



V1-ATPase およびキチナーゼ変異体のX線結晶構造解析

中村 彰彦^{1,2}, 河合 文啓¹, 飯野 亮太^{1,2,3}

- 1 自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター
2 総合研究大学院大学, 3 自然科学研究機構 分子科学研究所

1. 背景と研究目的

キチン加水分解酵素はキチンを分解しながら運動するリニアモータータンパク質であり、その機能改善の為に理論デザインとサチュレーションミュータジェネシスにより変異体の作成を行っている。作成した酵素の構造を検証する為に解析を行う。

2. 実験内容

霊菌 *Serratia marcescens* 由来キチン加水分解酵素(SmChiA および SmChiB)に対してサチュレーションミュータジェネシス、構造重ね合わせによるタンパク質デザインを行い作成した変異体(SmChiAB-Bloop、SmChiBA)の単結晶に対して温度 95-100 K において波長 1.12 Å の X 線を照射し検出器 ADSC Q315r を用いて回折像を測定した。得られたイメージは XDS を用いて解析し、CCP4 と Phenix suite 及び Coot を用いて構造モデルの作成と精密化を行った。

3. 結果および考察

SmChiA-Bloop の結晶では 3 セット(各 2.3 Å、2.6 Å、2.0 Å)の高分解能データ収集を行うことが出来た。いずれの高分解能データも事前に凍結処理を行った結晶であった。ビームラインでの結晶凍結も行ったが、10 Å 程度の分解能のデータしか得られなかった。以前測定した SmChiA 変異体では、このような分解能の低下はみられなかったことから、得られる結晶の性質は各変異体でかなり異なることが考えられる。得られた SmChiA-Bloop 高分解能データに対し、デザインした構造を鋳型とし分子置換法にて構造決定を行った。構造決定後、COOT、PHENIX を用いたモデル構築および構造精密化を行った。SmChiA-Bloop の変異部位以外は明瞭な電子密度が得られたが、しかしながら Bloop を挿入した部位は、他の分子と相互作用しない溶媒領域に露出し、かつ構造が安定化していなかった為か明瞭な電子密度を得る事ができなかった。以上の結果から、挿入 Bloop を安定化する変異や相互作用残基を追加する為の変異体スクリーニングを行っている。SmChiBA に関しては、今回初めて得られた結晶化条件からは、タンパク質の反射は得られず新たな結晶化条件の探索をする必要があり、新たにスクリーニングを行っている。(5/30, 6/27 ビームタイム分)

4. 参考文献

1. Arai S. et al., *Nature*, 493, 703-707 (2013)
2. Papanikolaou, Y. et al, *Biochemistry* 40: 11338-11343 (2001)