



海洋性バクテリア由来のマルチドメイン キチン加水分解酵素の解析

中村 彰彦
分子科学研究所

キーワード：キチナーゼ, バイオマス, 分子モーター

1. 背景と研究目的

キチンは甲殻類や昆虫、菌類などの外骨格や細胞壁の主要な構成多糖であり、地球上に多量に存在する物質である。N-アセチルグルコサミンが β -1,4結合でつながった直鎖状ホモポリマーであるが、結晶構造をとっているため化学的に非常に安定である。キチン加水分解酵素(キチナーゼ)は常温常圧で結晶性キチン上を運動しながら分解するリニア分子モーターである。陸上性のバクテリア *Serratia marcescens* 由来の酵素が最もよく研究されており、吸着ドメインと触媒ドメインが一体化した構造をしている。対して海洋性のバクテリア *Vibrio* 属に共通しているキチナーゼ(VpChi1)は、そのアミノ酸配列からC末端側に2つのフィブロネクチン Type3 様ドメイン(FN3)ともう一つのキチン吸着ドメインを持つマルチドメイン構造と推定される。生化学活性測定では、VpCh1の活性はC末端のCBMを削った変異体よりも高かった。そこでその理由を考察するため、VpChi1のX線結晶構造解析を試みている。VpCh1では結晶を得ることが難しかったため、今回はC末側のCBMとFN3ドメイン1つを欠損させた変異体の結晶を作成し、触媒ドメインと1つ目のFN3ドメインの空間配置を調べることを試みた。

2. 実験内容

VpChi1のC末側のCBMとFN3ドメイン1つを欠損させた変異体をコードする遺伝子を挿入したpET27bプラスミドで形質転換した大腸菌を培養し、IPTGで酵素の発現誘導を行った。菌体破碎液からアフィニティークロマトグラフィによって酵素を精製した。陰イオン交換カラムとゲルろ過カラムにより、更なる精製とバッファーの交換を行った。硫酸を沈殿剤、ジオキサンを添加剤として酵素の単結晶を作成し、X線の回折測定を行った。波長1.12 Å、露光時間20 sec/frame、振動角1°で360枚の回折像を取得した。

3. 結果および考察

解析の結果、格子定数 99.9 Å, 194.3 Å, 87.8 Å, 90°, 92.4°, 90°の空間群C2に属する結晶であることがわかった。以前に構造を明らかにしたN末端側の吸着ドメインと触媒ドメインの構造ファイルをテンプレートとして分子置換を行うことで位相の決定を試みた。その結果N末端側の吸着ドメインと触媒ドメインを見つけることが出来たが、目的としていたC末端側のFN3ドメインに相当する明瞭な電子密度を見つけることが出来なかった。全長VpChi1の結晶の作成が難しいことも考慮すると、FN3ドメインは比較的自由度の高い状態であると考えられる。そこで今後はFN3ドメインの自由度が下がる結晶化条件の探索、またはFN3ドメインとCBMドメインでの結晶化を試みる。

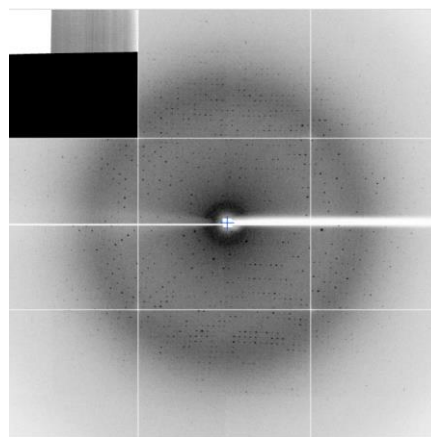


Fig.1 回折像の例