実験番号：2017N4003，N5008，N5009　（6 シフト）

BL2S1

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

キーワード：キチナーゼ、タンパク-基質複合体、キチン加水分解構造

1. 背景と研究目的

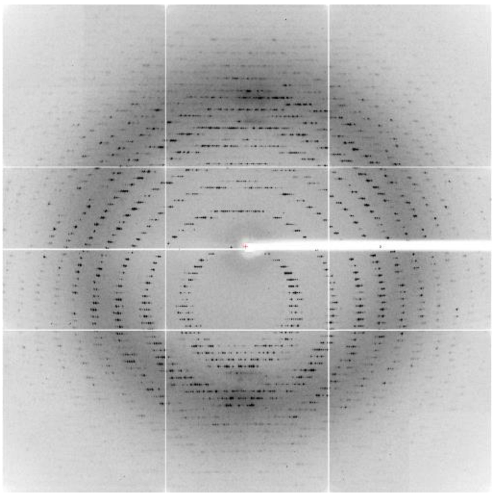
キチン加水分解酵素はキチンを分解しながら運動するリニアモータータンパク質であり、その機能改善の為に理論デザインとサチュレーションミュータジェネシスにより変異体の作成を行っている。作成した酵素の構造を検証する為に解析を行う。

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、3 糖、4 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 1.12Å、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、各 2.8Å の分解能で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。しかしながら、オリゴ糖の電子密度がはっきりとは確認できず新たにソーキング結晶の作成・データ測定を行った。高濃度オリゴ糖を結晶化ドロップに添加しソーキングする方法から、ソーキングしたいオリゴ糖の粉末を直接ドロップに添加し、30 分から 1 時間ソーキングを行う方法に変更した。その結果、これまでデータが取れていたオリゴ糖との共結晶よりも明瞭なオリゴ糖の電子密度を確認できた。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、また、各オリゴ糖での結合状態がわかりはじめ、SmChiA の一連のプロセシングを現在議論中である。



キチナーゼタンパク質結晶　回折像

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).