

## 平成 24 年度 研究経過報告書

### 研究者名

大沼 貴之

### 研究課題名

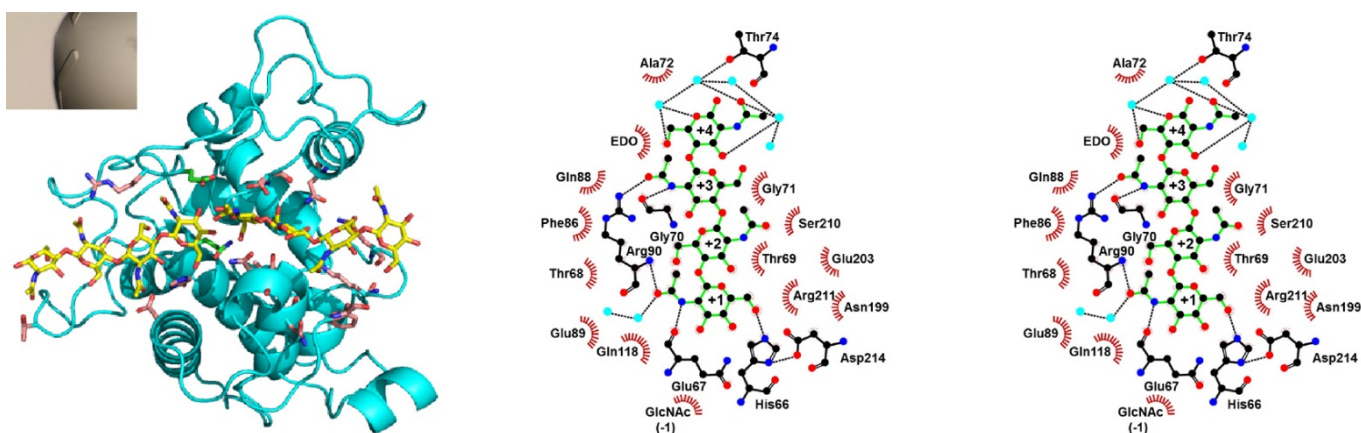
植物の細胞壁合成に関与するキチナーゼ様タンパク質 CTL の機能解析

### 研究目的・内容

近年、植物の生産するキチナーゼ様タンパク質 CTL (Chitinase-like protein) がアポプラストに分泌され、セルロースやヘミセルロースに結合することにより細胞壁合成に関与することが報告されている。本研究では植物キチナーゼ関連タンパク質の立体構造および糖認識機構を明らかにし、植物の細胞壁合成メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

### 研究の経過

植物から得られたキチナーゼおよびキチナーゼ様タンパク質の立体構造を決定するため、精製タンパク質の結晶化およびX線構造解析を試みた。タンパク質の結晶化条件の初期スクリーニングはそれぞれ約 500 条件下で行い、結晶はシッティングドロップ蒸気拡散法により 20 °C で成長させた。その結果、沈殿剤として 0.01 M zinc sulfate、0.1M Mes (pH 6.5)、25-30% poly(ethylene glycol) monomethyl ether 550 を用いた条件下で、約 3 週間後ロッド状のライムギ種子キチナーゼの結晶を得た (図 A)。得られた結晶を用いて高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory において、放射光による回折実験を行った。キチナーゼの立体構造は先に構造決定がなされたオオムギキチナーゼの立体構造 (PDB code 1CNS) をサーチモデルとした分子置換法により、1.8Å の分解能で決定した。さらにキチナーゼと糖との複合体構造を決定するために再度タンパク質を精製し、各種糖との共結晶化を行った。その結果約 2 週間後、キチンオリゴ糖 4 糖および 5 糖との共結晶を得た。



A キチナーゼと(GlcNAc)4 2分子複合体の立体構造 B サブサイトプラス側の基質結合様式 C サブサイトマイナス側の基質結合様式

結晶構造解析を行ったところ、結晶はキチナーゼに(GlcNAc)42 分子がサブサイトプラス側およびマイナス側にそれぞれ結合したキチナーゼ - 基質複合体であることがわかった。このタイプのキチナーゼタンパク質の立体構造は、1993年にテキサス大学の Robertus らのグループによって報告されている。また、これまでに他の植物から得られた数種のキチナーゼの構造決定も行われているが、今日に至るまで酵素 - 基質複合体の結晶が得られなかったことから、本酵素の糖認識機構の詳細は不明であった。今回決定した複合体の立体構造から、このタイプのキチナーゼの基質結合サブサイトの完全なマッピングに成功し、その全貌を初めて明らかにすることができた (図 B および C)。

### 本研究と関連した今後の研究計画

- キチナーゼとキチンオリゴ糖 5 糖および 6 糖複合体の立体構造の決定
- CTL タンパク質と各種糖鎖 (セロオリゴ糖、キシログルカンオリゴ糖) との相互作用解析 (蛍光分光)

度計、等温滴定熱量計、NMR 滴定実験、CD スペクトルを指標にした熱変性実験による)。

- CTL タンパク質の結晶化と X 線結晶構造解析。
- CTL タンパク質と (相互作用が確認された) 各種糖鎖との複合体構造の決定。

(平成 25 年 3 月 31 日現在)