

氏名	齋藤純一
学位(専攻分野)	博士 (理学)
学位記番号	理博第2106号
学位授与の日付	平成11年5月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科化学専攻
学位論文題目	Crystal Structure of Microbial Chitosanase (微生物由来キトサナーゼの結晶構造に関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 三木邦夫 教授 井上 丹 教授 伊藤維昭

### 論文内容の要旨

キチン・キトサンは、エビ、カニ、昆虫などの外骨格やカビの細胞壁中に含まれる多糖類であり、セルロースに次ぐバイオマスである。キチンはN-acetylglucosamine (以下、GlcNAcと省略) が $\beta$ -1, 4結合したものであり、キトサンはGlcNAcの脱アセチル化物であるglucosamine (以下、GlcNと省略) が $\beta$ -1, 4結合したものであるが、自然界では、GlcNAcが30%程度含まれた状態で存在している。キチン・キトサンの加水分解酵素がそれぞれ、キチナーゼ、キトサナーゼである。カビの細胞壁中に含まれるキチン・キトサンを加水分解することから、植物においては、生体の防御機構に関与する酵素と考えられている。

本研究では、X線結晶解析法により *Bacillus circulans* MH-K 1由来のキトサナーゼ (以下、MH-K 1キトサナーゼと省略) の立体構造を決定し、近縁のタンパク質であるキチナーゼやリゾチームとの基質認識における差異を検討し、反応機構の解明を行った。

MH-K 1キトサナーゼは、分子量29 kDaの塩基性タンパク質である。*Bacillus brevis* 47-5 Qを宿主とした大量発現系により、培養1リットル当たり、数グラムのMH-K 1キトサナーゼが培養上清中から見出され、高純度の精製も可能となった。結晶化を行ったところ、沈澱剤に硫酸アンモニウムを用いる条件で、斜方晶系に属し、空間群  $P2_12_12$  (格子定数  $a = 43.3 \text{ \AA}$ ,  $b = 128.0 \text{ \AA}$ ,  $c = 57.7 \text{ \AA}$ ) の結晶が1週間以内に再現性よく析出した。シンクロトロン放射光によるX線回折実験では  $1.6 \text{ \AA}$  分解能のデータ収集に成功した。次に、重原子多重同型置換法による構造解析を行うため、重原子誘導体の検索を行った。100種以上の重原子化合物を検索したが、白金化合物  $K_2PtCl_4$  が唯一の有効な重原子誘導体であった。そこで、この白金の異常分散効果を最大限に利用するため、多波長異常分散法 (MAD法) を適用した解析を行った。シンクロトロン放射光を用いて、蛍光X線スペクトルで選択した4波長 ( $1.0000 \text{ \AA}$ ,  $1.0721 \text{ \AA}$ ,  $1.0722 \text{ \AA}$ ,  $1.0728 \text{ \AA}$ ) において白金誘導体結晶の回折データを測定した。このデータを用いた多波長異常分散法の解析の結果、 $4 \text{ \AA}$  分解能における初期位相を決定することができ、解釈が可能な電子密度図が得られた。さらに溶媒領域平滑化法などで電子密度を改良することにより、分子モデルの構築が可能となり、最終的には水分子150個を含んだ  $1.6 \text{ \AA}$  分解能での完全な立体構造を得ることができた。最終構造の結晶学的  $R$  値は19.3% ( $R_{free}$  は23.5%) であった。

MH-K 1キトサナーゼ分子は、 $\alpha$ -ヘリックス14本と $\beta$ -ストランド5本で構成されており、アミノ酸残基番号134-158で構成される屈曲した2本の $\alpha$ -ヘリックス (バックボーンヘリックス) によって、上部と下部の2つドメインに分けることができた。ドメイン間には大きなクレフトが存在し、この底部には活性中心残基であるGlu 37が、またクレフトの天井部分にあたる $\beta$ -シートの先端にはAsp 55が位置していることが明らかになった。このMH-K 1キトサナーゼの分子構造を、放線菌 *Streptomyces* sp. N 174由来キトサナーゼ (以下、N 174キトサナーゼと省略) のものと比較すると、一次構造上のアミノ酸の相同性は25%程度であるにもかかわらず、全体のトポロジーはよく似ていることが分かった。しかし、N末端側は、MH-K 1キトサナーゼの方が16残基長く、 $\alpha$ -ヘリックス構造を形成していること、C末端側は、N 174キトサナーゼでは $\beta$

シート構造であるのに対し、MH-K1キトサナーゼでは $\alpha$ -ヘリックスであること、上部ドメインの構造が大きく異なるなど、顕著な差異も見い出された。ドメイン構造を比較すると、バックボーンヘリックスのくびれ部分を境に、上部および下部ドメインのみではそれぞれがよく合っており、ドメインの相互配置が両者でやや異なることが明らかとなった。両者の分子表面の比較すると、2つのドメインの相互配置の違いがドメイン間に形成されているクレフトの大きさと形状の違いに反映されていた。

MH-K1キトサナーゼの活性中心残基のうちの1つである Asp 55 とその隣の Glu 56 をそれぞれ Ser に置換し、活性の欠失した変異体を作成した。この変異型 MH-K1キトサナーゼとキトサンヘキサマー (GlcN<sub>6</sub>)。どの複合体状態での結晶も得ることができ、この立体構造の解明にも成功した。クレフト内に GlcN<sub>6</sub> の6糖のうち、3糖分の電子密度を確認することができた。また、活性中心残基である Glu 37 と、Asp 55 との間の距離 (10.9 Å) についての考察と、この活性中心残基と切断部位の糖との間に水分子の電子密度が確認できたことから、この酵素は、糖質分解酵素で一般に言われている Inverting Mechanism により基質を切断すると結論することができた。

