

氏 名 Akasit VISOOTSAT

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2173 号

学位授与の日付 2020 年 9 月 28 日

学位授与の要件 物理科学研究科 機能分子科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Single-molecule analysis and engineering of chitinase A from
Serratia marcescens

論文審査委員 主 査 教授 秋山 修志

教授 飯野 亮太

教授 青野 重利

准教授 古賀 信康

研究員 安藤 潤

理化学研究所

准教授 三宅 英雄

三重大学 大学院生物資源学研究科

(Form 3)

Summary of Doctoral Thesis

Akasit VISOOTSAT

Single-molecule analysis and engineering of chitinase A from *Serratia marcescens*

Chitin is a water-insoluble polysaccharide which is a component of the shells of crustaceans, the exoskeleton of insects, and the cell walls of some fungi. Chitin degradation is not only important in nature but also industrial applications such as biomass conversion. Chitinase A from the Gram-negative bacterium *Serratia marcescens* (*SmChiA*) is a processive enzyme that hydrolyzes crystalline chitin as it moves linearly along the substrate surface. In a previous study, the catalytic activity of *SmChiA* against crystalline chitin was found to increase after the tryptophan substitution of two phenylalanine residues (F232W and F396W), located at the entrance and exit of the substrate-binding cleft of the catalytic domain, respectively. In this thesis, I used single-molecule analysis to understand the mechanism of this high-catalytic-activity mutant of *SmChiA*, and further improved chitin hydrolytic activity by generating new mutant with engineering approach based on bioinformatics, saturation mutagenesis, and robot-based automated screening.

The thesis consists of 5 Chapters. Chapter 1 is a general introduction of chitin and chitinase. In Chapter 2, single-molecule fluorescence imaging and high-speed atomic force microscopy were applied to understand the mechanism of high-catalytic-activity F232W/F396W mutant. A reaction scheme including processive catalysis was used to reproduce the properties of *SmChiA* wild-type and F232W/F396W, in which all the kinetic parameters were experimentally determined. High activity of F232W/F396W mutant was caused by a high processivity and a low dissociation rate constant after productive binding. An alignment of amino acid sequences of 258 *SmChiA*-like proteins revealed that tryptophan, not phenylalanine, is predominant at the corresponding positions (Phe-232 and Phe-396 for *SmChiA*).

In Chapter 3, I optimized the design of degenerate oligonucleotides for saturation mutagenesis and developed robot-based automated screening procedures for *SmChiA* purification and activity measurement. In order to optimize the degenerate oligonucleotides for saturation mutagenesis, the loss-of-function mutant of green fluorescence protein, GFPMut3-Y66H, was used for introducing NNN or NNB codon. Although the ratios of gain-of-function mutant (H66Y) in both colony counting and deep sequencing analysis were similar, I found that the ratios of nucleotides in the primers were highly biased among the suppliers. Biases for NNB were less severe than for NNN. The supplier which showed the least-bias for NNB primer was used in Chapter 4.

The alignment in Chapter 2 also showed that several amino acid residues in the catalytic domain are not conserved in *SmChiA*. This strongly suggests that although *SmChiA* is the most studied processive chitinase, the amino acid sequence is not optimized for high hydrolytic activity. In Chapter 4, I combined bioinformatics, saturation mutagenesis, and robot-based automated screening to further improve chitin hydrolytic activity of F232W/F396W mutant. This method allows us to reduce the number of mutation trials and shortens the screening time. As a result, I identified F232W/F396W/S538V mutant. Interestingly, valine was not found in the multiple sequence alignment at the Ser538 residue. This result indicates that my method can generate an active mutant that can not be achieved only by the introduction of mutation which is dominant in the multiple sequence alignment.

