

好熱性細菌由来新規キチナーゼの構造解析 Crystal structure of a novel chitinase from *Ralstonia* sp. A-471

○有森 貴夫¹、岡崎 伸生¹、中澤 昌美²、宮武 和孝²、
上田 光宏²、玉田 太郎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 C: Ra-ChiC) のクローニングに成功した。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、触媒ドメインはガチョウ型リゾチームと 18% 程度のアミノ酸相同性を有している。しかしながら、Ra-ChiC の活性測定の結果、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。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 の触媒ドメインの大量発現・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。さらに、キチンオリゴ 2 糖との共結晶化にも成功し、1.5 Å 分解能で結晶学的 R 値 18% (freeR 値 22%) まで精密化を終了した。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 本の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)。一方、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ている 2 つのアスパラギン酸残基については、Ra-ChiC では 1 つは立体的にほぼ似た箇所にグルタミン酸として存在し (Glu162)、もう 1 つは一次構造上全く異なる位置にあるアスパラギン酸が、3 次構造上で近い位置に存在していた (Asp226)。さらに、Ra-ChiC では Asp226 が存在する長いループ領域が活性部位を覆うような構造をしており、ガチョウ型リゾチームと比較して基質結合ポケットを狭めていた。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。