ~ 0.5 M の低塩濃度域では安定性の著しい低下が認められた (データ示さず)。1.0 M NaCl 存在下、pH 6.0、4°C における各種極性有機溶媒に対する安定性を調べた。その結果、ChiN1 は DMSO、DMF、アセトンおよびメタノールに対して、それぞれ 30%、40%、50% および 50% まで安定であることが明らかとなった (データ示さず)。

基質として (GlcNAc)<sub>4</sub> を用い、1.0 M NaCl 存在下、37°C で反応を行った。低濃度 (0.76 mM) の (GlcNAc)<sub>4</sub> を用いた場合、そのほとんどが (GlcNAc)<sub>2</sub> に加水分解された (データ示さず)。一方、高濃度 (38 mM) の (GlcNAc)<sub>4</sub> を用いた場合、糖転移反応産物である (GlcNAc)<sub>5</sub> および

(GlcNAc)<sub>6</sub> が生成することがわかった。糖転移反応による主生成物は (GlcNAc)<sub>6</sub> であり、反応開始 8 時間後に、最大生成量 0.5 mM 程度ではほぼ平衡に達した。次に、高濃度の (GlcNAc)<sub>4</sub> を用い、40% DMSO および 1.0 M NaCl 存在下、37°C で同様に反応を行った。その結果、(GlcNAc)<sub>6</sub> の最大生成量は、40% DMSO 存在下では約 0.6 mM に向上することがわかった (データ示さず)。これより、ChiN1 による糖転移反応は、水-極性有機溶媒中において促進されることが明らかとなった。

## 2. 3 酸性アミノ酸を導入した変異型 ChiN1 の耐塩性検討

タンパク質構造シミュレーションソフトウェア (Discovery Studio, Accelrys Software) を用い、ChiN1 の触媒ドメイン領域の立体構造モデルを構築した (Fig. 7A)。ChiN1 は 8 つのヘリックスと 8 つのシートからなる典型的な TIM バレル構造をとる。また、高度好塩性古細菌に由来する他の耐

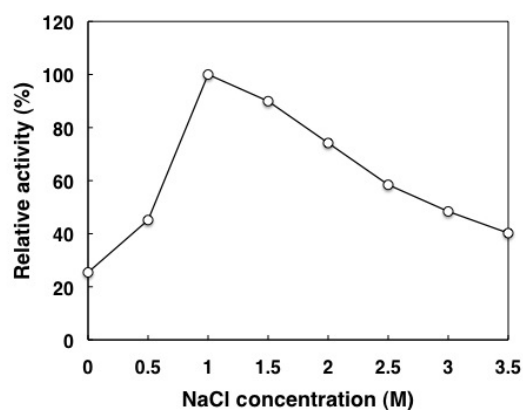


Fig. 6. Effect of NaCl concentration on activity of recombinant ChiN1

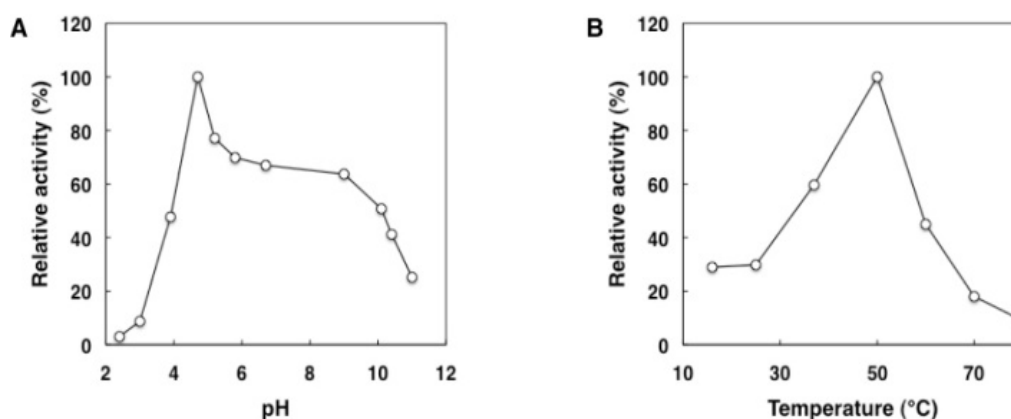


Fig. 5. Effect of reaction pH (A) and temperature (B) on activity of recombinant ChiN1

