

## 好アルカリ性 *Bacillus* sp. J813 株由来アルカリキチナーゼの 指向性進化による比活性の向上

齋藤圭祐\*<sup>1,#</sup>, 宇仁文哉\*<sup>1,#</sup>, 渡部俊樹\*<sup>1</sup>, 深沢徹也\*<sup>1</sup>, 長尾由里\*<sup>1</sup>,  
三瓶全次郎\*<sup>1</sup>, 大竹 潤\*<sup>1</sup>, 八波利恵\*<sup>1</sup>, 福居俊昭\*<sup>1</sup>, 中村 聡\*<sup>1,2</sup>

### Improvement of Specific Activity of an Alkaline Chitinase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. J813 by Directed Evolution

SAITO Keisuke\*<sup>1,#</sup>, UNI Fumiya\*<sup>1,#</sup>, WATANABE Toshiki\*<sup>1</sup>, FUKAZAWA Tetsuya\*<sup>1</sup>,  
NAGAO Yuri\*<sup>1</sup>, SAMPEI Zenjiro\*<sup>1</sup>, OTAKE Hiroshi\*<sup>1</sup>, YATSUNAMI Rie\*<sup>1</sup>,  
FUKUI Toshiaki\*<sup>1</sup>, NAKAMURA Satoshi\*<sup>1,2</sup>

**Abstract:** Chitin is a  $\beta$ -1,4-linked polysaccharide composed of *N*-acetyl-D-glucosamine units. Chitinase hydrolyzes  $\beta$ -1,4-glycosidic bonds of chitin. Alkaliphilic *Bacillus* sp. strain J813 produces a glycoside hydrolase (GH) family 18 alkaline chitinase (ChiJ). To obtain ChiJ mutants with improved specific activity through directed evolution, random mutation was introduced into *chiJ* gene by error-prone PCR. Approximately 2,750 clones were screened for chitinase activity from the random mutation library using high-throughput screening system. Nine mutants with improved specific activity were obtained. Using soluble chitin as substrate, all ChiJ mutants showed higher specific activity than wild-type ChiJ. And above all, mutants F272S and F272L showed the highest activity. Therefore, it was suggested that the amino acid substitution of Phe272 was particularly important to improve specific activity of ChiJ.

Key Words: Chitinase, GH family 18, *Bacillus* sp., Directed evolution

#### 1. はじめに

キチンは *N*-アセチル-D-グルコサミンが  $\beta$ -1,4 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。キチンはセルロースに次いで自然界に多量に存在する未利用バイオマスであるが、水に難溶性であるために利用が困難とされてきた。しかし、近年、キチンの加水分解により生成するキチンオリゴ糖は、高付加価値素材として医薬品・化粧品・食品などの種々の産業分野において注目されている [1]。キチンの加水分解は強酸を用いた方法のほか、環境低負荷をめざしたキチナーゼによる加水分解も行われており、加水分解効率の高いキチナーゼが望まれる。

キチンは酸性条件下では水に溶解するが、アルカリ性では不溶となる。したがって、アルカリ性条件下で高活性を示す

アルカリキチナーゼは不溶性キチンを効率的に分解できると考えられる。これまでに、好アルカリ性 *Bacillus* sp. J813 株がアルカリキチナーゼ生産菌として分離されている [2]。J813 株が生産するアルカリキチナーゼ (ChiJ) は、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー 18 に属する触媒ドメイン (CatD)、フィブロンネクチンタイプ III 様ドメイン (FnIID) およびキチン結合ドメイン (ChBD) から構成される (Fig.1) [3]。ここで、FnIID の機能は未知であるが、ChBD は不溶性キチンに特異的に結合することで、隣接する CatD による不溶性キチンの加水分解を促進することが知られている [3,4]。

本研究では、ChiJ による効率的なキチンオリゴ糖生産に向け、指向性進化による ChiJ の比活性向上をめざした。

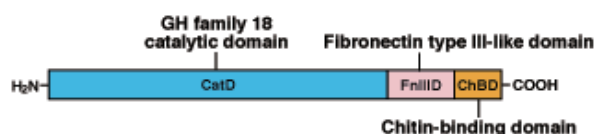


Fig. 1 好アルカリ性 *Bacillus* sp. J813 株由来アルカリキチナーゼ ChiJ のドメイン構成

\*<sup>1</sup> 東京工業大学 Tokyo Institute of Technology

\*<sup>2</sup> 沼津工業高等専門学校 National Institute of Technology (KOSEN), Numazu College

