

多糖類分解酵素の基質結合力測定
－原子間力顕微鏡による解析－

日大生産工(院)

○福田聖人

産総研 吉川佳広

金里雅敏 田中丈士

日大生産工

柏田歩

松田清美

東大院農学生命

和田昌久

立命館生命科学

今中忠行

[緒言]

キチン(Fig. 1(a))は天然中に存在する高分子であり、主にカニやエビ、さらには昆虫や貝などの外殻に存在する。そして、セルロース(Fig. 1(b))に次いで最も多く存在するバイオマスである。このような多糖類バイオマスは、融点を持たないことから成形性に乏しく、一旦糖化してから利用する試みがなされている。糖化はそれらの加水分解酵素により行われる。まず基質である多糖類バイオマス表面に微生物由来の酵素が結合し、その後加水分解という二段階の反応により糖化が進められる。このことから、高効率かつ安定的な糖化を実現するためには、分解の起点である酵素の基質表面への結合作用を制御することが重要な点の1つであるといえる。

多くの多糖類分解酵素はほぼ不可逆的に結合することが知られている。したがって、本研究では基質結合した状態から無理矢理引き剥がすという操作で単一酵素あたりの結合力を求めることを試みた。そのツールとして最適と考えられるのが原子間力顕微鏡(AFM)である。AFMは探針を水平に(x,y)方向に走査することで表面形態を解析することのできる顕微鏡として知られている。しかし、探針を上下(z)方向に走査することで、基質-探針間の相互作用力も測定することができる。

本研究では、100℃でも生育可能な超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 由来のキチナーゼを用いた(Fig. 2)。本キチナーゼの基質結合部位(ChBD2)を AFM 探針に固定化し、基質(キチンあるいはセルロース)との間に働く作

用力を AFM フォースカーブで調べた。そして、両者を比較することで、多糖類バイオマスに対する酵素の結合メカニズムを解明することを目的とした。

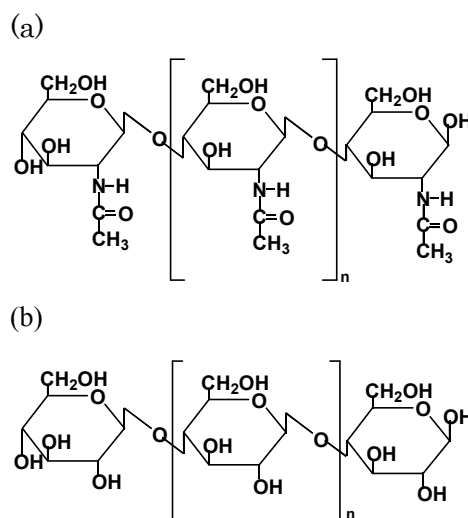


Fig. 1 Chemical structures of chitin(a) and cellulose(b).

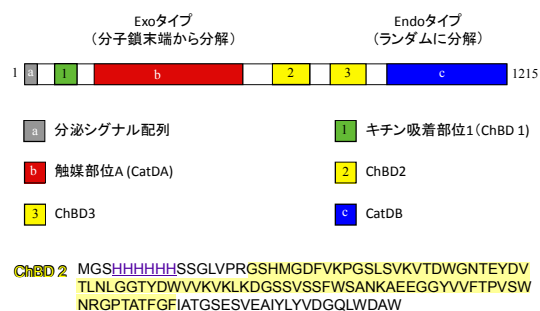


Fig. 2 Domain structure of the chitinase from *T. kodakarensis* KOD1, and amino acid sequence of His-Tagged ChBD2.

Binding Force Measurement of Polysaccharide-Degrading Enzyme
－Atomic Force Microscopic Study－

Masato FUKUDA, Yoshihiro KIKKAWA, Masatoshi KANESATO, Takeshi TANAKA, Ayumi KASHIWADA, Kiyomi MATSUDA, Masahisa WADA, and Tadayuki IMANAKA

[実験]