MH-K1キトサナーゼと N 174 キトサナーゼの反応機構の違いは、基質の切断位置にある。MH-K1キトサナーゼは、部分アセチル化キトサン中の GlcN と GlcNAc の間を切断するのに対し、N 174 キトサナーゼでは、GlcNAc と GlcN の間を切断する。したがって、糖に結合するアセチル基が基質の選択性に関与すると考えて、MH-K1キトサナーゼとそれぞれの基質であるアセチル基が付加した糖との複合体モデルを作成した。その結果、MH-K1キトサナーゼは、本来の基質である糖はその活性部位に結合できるが、異なる位置にアセチル基が付いた糖では Lys 218 との接触による立体障害のため、このような基質は結合できないことが示唆された。したがって、MH-K1キトサナーゼにおいては、立体障害によって基質の種類を認識して、反応の選択性につながっていると結論することができた。

#### 論文審査の結果の要旨

キトサナーゼは、自然界に大量に存在するこのキトサンを加水分解する酵素である。キトサンは、*N*-acetyl glucosamine (GlcNAc) の脱アセチル化物である glucosamine (GlcN) が  $\beta$ -1, 4 結合したものであるが、自然界では GlcNAc が 30% 程度含まれた状態でカビの細胞壁に存在している。キチナーゼやリゾチームはキトサナーゼの類縁酵素であるが、様々な由来のもの立体構造がこれまで明らかにされ、反応機構の解明に大きく貢献している。申請者はこの研究にとりかかった当初にはその立体構造は未知であったキトサナーゼの結晶構造解析に着手し、その結果、*Bacillus circulans* MH-K1由来のキトサナーゼ (MH-K1キトサナーゼ) を結晶化して、シンクロトロン放射光で測定した高分解能の X 線回折データに基づいた精密な立体構造決定に成功している。その研究中に、放線菌 *Streptomyces sp.* N 174 由来のキトサナーゼ (N 174 キトサナーゼ) の立体構造が明らかにされたが、申請者は、その構造との詳細な比較を行うことで、また、基質類似物との複合体結晶を作成しその構造解析を行うことで、触媒機構、とくに基質特異性に関する詳細な知見を得ることに成功した。

得られた MH-K1キトサナーゼの結晶構造は分解能 1.6 Å と高分解能のものであり、分子構造に基づく反応機構の議論を可能にするものであった。申請者は重原子多重同相置換法での構造解析を当初試みたが、多くの重原子誘導体の検索にもかかわらず、ただ1つの誘導体しか調製することができなかったため、多波長異常分散法の解析に変更して完全な結晶構造の決定に成功した。全体の立体構造は、一次構造上のアミノ酸相同性は 25% 程度であるにもかかわらず、N 174 キトサナーゼの構造とよく似ていることが分かった。しかしながら、二次構造の違いを含めて、少なくとも4つの部分において大きく構造が異なっていることも見い出している。分子は  $\alpha$ -ヘリックス 14 本と  $\beta$ -ストランド 5 本で構成されており、中央の屈曲した2本のバックボーンヘリックスによって、上部と下部の2つドメインに分けられている。ドメイン間には基質が結合する大きなクレフトが存在し、活性中心残基である Glu 37 と Asp 55 がクレフト内に延びるという特徴をもったものであった。さらに、ドメインの相互配置が両者でやや異なることが明らかとなり、両者の分子表面を比較した結果からは、この2つのドメインの相互配置の違いが、ドメイン間に形成されているクレフトの構造の違いの原因になっていることを明らかにしている。申請者は、クレフトの大きさと形状の違いが2種類のキトサナーゼの基質認識と反応機構の違いの原因であると考え、活性の欠失した変異型 MH-K1キトサナーゼと基質類似物であるキトサンヘキサマー (GlcN<sub>6</sub>) の複合体の立体構造も X 線結晶解析によって決定した。解析の結果、GlcN<sub>6</sub> の6糖のうち3糖分の電子密度をクレフト内に確認している。また、糖質分解酵素について提唱されている2種の反応機構 (Retaining Mechanism と Inverting Mechanism) のうち、この MH-

K1キトサナーゼにおいては、2つの活性中心残基（Glu 37と Asp 55）間の距離、ならびに活性中心残基と切断部位の糖との間にある水分子の電子密度の確認から、Inverting Mechanismによる基質の切断であると結論づけている。

さらに申請者は、MH-K1キトサナーゼとN174キトサナーゼの反応機構の違いは基質の切断位置であることに着目して、その立体構造、特に、基質認識クレフト（活性中心）の大きさと形状によって、その反応機構を説明することに成功している。すなわち、MH-K1キトサナーゼは部分アセチル化キトサン中のGlcN-GlcNAc間を切断するのに対し、N174キトサナーゼはGlcNAc-GlcN間を切断することから、アセチル基の立体的効果が基質の選択性に関与していると考え、MH-K1キトサナーゼと基質であるアセチル基が付加した糖との複合体モデルを作成することによって、基質認識の機構をアミノ酸残基と基質のアセチル基の間の立体障害から説明することに成功している。

以上、申請者は微生物由来のMH-K1キトサナーゼの立体構造をX線結晶解析により高分解能で決定し、また、変異型キトサナーゼと基質類似物の複合体の結晶構造解析にも成功した。その結果、このMH-K1キトサナーゼの基質分解機構を明らかにし、また、類縁のキトサナーゼとの基質選択性の違いについても結晶構造を基盤にして説明することによって、これまで明らかにされていなかったキトサナーゼの反応機構解明に貢献したことは高く評価できる。

したがって、本申請論文は博士（理学）の学位論文として充分価値のあるものと認められる。

なお、本学位論文に報告されている内容および、これに関連する分野について諮問した結果、合格と認めた。