S3-5

Structural and Biophysical Studies of Chitooligosaccharide Translocation through Chitoporin from the Marine Bacterium *Vibrio harveyi*

Wipa Suginta

School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand 30000. Tel 0066 44 22 6187, E-mail: wipa@sut.ac.th.

VhChiP is a sugar-specific porin isolated from the outer membrane of the marine bacterium *Vibrio harveyi*. VhChiP is responsible for the uptake of chitin oligosaccharides, with particular preference for chitohexaose. In this study, six crystal structures of VhChiP were solved to highest resolution of 1.90 Å. The overall structure of VhChiP consists of typical barrel-like folds with 16 anti-parallel strands connecting together with eight extracellular loops and seven short periplasmic turns. The structures in the presence of chitohexaose show that the six sugar rings of the sugar chain stretch fully along the channel lumen and interact exclusively with several polar residues locating on the surface the protein interior. Three sugar rings are found to completely stack against Trp123, Trp136, and Trp331 on one side, and Phe84 on the other side of the channel. These residues are thought to contribute significantly to strong affinity towards the sugar ligand. Electrophysiological measurements demonstrate that Trp136, located at the mouth of the VhChiP pore, plays an important role in controlling the ion conductivity, binding affinity and sugar permeability of the VhChiP channel. Kinetic analysis of sugar translocation obtained from single channel recordings indicates that the Trp136 mutations W136A, W136D, W136R and W136F considerably reduce the binding affinity of the protein channel towards chitohexaose. Data obtained from liposome swelling assays confirm that the Trp136 mutations decrease the rate of bulk chitohexaose permeation through the VhChiP channel.

Supported by Suranaree University of Technology and the Thailand Research Fund

S3-6

溶液 NMR 法と X 線結晶解析によるキトサン結合モジュールとキトサンの相互作用解析

近畿大院・農・バイオ¹, 大阪府大・生命環境², 福井県大・生物資源³, 福井工大・工⁴, 産総研・バイオメディカル⁵ (* 現、阪大蛋白研)

○新家 稔子^{1*}, 西村 重徳², 北奥 喜仁¹, 木元 久³, 草桶 秀夫⁴, 沼田 倫征⁵, 大沼 貴之¹, 深溝 慶¹

【目的】多くの糖質加水分解酵素は、触媒モジュールに加えて、対応する基質と特異的に結合する糖質結合モジュール(CBM)をもつ。福井県の土壌より単離された *Paenibacillus* sp. IK-5 は、グルカナーゼ活性とキトサナーゼ活性の両方を示す糖質加水分解酵素を産生し、遺伝子解析の結果、本酵素は GH ファミリー-8 に属する触媒モジュールに加え、C 末端側に CBM ファミリー-32 に分類される 2 つの CBM (DD1 および DD2) をもつことがわかった(Kimoto et al. 2002)。DD1 と DD2 の種々のオリゴ糖に対する結合性を調べた結果、両者はキトサンに対する特異性が高く、これまでに報告例のない特徴的な CBM であることがわかった。さらに、等温滴定型熱量計(ITC)を用いてキトサンオリゴ糖[(GlcN)_n]との結合力を調べた結果、DD1 は DD2 よりも強くキトサンを結合することがわかった(Shinya et al. 2013)。本研究では、このような結合力の差をもたらす構造的な要因を明らかにするため、NMR 溶液構造解析と X 線結晶構造解析により、DD1 および DD2 のキトサン結合様式を解明することを試みた。

【方法】大腸菌発現系により DD1 と DD2 の安定同位体(¹³C/¹⁵N)ラベル化蛋白質を調製し、2 次元および 3 次元 NMR スペクトルの測定を行い、主鎖および側鎖シグナルを帰属した。DD1 と DD2 それぞれについて、¹⁵N-edited NOESY および ¹³C-edited NOESY を測定し、収集した 931 個(DD1)と 849 個(DD2)の NOE 情報に基づき、CYANA プログラムを用いて溶液構造計算を行った。一方、大腸菌発現系により得た DD1 と DD2 の結晶化を行い、X 線結晶構造解析を行った。得られた溶液構造と結晶構造に基づいてキトサン結合に関与するアミノ酸残基を推定し、そのアミノ酸残基の変異体を調製し、ITC を用いて(GlcN)_nとの結合能を評価した。

【結果】溶液構造解析の結果、DD1 と DD2 とともに 2 枚のβ-シートをコアにもち、その上下に突き出したいくつかのループ構造を有することがわかった。NMR による化学シフト擾動法に基づき(GlcN)_n結合部位を推定したところ、DD1 と DD2 とともに、β-シート構造の上部のループ領域に結合することが明らかになった。さらに、X 線結晶構造解析により、遊離の DD1 の結晶構造と、DD2 の(GlcN)₃との複合体構造を明らかにすることに成功した。(GlcN)₃の DD2 への結合様式は非常に特徴的であり、非還元末端糖残基がループの隙間に突き刺すように結合していた。また、DD2 の Tyr36 のフェノール性水酸基が、非還元末端糖残基のアミノ基と中央の糖残基の C6 の水酸基と水素結合を形成していた。NMR 滴定実験の結果と結晶構造に基づき DD1 と DD2 のキトサン結合に関わるアミノ酸残基を比較したところ、36 番目のアミノ酸残基が DD2 では Tyr であるのに対し DD1 では Glu に置換していた。そこで、DD1 の Glu36 を Tyr (DD1-E36Y)に、DD2 の Tyr36 を Glu (DD2-Y36E)に置換した変異体を調製し、ITC によりキトサン結合実験を行った。その結果、DD1-E36Y はキトサンに対する結合力が DD1 よりも低下し、DD2-Y36E では DD2 よりも高まった。以上より、DD1 と DD2 のキトサン結合力の差をもたらす要因は、36 番目のアミノ酸置換であることが明らかになった。DD1 のより大きな結合力は、Glu36 のカルボキシル基と糖残基のアミノ基との塩橋形成によるものかもしれない。現在、DD1 と(GlcN)_nとの結合様式についてより詳細な解析を行っている。

Kimoto, H. et al. J Biol Chem 277, 14695-702 (2002).

Shinya, S. et al., J. Biol. Chem., 288, 30042-53, (2013).