

## 植物 NADPH oxidase N 末端ドメインの X 線結晶構造解析

○小田 隆<sup>1</sup>、林 ころろ<sup>2</sup>、児嶋 長次郎<sup>2</sup>、橋本 博<sup>1</sup>、川崎 努<sup>2</sup>、島本 功<sup>2</sup>

佐藤 衛<sup>1</sup>、清水敏之<sup>1</sup>

( 横浜市立大学<sup>1</sup>、奈良先端科学技術大学院大学<sup>2</sup> )

$O_2^-$ 、 $\cdot OH$ 、 $H_2O_2$  など、一般に活性酸素種と呼ばれるものは細胞に傷害を引き起こすものとして知られているが、その一方でこれらの分子種をシグナル伝達など様々な場面で利用する系も存在する。植物には Rboh と呼ばれる 6 回膜貫通型の NADPH oxidase が存在し、分子状酸素から  $O_2^-$  を生成する。近年 Rboh が植物の防御応答やアブシジン酸による気孔の閉鎖、根毛の生長など植物の生育の様々な場面でその役割を果たすことが示唆されている。とりわけ防御応答での活性酸素種の重要性は知られており、Rboh は病原体感染の初期段階で速やかに活性酸素種を生成し、その後の一連の防御応答を誘導すると考えられている。Rboh は哺乳類の食細胞に存在する NOX2 / gp91<sup>phox</sup> と呼ばれる NADPH oxidase のホモログであるが、その制御機構は異なるようである。Rboh は NOX2 / gp91<sup>phox</sup> には存在しない細胞質の N 末端領域を持つ。N 末端領域は、 $Ca^{2+}$  結合モチーフである EF-hand motif を 2 つ含み (EF1 および EF2)、 $Ca^{2+}$ 、低分子量 G タンパク質 Rac、Calcium dependent protein kinase (CDPK) によるリン酸化の制御を受ける。我々は、N 末端領域の中でも EF-hand motif を含むドメインが制御ドメインであると考え、構造解析と活性化機構の解明を目的として研究を行っている。

今回我々は、KEK フォトンファクトリーのビームライン BL-5A を利用して Rboh N 末端ドメインの構造解析を行った。結晶構造中で Rboh は EF2 を互いにスワップする形でダイマーを形成していた。ゲルろ過分析の結果からこのダイマー化は  $Ca^{2+}$  の有無によらないことが示された。また、Rac との相互作用も  $Ca^{2+}$  に依存しないことが pull down assay により示された。しかし、CD スペクトル測定では Rboh N 末端ドメインの  $Ca^{2+}$  依存的な構造変化が観測された。結晶構造中で  $Ca^{2+}$  は EF1 にのみ結合していることから考えて、 $Ca^{2+}$  による Rboh の制御には EF1 による構造変化が重要であることが推測される。また、今回の構造解析では 2 つの EF-hand motif のほかにさらに 2 つの EF-hand 類似の構造を発見した。これらの発見は制御機構解明の手がかりになるものと期待される。