



## 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<sup>1,2</sup>, 河合 文啓<sup>1</sup>, 飯野 亮太<sup>1,2,3</sup>

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。

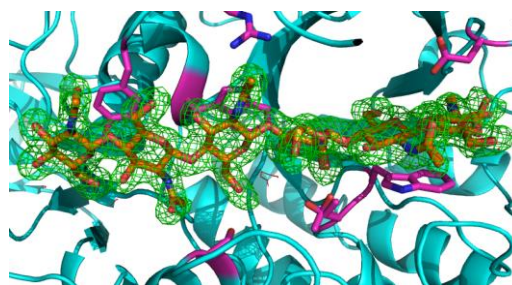
### 2. 実験内容

霊菌 *Serratia marcescens* 由来キチン加水分解酵素 SmChiA の変異体および基質との共結晶した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 の基質結合部位と活性残基に変異を入れ、その SmChiA とオリゴ糖(3 糖、4 糖、5 糖、6 糖)との共結晶およびソーキングにより複合体構造を得るために結晶を準備した。各々の結晶はビームラインでの結晶凍結を行い、波長 1.12 Å、検出器 Q315 にてデータ測定を行った。得られた各種オリゴ糖とのデータは、2.0 Å、2.4 Å、2.3 Å、2.0 Å と高分解能データを測定することができた。

SmChiA-WT の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。もっとも分解能が良く、また明瞭な電子密度が得られたオリゴ糖(6 糖)の構造を右に示す。この構造解析により、これまで明らかにされていなかった SmChiA と基質との中間状態に近い構造を得ることができ、SmChiA の一連のプロセッシングを現在議論中である。



SmChiB に SmChiA 由来のループを入れた変異体の結晶にも X 線を照射したが、15 Å 程度の分解能しか得られなかった。今回は、スクリーニングプレートからの結晶であり、結晶条件の最適化が行われていなかったため、今後この条件を元により良質な結晶を得ることを試みる。また新たにスクリーニングを行い新規条件の検討も試みる。(7/20, 8/30 ビームタイム分)

### 4. 参考文献

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