ChBD2 セルロース,あるいはキチンの基質結合力測定を行うため,AFM 探針に ChBD2 を固定化した。まず,オゾンクリーナーを用いてカンチレバーを洗浄した。その後,ヘキサエチレングリコールを有する分子(PEG₆COOH)をエタノールに溶解し,1 mM 溶液を調製した。そのエタノール溶液中にカンチレバーを 24 時間浸漬させた。次いで,200 mM 1-Ethyl-3-[dimethylaminopropyl]carbodiimide(EDC)と 50 mM *N*-hydroxysuccinimide(NHS)の水溶液を調整し,250 μ L ずつ混合し,上述のカンチレバーを 30 分浸漬させることにより,末端のカルボン酸を活性化させた。1mM AB-NTA(*N*-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)の水溶液を作り,カンチレバーをさらに 24 時間浸漬させることで,アミド結合により PEG₆COOH と AB-NTA を接続した。残存する活性カルボン酸をキャップするため,1 M エタノールアミン水溶液にカンチレバーを 30 分浸漬させた。そして,0.1 M NiSO₄の 0.1 M Tris-HCl (pH7.5) 溶液に浸漬した(30 分)。最後に,冷凍保存されていた *T. kodakarensis* KOD1 由来 ChBD2 の溶液にカンチレバーを 3 時間浸漬した。以上の行程で ChBD2 をカンチレバーに固定化した。このカンチレバーを用いてセルロース,あるいはキチンの薄膜に対する ChBD2 の結合力を評価した。

[結果・考察]

上述の薄膜に対し,AFM フォースカーブ測定を行った(Fig. 3)。両サンプル共に同一負荷速度で測定した。Fig. 2(a)から,ChBD2 を修飾していない探針では,非特異吸着を抑制できていることが確認できた。また,ChBD2 を固定化した AFM カンチレバーで測定した場合には, Fig. 2(b)のように複数の極小ピークを有するカーブがセルロースおよびキチン共に観察された。単一酵素当たりの基質結合力を見積もるため,フォースカーブデータを用い,ヒストグラム解析を行った。負荷速度 8 nN/s の時,セルロース-ChBD2 の結合力は 142 ± 17 pN であり,キチン-ChBD2 の結合力は 136 ± 9 pN であった。すなわち,負荷速度が同一であれば ChBD2 は

セルロース/キチンのどちらに対しても,約 140 pN で結合することがわかった。

[結論]

本研究から,ChBD2 は本来の基質ではないセルロースにも結合できることが明らかとなった。キチンとセルロースでは主鎖であるピラノース環の構造は共通であるが,側鎖構造が異なる。しかし,基質結合力がほぼ同一であることから,側鎖の構造は ChBD2 の基質結合に影響を与えていないと考えられる。したがって,ChBD2 は,その表面に露出した芳香族アミノ酸とキチン/セルロースのピラノース環との疎水性相互作用を主な相互作用として結合していることが示唆された。

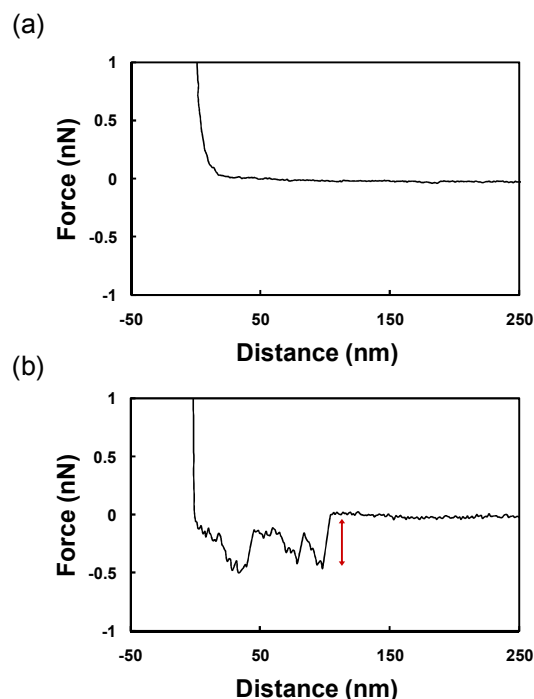


Fig. 3 Typical force curve acquired with the NTA terminated(a)and ChBD2 functionalized AFM tip(b).

[参考文献]

- 1) Y. Kikkawa, T. Tanaka, *et al. Biomacromolecules*, 9, 2126-2131 (2008).
- 2) Y. Kikkawa, M. Fukuda, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Kanetsato, *et al. Polymer Journal*, 43, 742-744 (2011).