

# 不凍活性を示すライムギファミリーGH19 キチナーゼ CHT9 の立体構造 Crystal structure of chitinase-antifreeze protein CHT9 from rye, *Secale cereale*

高島智也, 深溝 慶, 大沼貴之\*

近畿大学農学部バイオサイエンス学科

〒631-8505 奈良県奈良市中町 3327-204

Tomoya Takashima, Tamo Fukamizo, Takayuki Ohnuma

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

## 1 はじめに

不凍タンパク質は一般に 1) 熱ヒステリシス (凍結温度と融解温度の差), 2) 氷の再結晶阻害, 3) 氷の結晶形制御の内少なくともいずれか一つの特性を示すため, 食品や細胞の凍結障害の改善に利用することが提案されている。これまでに, 魚類等動物由来の不凍タンパク質については冷凍食品の品質保持, 細胞の冷凍保存耐性の向上の効果が確認されたことから, 食品分野, 工業分野および医療分野で実用化されつつある。また, 近年これら不凍タンパク質の分子構造や不凍機能のメカニズムの解明がなされている。一方一部の植物タンパク質にも不凍活性が認められ, 不凍タンパク質として, 上市, 実用化されている。しかし, それらの分子レベルでの研究はほとんど進んでおらず, 単離・精製された不凍タンパク質を用いた不凍活性評価や立体構造解析に関する知見が不足している。植物由来の不凍タンパク質は, 分子サイズやアミノ酸配列が動物由来のものとは異なっていることから, 新たな耐凍性メカニズムが明らかにされることが予測されている。

カナダの Dr. Griffith の研究グループはライムギに耐凍性を付与するタンパク質に注目し, 不凍活性を示すタンパク質分子として, 2 種のファミリーGH19 キチナーゼの同定, 単離および遺伝子クローニングに成功した[1,2]。このタンパク質は不凍活性の他にキチナーゼ活性に由来する抗真菌活性を示すことから, 実用における有用性も期待される。本研究では, ライムギに見いだされた 2 種のファミリーGH19 キチナーゼの内, クラス I 型キチナーゼ CHT9 の触媒ドメインの立体構造の決定を行った。

## 2 実験

本年度はライムギ由来ファミリーGH19 キチナーゼ/不凍タンパク質である CHT9 (Accession no. AAG53609) 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結晶化および立体構造の決定を行った。

CHT9 の触媒ドメインをコードする遺伝子は, 遺伝子合成により得た。その際大腸菌での発現効率の向上を期待して, コドンを最適化した遺伝子を合成した。CHT9 の発現には pRam N-His Vector

(Lucigen 社) を使用し, 発現用大腸菌には Shuffle T7 株 (New England Biolabs) を用いた。結晶化は精製した CHT9 の濃度を 5 mg/ml に調製後, シッティングドロップ蒸気拡散法により行った。結晶化条件の初期スクリーニングは 480 条件で行った。結晶化の温度は 20°Cで行った。その結果 Hampton Research 社 Index39 (0.1 M HEPES pH7.0, 30% v/v Jeffamine® ED-2001 pH 7.0) を使用した条件下で良質な結晶を得た。

## 3 結果および考察

CHT9 の立体構造をライムギ種子ファミリーGH19 キチナーゼ RSC-c (PDB 4DW) をサーチモデルとした分子置換法により 1.4Å 分解能で決定した (図 1) [3]。空間群は P3, 結晶の格子定数は a=110.4, b=110.4, c=36.0Å であった。

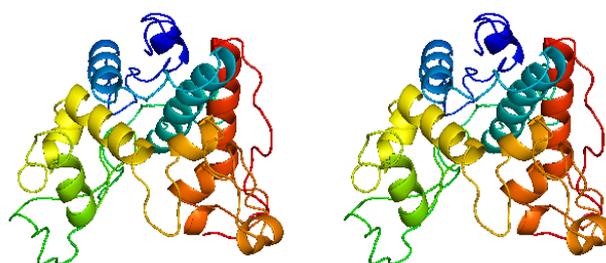


図 1 : CHT9 の結晶構造のステレオ図

CHT9 の立体構造は 10 個の  $\alpha$ ヘリックスと 6 個のループ構造からなり, 6 loop-type (loopful 型) ファミリーGH19 キチナーゼの構造を有していることがわかった。全体の構造は上記の RSC-c およびオオムギキチナーゼ (PDB 1CNS), パパイヤキチナーゼ (PDB 3CQL) と非常によく似ており, RSC-c との主鎖間における r.m.s.d 値は 0.383Å であった。

## 4 まとめ

植物由来の不凍タンパク質の立体構造を初めて決定した。CHT9 全体のフォールドは, これまでに決定されたファミリーGH19 キチナーゼと非常によく似ており,  $\alpha$ ヘリックスに富んだ構造を有していた。

今後他の GH19 キチナーゼとの比較および変異導入実験を行うことにより、CHT9 の不凍活性発現メカニズムの解明が期待される。

謝辞

PF スタッフの方々には毎回測定時お世話になっております。この場を借りてお礼申し上げます。

参考文献

- [1] H. Wai-Ching *et al.*, *Plant Physiol.*, **109**, 879 (1995).
- [2] Y. Sansun *et al.*, *Plant Physiol.*, **124**, 1251 (2000).
- [3] T. Ohnuma *et al.*, *FEBS J.*, **279**, 3639 (2012)

\*ohnumat@nara.kindai.ac.jp