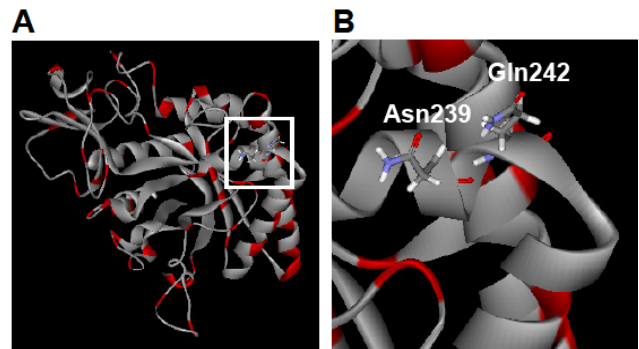


塩タンパク質と同様、ChiN1 は多くの酸性アミノ酸を含むが、それらのほとんどが分子表面に局在していることが推察された。そこで、ChiN1 の分子表面への酸性アミノ酸の導入に際しては、分子表面に存在するヘリックスやループのうち、Phe237 から Arg247 までに対応するヘリックスに注目した。この小さなヘリックス中には酸性アミノ酸は存在せず、その代わりに 239 番目に Asn が、そして 242 番目には Gln が存在する (Fig. 7B)。これら2つのアミノ酸を類縁の酸性アミノ酸に置換しても、立体構造に対する影響は小さいと予想されたため、それぞれ Asp および Glu に置換することとした(それぞれ、変異型酵素 N239D および Q242E)。野生型 *chiN1* 遺伝子発現型プラスミド pChiN9 に部位特異的変異を導入することで、変異型酵素 N239D および Q242E をコードする発現型プラスミドを構築した。当該発現型プラスミドを導入した *Ha. japonica* 形質転換体の培養を行い、野生型 ChiN1 と同様にして、変異型酵素 N239D および Q242E の粗酵素標品を調製した。

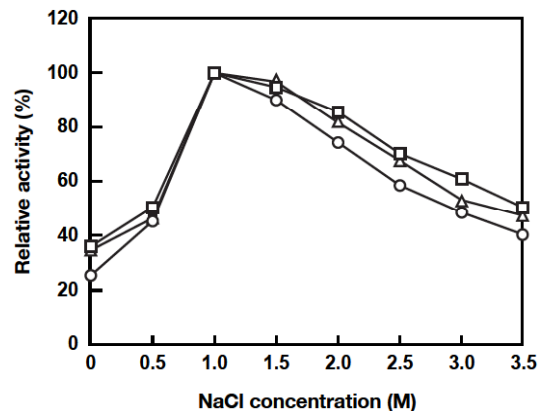
pH 6.0、37°Cにおける反応 NaCl 濃度依存性を調べた。その結果、いずれの変異型酵素も野生型 ChiN1 と同様、1.0 M に反応至適 NaCl 濃度を有し、1.0 M より高い塩濃度においては活性が低下していく傾向が見られた (Fig. 8)。一方、1.5 M NaCl 以上の条件においては、いずれの変異型酵素も野生型 ChiN1 より高い相対活性を示すことがわかった。すなわち、ChiN1 の分子表面に酸性アミノ酸を導入することで、耐塩性が向上することが示唆された。

### 3. 今後の課題

ChiN1 分子表面の特定の部位に酸性アミノ酸を導入した各種変異型 ChiN1 において、耐塩性が向上する可能性を示すことができた。本助成研究における各種変異型 ChiN1 の性質検討は、粗酵素標品を用いて行われたものである。今後は各種変異型 ChiN1 の精製を行い、精製標品を用いて性質検討を実施することで、アミノ酸置換による比活性への影響を評価することができよう。また、NaCl 以外の塩存在下における野生型および各種変異型 ChiN1 の性質をより詳細に調べることで、タンパク質の耐塩性と塩の種類との関連についても多くの有益な知見が得られるであろう。さらに、各種有機溶媒存在下における野生型および各種変異型 ChiN1 の性質を調べることで、タンパク質の耐塩性と有機溶媒耐性との関係も明らかに



**Fig. 7.** 3D-structure of ChiN1 (A) and its enlargement (B). Acidic amino acids were shown in red. Asn239 and Gln242 on a small helix between Phe237 and Arg247 were targeted for mutagenesis.



**Fig. 8.** Effect of NaCl concentration on activity of wild-type ChiN1 and mutants N239D and Q242E. Circles, wild-type ChiN1; triangles, mutant N239D; squares, mutant Q242E.

できよう。

本助成研究での酸性アミノ酸の導入箇所は限定的であった。酸性アミノ酸の導入箇所を他の領域にも拡大し、ChiN1 の分子表面により多くの酸性アミノ酸を導入することで、耐塩性の劇的な向上が可能になるものと考えられる。また、耐塩性が劇的に向上した変異型 ChiN1 が得られた場合、その有機溶媒中でのオリゴ糖合成への利用など、工学応用にも期待が集まる。

### 引用文献

- [1] 掘越弘毅, 関口武司, 中村 聡, 井上 明, 「極限環境微生物とその利用」. 講談社サイエンティフィック (2000).