# Equal contribution

## 2. 材料と方法

### 2. 1 菌株、プラスミドおよび培地

遺伝子組換え用宿主としては大腸菌 JM109 株を、キチナーゼ遺伝子発現用宿主としては大腸菌 BL21(DE3) 株を用いた。pET-CFB は成熟型 ChiJ をコードする発現型プラスミドであり、pET-21b(+) (Novagen) を基盤としている [3]。通常の培養には LB 培地 [1.0% (w/v, 以下省略) トリプトン (ナカライテスク)、0.5% 酵母エキス (Becton Dickinson)、1.0% NaCl、pH 7.2] を、キチナーゼ遺伝子の発現には自動誘導培地 ZYM-5052 [5] を用いた。必要に応じて終濃度 100  $\mu\text{g/ml}$  のアンピシリンを添加した。

### 2. 2 ランダム変異ライブラリー構築法

エラーブローン PCR によるランダム変異導入には GeneMorph II Random Mutagenesis Kit (Agilent) を使用した。オリゴヌクレオチドプライマーはオペロンより購入した。エラーブローン PCR 後の反応溶液をアガロースゲル電気泳動に供し、目的の大きさの DNA 断片をゲルより回収した。

変異遺伝子のクローニングには Megaprimer PCR of Whole Plasmid 法 (MEGAWHOP 法) [6] を用いた。上で得られた DNA 断片をメガプライマー、そして pET-CFB を鋳型として、KOD-Plus<sup>®</sup> (東洋紡) を用いてサイクル反応を行った。反応産物に制限酵素 *Dpn*I を加えて鋳型 DNA を消化した後、大腸菌 BL21(DE3) 株に形質転換し、ランダム変異ライブラリーとした。

### 2. 3 DNA 塩基配列解析

DNA 塩基配列の解析は、東京工業大学オープンファシリティーセンター・バイオ部門に依頼して行った。

### 2. 4 キチナーゼ活性の測定法

可溶性基質としてダイキトサン M [70% 脱アセチル化キチン (大日精化工業より供与)] を使用した。反応液中の基質の終濃度は 0.05% (96 穴マイクロプレート) および 0.125% (1.5 ml マイクロチューブ) とした。pH 7.5、37°C で 10 分間反応を行った後、基質の加水分解に伴って生じた還元末端量を Schales 変法 [7] にて定量することにより、キチナーゼ活性を算出した。対照には *N*-アセチル-D-グルコサミンを用いた。

### 2. 5 ハイスループットスクリーニング法

96 穴マイクロプレートの各ウェルに自動誘導培地 150  $\mu\text{l}$

を分注し、ランダム変異ライブラリーを構成する形質転換体を植菌した。37°C で 16 時間培養することで、目的遺伝子の発現誘導を行った。遠心により回収した菌体を -20°C で冷却した後、150  $\mu\text{l}$  の溶菌溶液 [50  $\mu\text{g/ml}$  リゾチーム、0.2% (v/v) Triton X-100、5.0  $\mu\text{g/ml}$  DNase I (Sigma)、10 mM Tris-HCl、pH 7.5] に懸濁し、37°C で 1 時間溶菌させた。再度、遠心を行い、得られた上清のキチナーゼ活性を 96 穴マイクロプレートを用いて測定した。

### 2. 6 キチナーゼの精製

野生型および各種変異型 ChiJ をコードする発現型プラスミドを有する大腸菌 BL21(DE3) 株を 5 ml の自動誘導培地を含む試験管に植菌し、37°C で一晩培養することで、目的遺伝子の発現誘導を行った。遠心により回収した菌体を 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し、超音波破碎した後、再度遠心を行い、得られた上清を無細胞抽出液とした。無細胞抽出液からの野生型および各種変異型 ChiJ の精製は、キトパール BL-01 (富士紡績) への親和性を利用したアフィニティークロマトグラフィーにて行った。結合緩衝液は 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、そして溶出液には 100~500 mM  $\text{CH}_3\text{COOH}$  溶液を使用した。得られた画分を 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に対して透析したものを精製標品とした。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) には 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用い、Laemmli の方法 [8] に従って行った。泳動後のタンパク質はクーマシーブリリアントブルー R-250 (CBB) (ナカライテスク) による染色を施した。分子量マーカーは SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range (Bio-Rad) を使用した。

