

好熱性細菌 *Ralstonia* sp. A-471 由来の GH Family 23 に属する新規キチナーゼの構造解析

玉田太郎¹, 岡崎伸生¹, 上田光宏², 中澤昌美², 宮武和孝², 黒木良太¹
¹原子力機構, ²大阪府立大学

キチンは多くの生物に含まれている天然の素材であり、地球上における年間の生産量は 10^{11} トンとも言われているが、そのほとんどが廃棄物となっている。しかしながら、キチンが加水分解されてできたオリゴ糖は、抗菌活性効果や免疫賦活作用、抗腫瘍活性などの機能を持ち様々な分野で利用可能であるため、生物資源としてのキチンの有用性に注目が集まっている。最近、我々は好熱性細菌からキチン分解活性を有する新規酵素 (*Ralstonia* Chitinase: Ra-ChiC) のクローニングに成功した[1]。Ra-ChiC はキチン結合ドメインと触媒ドメインの2つから構成されており、触媒ドメインにはガチョウ型リゾチームの活性部位であるグルタミン酸残基が保存されていたが、ドメイン全体でのアミノ酸相同性は 18% 程度と低く、活性測定の結果、リゾチーム活性は確認されずキチナーゼ活性のみが確認された。また、Ra-ChiC は pH5~10 の広い範囲で安定性を示し、さらに 60°C でも充分活性を示す耐熱性酵素であり、産業応用に適した性質を有していた。我々は Ra-ChiC が如何にして有為なキチナーゼ活性を発揮するかを理解することを目的として、Ra-ChiC の立体構造解析に取り組んでいる。

Ra-ChiC の大腸菌発現系による組換え酵素の大量発現・調製に成功し、引き続き実施した結晶化スクリーニングおよび条件最適化の結果、0.1mm 角程度の結晶を取得した。Se-Met 化した Ra-ChiC 結晶を用いて、多波長異常分散法解析のための回折データを収集し、位相決定および分子モデル構築に成功した。引き続き、Native 結晶からの回折データを用い、1.9 Å 分解能で結晶学的 R 値 20%(freeR 値 24%)まで精密化を終了した。今回の構造解析から、Ra-ChiC の触媒ドメインのすべてとドメイン間のリンカーの大部分の構造を明らかにできた。触媒ドメインは 7 本のヘリックスから構成されており、うち 5 本ヘリックスについてはガチョウ型リゾチームの立体構造と類似していた。ガチョウ型リゾチームの触媒残基であるグルタミン酸残基は Ra-ChiC において側鎖を含め立体的によく保存されていた(Glu141)。ガチョウ型リゾチームで活性に関与していると考えられる 2 つのアスパラギン酸については、Ra-ChiC においては 1 つは立体的にはほぼ似た箇所にグルタミン酸として存在していた(Glu162)のに対し、もう 1 つは主鎖構造から完全に異なっていた。これらの違いがキチナーゼ活性とリゾチーム活性の違いを創出していると考えられた。

[1] Ueda, M et al, (2009) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81, 1077-1085