- [2] S. Nakamura, K. Nakasone and T. Takashina, Genetics and genomics of triangular disc-shaped halophilic archaeon *Haloarcula japonica* strain TR-1. “*Extremophiles Handbook*” (Horikoshi K. *et al.*, eds.), Springer, pp. 363-381 (2011).
- [3] K. Horikoshi, R. Aono and S. Nakamura, The triangular halophilic archaeobacterium *Haloarcula japonica* strain TR-1. *Experientia*, **49**, 467-502 (1993).
- [4] W.V. Ng, S.P. Kennedy, G.G. Mahairas, B. Berquist, M. Pan, H.D. Shukla, S.R. Lasky, N.S. Baliga, V. Thorsson, J. Sbrogna, S. Swartzell, D. Weir, J. Hall, T.A. Dahl, R. Welti, Y.A. Goo, B. Leithauser, K. Keller, R. Cruz, M.J. Danson, D.W. Hough, D.G. Maddocks, P.E. Jablonski, M.P. Krebs, C.M. Angevine, H. Dale, T.A. Isenbarger, R.F. Peck, M. Pohischroder, J.L. Spudich, K.H. Jung, M. Alam, T. Freitas, S. Hou, C.J. Daniels, P.P. Dennis, A.D. Omer, H. Ebhardt, T.M. Lowe, P. Liang, M. Riley, L. Hood and S. DasSarma, Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12176-12181 (2000).
- [5] R. Yatsunami, M. Sato, K. Orishimo, Y. Hatori, Y. Zhang, T. Takashina, T. Fukui and S. Nakamura, Gene expression and characterization of a novel GH family 18 chitinase from extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* NRC-1, *J. Jpn. Soc. Extr.*, **9**, 19-24 (2010).
- 成果発表の状況
1. 原著論文
- Y. Zhang\*, R. An\*, R. Yatsunami, M. Sato, K. Orishimo, Y. Hatori, T. Fukui and S. Nakamura, Characterization of a haloarchaeal GH family 18 chitinase with additional acidic amino acids on its protein surface, *J. Jpn. Soc. Extr.*, **9**, 72-74 (2010).
2. 国際会議
- R. Yatsunami, Y. Zhang, R. An, M. Sato, K. Orishimo, Y. Hatori, T. Takashina, T. Fukui and S. Nakamura, Improvement of halotolerance of a haloarchaeal chitinase by introducing acidic amino acids on its protein surface. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2010 (PACIFICHEM 2010), Hawaii, December, 2010.

## Elucidation of Halotolerant Mechanism and Improvement of Halotolerancy of Haloarchaeal Chitinase

Satoshi Nakamura and Rie Yatsunami

Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology

### Summary

Chitin is a polysaccharide that made up of *N*-acetylglucosamine by  $\beta$ -1,4-linkages. Chitinase (EC 3.2.1.14) is an enzyme that can degrade chitin into small molecules. Chitinases from halophilic archaea have not been reported to date. Recently, the complete genome sequence of extremely halophilic archaeon *Halobacterium* sp. NRC-1 was reported, and a chitinase-homolog (named ChiN1) was found in the genome. The deduced amino acid sequence revealed that the mature ChiN1 was composed of three domains: a chitin-binding domain of carbohydrate-binding module (CBM) family 5, a functionally-unknown polycystic kidney disease domain and a catalytic domain of glycoside hydrolase (GH) family 18. *Haloarcula japonica* TR-1 is also an extremely halophilic archaeon and has a glycoprotein (CSG) on its cell surface. Because a large amount of CSG is produced by *Ha. japonica*, the promoter of *csg* gene is expected to be powerful. We have cloned the gene encoding ChiN1 from strain NRC-1, and *chiN1* gene has been successfully expressed in *Ha. japonica* by using the *csg* promoter. In this study, we have performed production and characterization of recombinant ChiN1 (wild-type) and some mutant enzymes.

*Ha. japonica* cells carrying *chiN1* gene were cultured and the extracellular fraction containing recombinant ChiN1 was used as a crude enzyme preparation. Optimal pH and temperature of ChiN1 are pH 4.5 and 55°C, respectively. ChiN1 was most active at 1.0 M NaCl and stable over a wide range of NaCl concentration from 1.0 to 4.5 M. ChiN1 also showed transglycosylation activity, and the activity proved to improve in the presence of 40% DMSO.

ChiN1 contains a higher number of acidic amino acids than non-halophilic chitinases. Based on a 3D-structure model of ChiN1, these amino acids seemed to locate outside of the protein surface. Hence, ChiN1 could catch many water molecules to form a water shell and might be protected from salting-out. Since acidic amino acids are very important for the halotolerancy of ChiN1, we tried to introduce additional acidic amino acids on the surface of ChiN1 to improve halotolerancy. Mutants N239D (Asn239 was replaced by Asp) and Q242E (Gln242 was replaced by Glu) were expressed in *Ha. japonica*. Characterization of the mutants revealed that halotolerancy could be improved by introducing an acidic amino acid on the surface of ChiN1.