

糖質加水分解酵素ファミリー19 キチナーゼのフォールドをもつ植物タンパク質の構造と機能

Structure and function of plant proteins having a family GH19 chitinase fold

大沼貴之, 深溝 慶

近畿大学農学部バイオサイエンス学科

Takayuki Ohnuma and Tamo Fukamizo

Kindai University, 3327-204 Nakamachi, Nara 631-8505, Japan

1 はじめに

キチンを加水分解する酵素であるキチナーゼ (EC 3.2.1.14) は、アミノ酸配列の相同性に基づいて糖質加水分解酵素ファミリーの 18 と 19 に分類されている (<http://www.cazy.org/>)。キチナーゼをコードする遺伝子は植物に普遍的に存在し、イネやシロイヌナズナには同酵素をコードする遺伝子がゲノム DNA 上に数十個あることが明らかになっている。しかし、植物はキチナーゼの基質となるキチン質 (キチンやキトサン) を有していないことから、植物キチナーゼの基質や同酵素の植物における生理的役割についてはよくわかっていない。

近年、植物のキチナーゼ様タンパク質がキチンだけでなく、細胞壁の構成多糖であるセルロースやヘミセルロース (主にキシログルカン) に結合性を示すことが報告されている。キチナーゼ様タンパク質は N 末端に細胞膜貫通領域を有し、ファミリー19 キチナーゼのアミノ酸配列に高い相同性を示すものの、キチナーゼ活性に必須な活性中心のグルタミン酸が他のアミノ酸に置換されており、キチンの加水分解活性を欠いている。キチナーゼ様タンパク質の遺伝子を破壊したイネやシロイヌナズナの変異株は野生株に比べて矮性で、正常な植物細胞よりも著しく薄くもろい細胞壁をもつことも報告されている。これらの結果から、植物のファミリー19 キチナーゼおよびその関連タンパク質が植物の細胞壁の主要構成糖であるセルロースやヘミセルロースに結合し、その構築に関与することが示唆されている。

本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナに見いだされた四つのファミリー19 キチナーゼ関連タンパク質 (二つの遊離型ファミリー19 キチナーゼと二つの膜貫通型ファミリー19 キチナーゼ様タンパク質) の構造機能解析を行うことを目的としている。すなわち、(1) 四つのタンパク質の立体構造、(2) 四つのタンパク質と結合する糖鎖の種類、(3) タンパク質-糖鎖複合体の立体構造および糖鎖認識機構、(4) 四つのタンパク質の糖鎖分解活性の有無、の四点を明らかにし、植物の細胞壁構築メカニズムの一端を明らかにすることを目的としている。

2 実験

本年度はシロイヌナズナの遊離型ファミリー GH19 キチナーゼ At1g02360 の大腸菌を用いた発現系の構築と、得られた組換え型タンパク質の機能解析、結晶化および立体構造決定を行った。At1g02360 の成熟タンパク質をコードする領域の発現には pRam N-His Vector を使用し、発現用大腸菌には SHuffle T7 を用いた。精製タンパク質の濃度を 5 mg/ml に調製後、結晶化をシッティングドロップ蒸気拡散法により行った。初期結晶化条件のスクリーニングは 480 条件で行った。その結果、0.2 M Calcium chloride, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350 pH7.0 を沈殿剤として用いた時、良質な結晶を得た。

3 結果および考察

At1g02360 の立体構造を、ライムギ種子キチナーゼ RSC-c (PDB 4DWX) をサーチモデルとした分子置換法により 1.4 Å 分解能で決定した (図1)。空間群は $P2_1$ 、結晶の格子状数は $a=74.5$, $b=58.4$, $c=48.1$ Å であった。

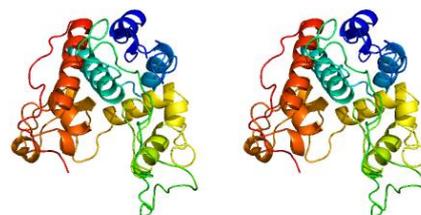


図1 : シロイヌナズナファミリーGH19 キチナーゼの結晶構造のステレオ図

At1g02360 の立体構造は 10 個の α -ヘリックスおよび 6 個のループ構造からなり、6 loop-type のファミリー GH19 キチナーゼであることがわかった。本タンパク質の構造はライムギ種子およびパパイヤ由来ファミリー GH19 キチナーゼ (PDB 4DWX および 3CQL) の立体構造と非常によく似ており [1][2]、主鎖間における r.m.s.d 値はそれぞれ 0.811 と 0.606 であった。

4 まとめ

ロイヌナズナに見いだされた四つのファミリー19 キチナーゼ関連タンパク質（二つの遊離型ファミリー19 キチナーゼと二つの膜貫通型ファミリー19 キチナーゼ様タンパク質）の内、遊離型ファミリー19 キチナーゼの一つ At1g02360 の立体構造を決定した。本酵素は 6 loop-type の GH19 キチナーゼであることが明らかになった。

謝辞

PF スタッフの方々には心よりお礼申し上げます。

参考文献

- [1] T. Ohnuma *et al.*, *FEBS Lett.*, **587**, 2691-5697 (2013).
[2] J. Huet *et al.*, *Biochemistry*, **47**, 8283-8291 (2008).

成果（オプシオン）

1. 大沼 貴之，日本応用糖質科学会平成 27 年度奨励賞「キチン質分解酵素の構造と機能および利用に関する研究」

* ohnumat@nara.kindai.ac.jp