

## AFM フォースカーブ測定によるキチナーゼ 1 分子の相互作用解析

日大生産工(院)		○福田聖人
産総研 吉川佳広	金里雅敏	田中丈士
日大生産工	柏田歩	松田清美
東大院農学生命		和田昌久
立命館生命科学		今中忠行

## [緒言]

セルロースやキチンは、天然に豊富に存在する多糖類バイオマスであり、生可能な有機資源として注目されている。しかし、これら多糖類バイオマスは融点を持たないことから成形性が乏しいため、一旦糖化してから有効利用する試みがなされている。糖化プロセスは、各加水分解酵素により行われる。まず基質である多糖類バイオマス表面に微生物由来の酵素が結合し、その後加水分解という二段階の反応により糖化が進められる。このことから、高効率かつ安定的な糖化を実現するためには、分解の起点である酵素の基質表面への結合作用を制御することが重要な点の1つであるといえる。

多くの多糖類分解酵素はほぼ不可逆的に結合することが知られている。そこで、本研究では基質結合した状態から無理矢理引き剥がすという操作で酵素一分子における結合力を求めることを試みた。そのツールとして最適と考えられるのが原子間力顕微鏡(AFM)である。AFMは常温、液中条件での測定が可能であり、10 pNオーダーで引力および斥力を測定することが可能である。そのため、AFMのこの特性を活かし、フォースカーブ測定により酵素一分子レベルの測定を行った。

本研究では、キチン分解酵素であるキチナーゼの基質結合ドメイン(ChBD)がセルロースやキチンの多糖類基質表面にどのような結合様式をとるのかをAFMを用いて分析した。

## [実験]

AFMで酵素-セルロース、キチン間の基質結合合力測定を行うため、AFM探針に酵素を固定した。まず、ヘキサエチレングリコール有する分子(PEG<sub>6</sub>COOH)1 mM溶液を調製し、その

溶液にカンチレバーを24時間浸漬させた。次いで、200 mM 1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide(EDC) と 50 mM N-hydroxysuccinimide(NHS) の水溶液を調製し、その後カンチレバーを30分浸漬させることにより、末端のカルボン酸を活性化させた。1 mM AB-NTA(*N*-(5-amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic acid) の水溶液にカンチレバーをさらに24時間浸漬させることで、アミド結合により PEG<sub>6</sub>COOH と AB-NTA を接続した。残存する活性カルボン酸をブロックするため、1 M エタノールアミンにカンチレバーを30分浸漬させた。そして、0.1 M NiSO<sub>4</sub> の 0.1 M Tris-HCL(pH7.5)溶液に浸漬した(30分)。最後に、冷凍保存されていた *T. kodakarensis* KOD1由来ChBDの溶液にカンチレバーを3時間浸漬した。以上の行程でChBDをカンチレバーに固定化した。このカンチレバーを用いてセルロース、及びキチンの膜に対するChBD2の結合力を評価するためAFMフォースカーブ測定を行った(Figure 1)。

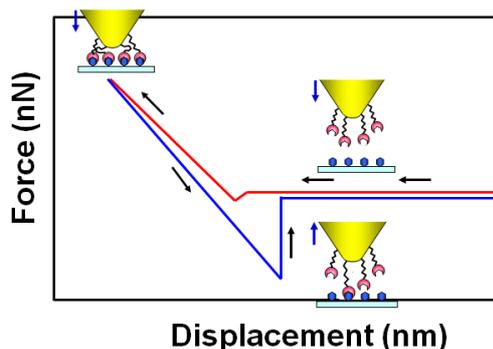


Figure 1 Schematic illustration of AFM set-up and force curve.

Single Molecular Interaction of Chitinase Binding Analyzed by AFM Force Curve Measurement.

Masato FUKUDA, Yoshihiro KIKKAWA, Masatoshi KANESATO, Ayumi KASHIWADA, Kiyomi MATSUDA, Masahisa WADA, Tadayuki IMANAKA, and Takeshi TANAKA

[結果・考察]

