



# キチン加水分解酵素の生成物結合部位の解明

中村彰彦  
静岡大学

キーワード：バイオマス，キチン，プロセスビティ

## 1. 背景と研究目的

キチンは陸上でセルロースに次いで多量に生産されており、また海洋中では最も多い生物由来資源である。甲殻類の殻や真菌細胞壁に使用されており、生物の構造を支える重要な糖質であるため、非常に強固な結晶構造を形成する。自然界でキチンは主にバクテリアによって分解されている。中でも物理化学的に非常に安定な結晶性キチンを分解できる酵素は結晶性キチン上を1方向に運動しながらキチン分子鎖をジアセチルキトビオース単位に分解していく。セラチア菌由来キチン加水分解酵素A(SmChiA)の運動機構を解明した際に、Trp275 残基がキチン分子鎖のスライド中間体構造の形成に重要であることを発見した<sup>1</sup>。そこで天然型 SmChiA と W275A 変異体の結晶性キチン分解活性を比較したところ、W275A 変異体では基質への親和性と分解速度の低下だけでなく、天然型酵素と比較して生成物阻害の影響も大きくなっていった。対して ITC を用いたジアセチルキトビオースの結合計測では、W275 変異体は結合による熱量変化が観測できなかった。そこで Trp275 と生成物との相互作用様式の検証を試みた。

## 2. 実験内容

SmChiA の天然型酵素の C 末端側に His6 タグを付加して大腸菌を用いて発現させ、Ni アフィニティクロマトグラフィとサイズ排除クロマトグラフィにより精製した。精製した酵素はクエン酸ナトリウムを沈澱剤として結晶化した。結晶化溶液を混合する際、SmChiA 溶液に終濃度で 20 mM となるようにジアセチルキトビオースを混合し共結晶化を行った。30%グリセロールを抗凍結剤として、100 K で解凍の計測を行った。XDS を用いてデータ処理を行い、Phenix と Coot を用いてモデルの構築と精密化をおこなった。

## 3. 結果および考察

解析の結果、分解能 2.3 Å で SmChiA の構造を決定することができた。全体構造としては精度良く決定できていた。生成物であるジアセチルキトビオースが結合していると考えられるサブサイト+1 と+2 の周辺と Trp275 のインドール環付近には何らかの電子密度が観測された(Fig.1)。しかしジアセチルキトビオースまたは N-アセチルグルコサミンを当てはめることは難しいことがわかった。次回は基質濃度を高め、正確な結合様式の決定を試みる予定である。

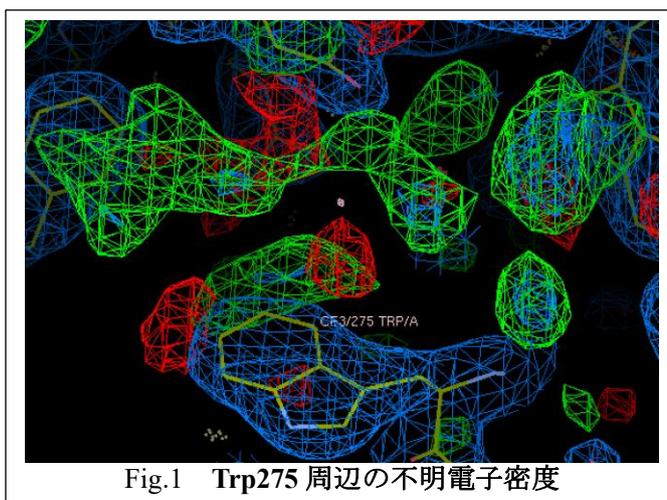


Fig.1 Trp275 周辺の不明電子密度

## 4. 参考文献

1. Nakamura A. et al., *Nat Commun*, 2018