キチナーゼ活性は 1.5 ml マイクロチューブを用いて測定した。タンパク質の定量には Lowry 法 [DC Protein Assay (Bio-Rad)] [9] を用いた。対照はウシ血清アルブミン (和光純薬) とした。

### 2. 7 動力学定数の算出

野生型および各種変異型 ChiJ 精製品を用い、終濃度 0.02~0.5% の基質存在下、1.5 ml マイクロチューブ中、pH 7.5、37°C で 5 分間反応を行った。基質濃度と反応初期速度の Hanes-Woolf プロット [10] により、動力学定数 (ミカエリス定数  $K_m$  および触媒定数  $k_{cat}$ ) を算出した。

### 2. 8 立体構造モデリング

野生型 ChiJ の立体構造モデリングには、Discovery Studio 4.5 プログラム (BIOVIA) を使用した。

### 3. 結果

#### 3.1 高活性変異型 ChiJ 産生クローンのスクリーニング

野生型 ChiJ をコードする発現型プラスミド pET-CFB を鋳型として用い、エラーブローン PCR による *chiJ* 遺伝子 CatD 領域へのランダム変異導入を行った。用いたオリゴヌクレオチドプライマーの配列は Table 1 に示す。CatD-sp は *chiJ* 遺伝子 CatD 領域の 5' 末端にアニールするセンスプライマー、そして CatD-ap は *chiJ* 遺伝子 CatD 領域の 3' 末端にアニールするアンチセンスプライマーである。エラーブローン PCR の結果、約 1.7 kb の DNA 断片の増幅が確認された。得られた DNA 断片を MEGAWHOP 法を用いて pET-CFB の挿入配列と置き換えた後、大腸菌 BL21(DE3) 株に形質転換し、ランダム変異ライブラリーとした。

Table 1 オリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列

Primer	Sequence
CatD-sp	5' -GATGACGACCCCTTACAAAATTGTCGC-3'
CatD-ap	5' -FTCAGGATGTTGCCCTTTTC-3'

キチナーゼ活性測定に基づくハイスループットスクリーニング系を用い、ランダム変異ライブラリーから高活性変異型 ChiJ 産生クローンのスクリーニングを行った。全 2,749 株のライブラリー構成クローンのスクリーニングの結果、11 株が野生型 ChiJ より高い活性を示した。この 11 株の候補クローンに含まれる *chiJ* 遺伝子について塩基配列を決定したところ、全ての株で 1~2 箇所のアミノ酸置換が確認された。また、そのうち 2 株については、アミノ酸置換箇所 (F272S および F272L) が他の候補クローンと重複していた。以後、アミノ酸置換表示を変異型 ChiJ の名称とする。

#### 3.2 高活性変異型 ChiJ の発現と精製

野生型 ChiJ 発現型プラスミドを有する大腸菌 BL21(DE3) 株、およびハイスループットスクリーニングにより取得した 9 種の高活性変異型 ChiJ 産生クローンについて、自動誘導培地を用いて培養した菌体より無細胞抽出液を調製した。得られた無細胞抽出液を還元条件下で SDS-PAGE に供し、CBB 染色を施した。各種変異型 ChiJ は野生型 ChiJ と同様、大腸菌菌体内で可溶性タンパク質として高効率生産されることが明らかとなった (Fig. 2A)。

キットパール BL-01 を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、各種 ChiJ の無細

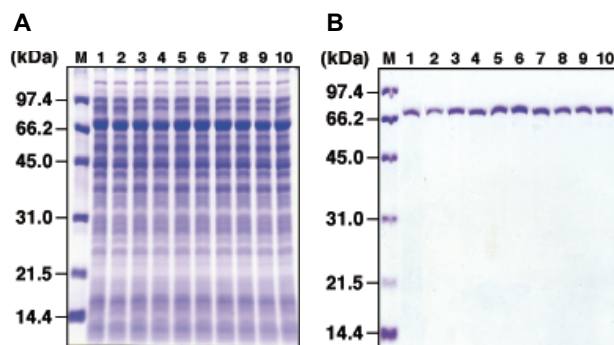


Fig. 2 野生型および変異型 ChiJ を含む無細胞抽出液 (A) および精製標品 (B) の SDS-PAGE

1: 野生型, 2: P254S, 3: N242S, 4: N221I, 5: Q153R/N349D, 6: H281L, 7: F272S, 8: F272L, 9: I69V/P267S, 10: W302R/D321N, M: マーカー。

