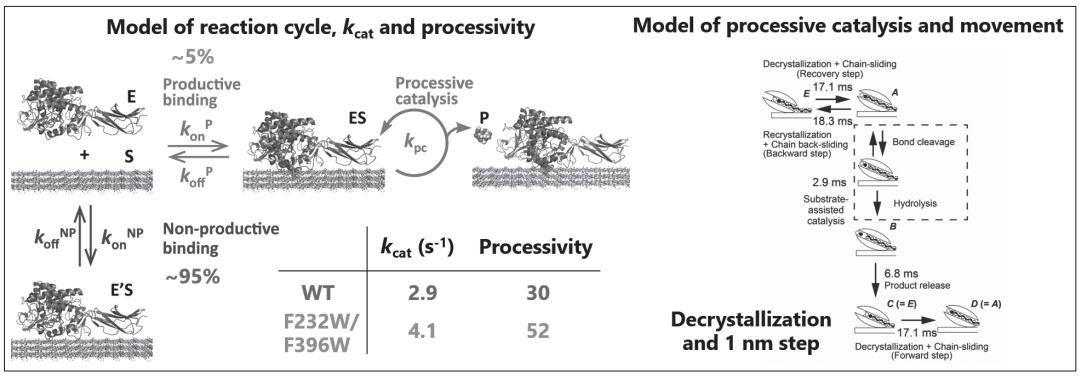
結晶性高分子分解酵素の反応サイクルの１分子イメージング解析

飯野　亮太
自然科学研究機構分子科学研究所

プロセッシブキチナーゼは、結晶性キチンの表面を一方向に運動しながらキチン鎖を水溶性の二糖に分解する。本酵素は固液界面における不均一系反応を触媒し、水溶性分子を基質とする酵素の均一系反応を仮定した生化学解析でその機構を完全に理解することは困難である。

１分子イメージングは、個々のプロセッシブキチナーゼのキチン表面への結合解離やキチン表面での一方向性運動といった反応素過程を直接観察することができる。我々は、全反射型蛍光顕微鏡および高速原子間力顕微鏡を用いた１分子イメージングで、*Serratia marcescens*由来のキチナーゼA（SmChiA）による結晶性キチン分解の反応サイクルの全貌を明らかにした[1),2)]。結合速度定数、解離速度定数、運動速度、プロセッシビティ（分解反応の連続性）等のパラメーターの定量計測に成功し、キチン表面に結合したSmChiAのほとんど（~95%）は一方向性運動を行わずキチンを分解せずに解離することを明らかにした。また、野生型よりキチン分解活性が高いF232W/F396W変異体は、プロセッシビティが増加するため活性が向上していることを明らかにした。

我々はさらに、金ナノ粒子をプローブとする高速高精度１分子イメージングを用い、SmChiAがキチン鎖を連続的に分解しながら一方向に運動する際の素過程（二糖の長さに対応する１nmのステップ、停止時間、バックステップの頻度）を定量計測することに成功した[3)]。キチンオリゴ糖を結合した変異体の結晶構造解析や全原子分子動力学シミュレーションと組み合わせた統合的解析により、SmChiAは自ら退路を断って前進するBurnt-Bridge型ブラウニアンラチェットであること、運動の律速はキチン表面からキチン鎖を引きはがす脱結晶化であることを解明した。



Single-molecule imaging analysis of the reaction cycle of enzymes decomposing crystalline polymers

Ryota Iino, Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences

Serratia marcescens Chitinase A (SmChiA) is a processive enzyme that hydrolyzes crystalline chitin while moving unidirectionally on its surface. Here we applied single-molecule imaging with total-internal reflection fluorescence microscopy and high-speed atomic force microscopy to understand its reaction cycle. We found that most SmChiA (~95%) bound to chitin surface do not move and dissociate without hydrolyzing chitin. We then applied high-speed/high-precision single-molecule imaging using gold nanoparticle probe to understand the mechanism of unidirectional motion. We revealed that SmChiA operates as a burnt-bridge Brownian ratchet, and decrystallization of the single chitin chain from crystal surface is the rate-limiting step of movement.

References

1) Nakamura et al., Phys. Chem. Chem. Phys. 20, 3010-3018 (2018)
2) Visootsat et al., J. Biol. Chem. 295, 1915-1925 (2020)
3) Nakamura et al., Nat. Commun. 9, 384 (2018)