AFMフォースカーブ測定を行った結果、複数の極小を有するピークが、セルロース及びキチン共に観察された(Figure 2)。

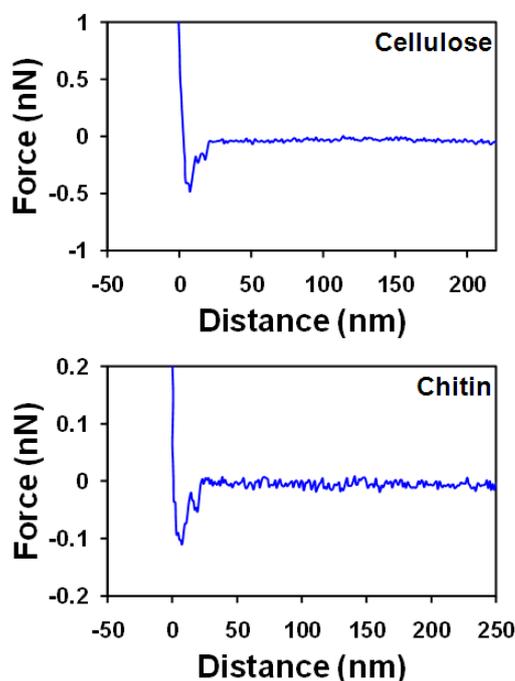


Figure 2 Typical force curves acquired with the ChBD functionalized AFM tips.

この測定を、負荷速度を変えながら数百から数千回に及び行い、ChBD単一の基質結合力をヒストグラム解析により求めた(Figure 3)。その結合力はセルロースの場合、負荷速度7.5 nN/sのとき110±24 pNであることがわかった。また、キチンの場合では、負荷速度8.4 nN/sのとき107±19 pNであった。すなわち、負荷速度がほぼ同一であればChBDはセルロース、及びキチンのどちらに対してもほぼ同一の力で結合することがわかった。

また、ChBDのホモロジーモデリングより、ChBDはタンパク質表面の特定の面に1列になって芳香族アミノ酸残基が露出しており、これら芳香族アミノ酸残基が多糖類のピラノース環に直接スタックしていると考えられる。このことから、ChBDの結合メカニズムはChBD中の芳香環と多糖類ピラノース環との疎水性相互作用により結合することが示唆された。すなわち、セルロースとキチンの側鎖構造は、ChBDの結合に影響を与えていないと考えられた。

ChBDの結合力は、負荷速度に依存するため、Bell-Evans modelに基づき有効結合長及び解離速度定数の各パラメーターを、セルロース及びキチンに対してそれぞれ算出した。

ChBDの有効結合長と解離速度定数は、セルロース及びキチンのどちらに対してもほぼ同一であることがわかった。したがって、ChBDはセルロース及びキチンの両方に対して同一の結合様式で結合していることが示唆された。

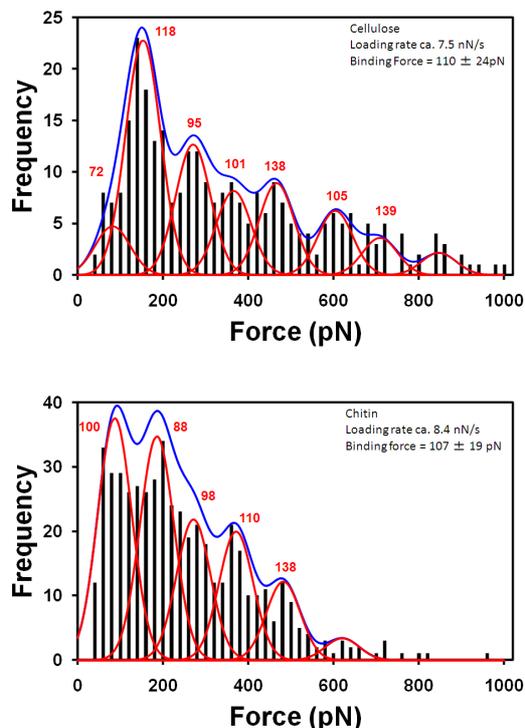


Figure 3 Histograms of pull-off force for ChBD. The black and gray curves are corresponding to The FFT-smoothed and following Gaussian fitted data, respectively.

[結論]

本研究から、負荷速度が同等であればChBDはセルロース及びキチンのどちらに対してもほぼ同一の結合力であることがわかった。また、ChBDの結合メカニズムは、ChBD中の芳香環と多糖類ピラノース環との疎水性相互作用により結合する。すなわち、セルロースとキチンの側鎖構造は、ChBDの結合に影響を与えていないと考えられた。

[参考文献]

- 1) Y. Kikkawa, T. Tanaka, *et al.* *Biomacromolecules*, 9, 2126-2131(2008).
- 2) Y. Kikkawa, M. Fukuda, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Kanetsato, *et al.* *Polymer Journal*, 43, 742-744(2011).