胞抽出液からの精製を行った。各種精製標品の SDS-PAGE の結果、いずれも単一バンドを示す標品が得られたことが確認された (Fig. 2B)。以後の検討では、ここで得られた精製標品を用いることとした。

#### 3.3 高活性変異型 ChiJ の性質検討

野生型および各種変異型 ChiJ の精製標品を用い、可溶性キチンであるダイキトサン M に対する加水分解活性を測定した。全ての変異型 ChiJ は、野生型 ChiJ より高い比活性を示した (Table 2)。特に F272S および F272L は野生型 ChiJ の 2.2 ~ 2.6 倍の比活性を示しており、Phe272 のアミノ酸置換が ChiJ の比活性向上に大きく寄与していると考えられた。

各種変異型 ChiJ のアミノ酸置換の効果をより詳細に調べるため、野生型および各種変異型 ChiJ について可溶性キチン加水分解反応の動力学定数を測定した。その結果、全て

Table 2 野生型および変異型 ChiJ による可用性キチン加水分解反応における比活性および各種動力学定数

Enzyme	Specific activity toward soluble chitin (U/ $\mu$ mol)	Kinetic parameter		
		$K_m$ (mg/ml)	$k_{cat}$ (1/min)	$k_{cat}/K_m$ (ml/mg $\cdot$ min)
Wild	513	0.0875	547	6,250
P254S	643	0.140	678	4,850
N242S	841	0.202	1,140	5,670
N221I	690	0.112	775	6,940
Q153R/N349D	685	0.141	784	5,550
H281L	654	0.120	734	6,120
F272S	1,350	0.122	1,380	11,300
F272L	1,150	0.0988	1,220	12,400
I69V/P267S	665	0.118	791	6,680
W302R/D321N	782	0.187	905	4,850

の変異型 ChiJ で野生型 ChiJ に比して  $K_m$  の増加がみられ、変異型 ChiJ においては基質との親和性が低下していることがわかった (Table 2)。また、全ての変異型 ChiJ の  $k_{cat}$  は、野生型 ChiJ に比して増大していることがわかった。この  $K_m$  および  $k_{cat}$  の増大は、特に高い比活性を示した F272S および F272L において顕著であった。一方で、反応効率を表す  $k_{cat}/K_m$  については、F272S および F272L において野生型 ChiJ の 2 倍程度の向上が見られたものの、その他の変異型 ChiJ においては大きな違いは見られなかった。可溶性キチン加水分解活性が向上した変異型 ChiJ においては、むしろ基質との親和性は低下していることがわかった。

#### 4. 考察

GH ファミリー 18 に属する *Bacillus circulans* WL-12 株由来キチナーゼ A1 (ChiA1) および *Serratia marcescens* 由来キチナーゼ A (ChiA) は、酵素-基質複合体の X 線結晶構造解析がなされており、アミノ酸置換を導入した変異型酵素の性質検討により、基質結合に関与するサブサイトが同定されている [11-13]。ChiA および ChiA1 の立体構造を鋳型として構築した ChiJ CatD 領域の立体構造モデルを Fig. 3 に示す。

ChiA1 および ChiA とのアミノ酸配列相同性から、ChiJ のサブサイトには Tyr17 (-5)、Trp14 (-3)、Trp392 (-1)、Trp124 (+1) および Trp245 (+2) が存在することが推察される。そして、サブサイトを構成するこれらの芳香族アミノ

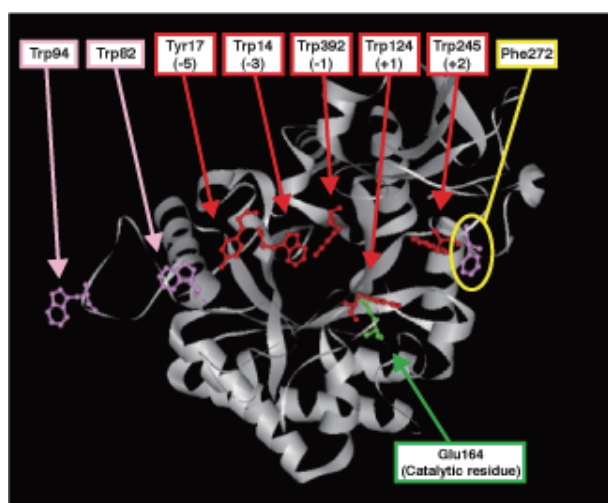


Fig. 3 ChiJ CatD 領域の立体構造モデル

Glu164 (緑色) は触媒残基、そして Tyr17 (-5)、Trp14 (-3)、Trp392 (-1)、Trp124 (+1) および Trp245 (+2) (すべて赤色) は各サブサイトを表す。