Finally, I conclude this thesis in Chapter 5. My results highlight the importance of the combination of single-molecule analysis with biochemical analysis to understand the mechanism of *SmChiA*. Although I successfully identified F232W/F396W/S538V which shows high catalytic activity, the single-molecule analysis will be required in the future to understand its mechanism in detail. This thesis will be helpful for understanding the kinetic mechanisms and further improvement of the crystalline chitin hydrolytic activity of *SmChiA* mutants. Moreover, both the single-molecule analysis and protein engineering method developed in this thesis will be also applicable to other enzymes.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名

Akasit VISOOTSAT

Title
論文題目

Single-molecule analysis and engineering of chitinase A from *Serratia marcescens*

N-アセチルグルコサミンが直鎖状に繋がったキチンは、甲殻類や昆虫等の外骨格を構成する主要物質であり、セルロースに次いで地球上に大量に存在する生物由来資源である。分子鎖が束となった安定な結晶構造(結晶性キチン)を形成するため、資源として再利用するためには高温高圧下での分解処理が必須となる。一方、生物界に目を向けると、結晶性キチンを穏和な条件下で分解し、生じた糖類を栄養源として生育する微生物が存在する。このような微生物中に見いだされるキチン加水分解酵素は、結晶性キチンを資源として再生するという観点から注目されており、基礎と応用の両面から精力的に研究されている。

出願者は、比較的に高い加水分解活性を有するセラチア菌 (*Serratia marcescens*) 由来のキチン加水分解酵素を対象とし、一分子計測と詳細な速度論的解析を用いることで、アミノ酸置換による結晶性キチン加水分解反応の高活性化機構の解明に成功した。また、キチン加水分解酵素のさらなる高活性化を指向した独自の技術開発を行うとともに、同技術を駆使した変異体スクリーニングを展開することで、野生型よりも活性の高い変異体の分子設計にも成功している。

本学位論文は、第一章を序論、第二章から第四章を本論、第五章を結論とする全五章から構成されている。

第一章では、キチンの構造、化学的特性、そして加水分解反応サイクルが示されるとともに、観察手段として用いた全反射照明蛍光顕微鏡や高速原子間力顕微鏡の動作原理が詳述されている。

第二章では、キチン加水分解酵素にアミノ酸置換を二カ所導入(Phe232Trp/Phe396Trp)することで、野生型よりも高活性化した二重変異体が調製されている。野生型および二重変異体による結晶性キチン加水分解反応を、全反射照明蛍光顕微鏡下および高速原子間力顕微鏡下で一分子計測するとともに、観察データの詳細な速度論的解析が行われている。その結果、酵素が結晶性キチン上を連続的に移動しながら加水分解する際の解離定数が、二重変異体では顕著に低下(親和性向上)していることが示されており、これが二重変異体における高活性化の主要な原因として同定されている。

第三章では、特定のアミノ酸領域にランダム変異を誘発する技術の最適化、およびキチン加水分解酵素の変異体スクリーニング過程を自動化するための技術開発が示されている。緑色蛍光タンパク質の機能喪失型変異体を用いた詳細な解析から、プライマー・ライブラリに含まれるコドンセットが供給元ごとに偏っている事実を見出している。これに基づき、変異をよりランダムに誘発するためにも、偏りが最も軽度であるライブラリを適切に選択

して用いることの重要性が指摘されている。

第四章では、上記のスクリーニング法がキチン加水分解酵素の更なる高活性化に適用されている。キチン結合領域や触媒領域におけるアミノ酸配列を様々な生物種間で比較検討し、保存度の低い8ヵ所を変異導入対象としたスクリーニングが実施されている。その結果、第二章で調製された二重変異体に、新たなアミノ酸置換(Ser538Val)を導入した三重変異体(Phe232Trp/Phe396Trp/Ser538Val)において、顕著な高活性化が確認されている。出願者は、538番目のアミノ酸にバリン(Val)を有するキチン加水分解酵素が自然界に存在しないことに基づき、アミノ酸配列解析を基盤とした分子設計だけでは実現されない高活性化が本スクリーニング法によって達成される可能性を指摘している。

第五章では、本学位論文を総括し、本研究の将来展望を述べている。

以上のように本学位論文において出願者は、キチン加水分解酵素の一分子計測や速度論的解析、および同酵素の高活性化を指向した独自の技術開発に取り組み、野生型よりもキチン加水分解活性の高い変異体の分子設計に成功しており、これら研究成果は当該分野の研究の発展に大きく寄与するものと期待される。また、本論文の成果の一部は、既に2報の査読付き国際学術誌に発表されており、国際的にも高い水準の研究であると判定できる。

以上により、本論文は博士(理学)の学位授与に値すると審査員全員一致で判断した。