酸の近傍には、さらにいくつかの芳香族アミノ酸 (Trp94、Trp82 および Phe272) が一列に並んでおり、これらの残基の基質結合への寄与が示唆される。そのうち、Phe272 はサブサイト + 側の末端近傍に位置しているため、サブサイト + 側での基質結合を補助する役割をもつと考えられる。したがって、Phe272 が他のアミノ酸に置換されると、サブサイト + 側における基質親和性に影響を与えることが予想される。実際、Phe272 の Ser ないし Ala へのアミノ酸置換により  $K_m$  が増大したことから、基質親和性は低下したと考えられる。基質特異性の低下は、反応効率の観点からは決して望ましいことではない。一方で、これらのアミノ酸置換により加水分解後の反応産物も留まりづらくなるため、サブサイト + 側から速やかに放出され、次の反応へ移行しやすくなることも考えられる。また、Ser や Ala は Phe に比べて側鎖が短い (小さい) ため、Phe272 の Ser ないし Ala へのアミノ酸置換により、サブサイト + 側末端での芳香族アミノ酸側鎖による立体障害が消失することが予想される。F272S や F272A では  $k_{cat}$  も増大していたが、その理由として、加水分解後の反応産物がサブサイトから速やかに放出されるようになったことに加えて、サブサイト + 側からの基質の進入がスムーズに進行するようになったことなども考えられよう。

これらを総合すると、Phe272 のアミノ酸置換により、サブサイト + 側からの基質進入と加水分解後の反応産物の放出が速やかに進行するようになり、結果として反応効率向上と比活性向上が達成されたものと推察される。可溶性基質は拡散速度が高く、酵素との衝突確率も高い。したがって、酵素の基質親和性がある程度低下しても、依然として高い確率で基質との衝突が起こると考えられる。そのため、基質親和性の低下よりもサブサイト + 側からの基質進入と加水分解後の反応産物放出の効率向上の影響の方がはるかに大きく、全体として比活性が大幅に向上したと考えられよう。

これまでに、*Beauveria bassiana* および *Bacillus licheniformis* 由来 GH ファミリー 18 キチナーゼの指向性進化による比活性向上が報告されているが [14,15]、これらはいずれも中性酵素であり、アルカリ酵素の比活性向上に関する報告は本報が初めてとなる。

#### 謝辞

ダイキトサン M をご供与いただいた大日精化工業 (株) 山南隆徳博士、ならびに DNA 塩基配列解析にご協力いただいた東京工業大学オープンファシリティセンター・バイオ部門の皆様へ感謝する。

## 参考文献

- [1] 日本キチン・キトサン学会ホームページ, <http://jscc.kenkyuukai.jp/>, 2020.10.10 閲覧.
- [2] T. Fukazawa, K. Endo, *et al.*: *Chitin and Chitosan in Life Science* (Eds. T. Urugami, K. Kurita, *et al.*), pp. 428-429, Kodansha (2001).
- [3] Z. Sampei, Y. Nagao, *et al.*: *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **48** (2004) 167-168.
- [4] F. Uni, S. Lee, *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76** (2012) 530-535.
- [5] F. W. Studier: *Protein Expr. Purif.*, **41** (2005) 207-234.
- [6] K. Miyazaki: *Methods Mol. Biol.*, **231** (2003) 23-28.
- [7] T. Imoto and K. Yagishita: *Agric. Biol. Chem.*, **35** (1971) 1154-1156.
- [8] U. K. Laemmli: *Nature*, **227** (1970) 680-685.
- [9] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **193** (1951) 265-275.
- [10] S. C. Hanes: *Biochem. J.*, **26** (1932) 1406-1421.
- [11] T. Watanabe, Y. Ariga, *et al.*: *Biochem. J.*, **376** (2003) 237-244.
- [12] Y. Papanikolaou, G. Prag, *et al.*: *Biochemistry*, **40** (2001) 11338-11343.
- [13] N. N. Aronson Jr., B. A. Halloran, *et al.*: *Biochem. J.*, **376** (2003) 87-95.
- [14] Y. Fan, W. Fang, *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76** (2007) 135-139.
- [15] C. Songsiriritthigul, P. Pesatcha, *et al.*: *Biotechnol. J.*, **4** (2009) 501-509.