

平成 年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	高等植物の構造多糖合成に関わるキチナーゼ様タンパク質の機能構造解析	
研究者所属・氏名	研究代表者：大沼貴之 共同研究者：	

1. 研究目的・内容

高等植物存在するキチナーゼおよびキチナーゼ様タンパク質の機能構造解析を行うことにより、細胞壁合成メカニズムの一端を構造生物学的に明らかにする。

2. 研究経過及び成果

モデル植物であるシロイヌナズナに存在するファミリーGH19 キチナーゼのアミノ酸配列をコードする4遺伝子 (At1g02360、At4g01700、At1g05870、At3g16920) を、シロイヌナズナ緑葉から抽出した mRNA の逆転写によって合成した cDNA ライブラリーからそれぞれ PCR によりクローニングした。At1g05870 と At3g16920 の推定アミノ酸配列を TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) で解析した結果、N 末端側に 24 と 27 個のアミノ酸残基からなる膜貫通領域が存在することが示されたことから、両タンパク質は膜タンパク質であることが示唆された。それ故、タンパク質の発現実験および機能解析は、膜貫通領域以降の細胞外ドメインを用いて行うことにした。

増幅した遺伝子は発現ベクター pETBlue-1 に TA クローニングにより連結後、タンパク質発現用大腸菌ホストである SHfulle pLacI と SoulBL21 pLacI に導入し、リコンビナントタンパク質の発現実験を行った。SDS-PAGE によりタンパク質の発現確認を行ったところ、各リコンビナントタンパク質は、大腸菌体内で生産されていることが確認された。

ナガハリガネゴケ由来ファミリーGH19 キチナーゼ (BcChi-A) と基質であるキチンオリゴ糖 4 糖との複合体構造を 1.0 Å の高分解能で決定した。野生型キチナーゼの結晶が得られなかったことから、不活性変異体 BcChi-A E61A とキチンオリゴ糖 4 糖の共結晶作製を試みたところ、構造解析に適した結晶が得られた。複合体構造を調べた結果、キチンオリゴ糖 4 糖は Glu61(実際には Ala61)と Glu70、および Ser120 で形成される活性中心を跨いだ形でサブサイトの -2、-1、+1、-2 に結合していることがわかった (図1)。これは、ファミリー19 キチナーゼに基質であるキチンオリゴ糖が触媒基を跨いで結合するところを捉えた初めての構造である (図2)。

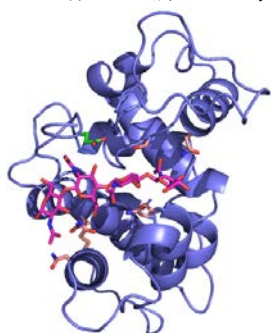


図1 BcChi-A E61A と(GlcNAc)₄複合体

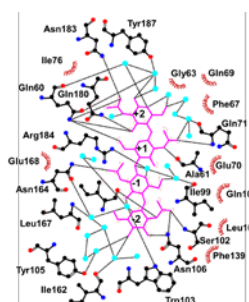


図2 BcChi-A E61A と(GlcNAc)₄の結合様式

本研究と関連した今後の研究計画

- 1) X線結晶構造解析によるシロイヌナズナキチナーゼ様タンパク質 (AtCTL1 と AtCTL2) の立体構造の決定。
- 2) ITC (等温滴定量熱計) 滴定実験によるキチナーゼ様タンパク質と結合する糖鎖分子 (結合糖鎖) の同定および結合糖鎖との結合様式 (結合定数、結合比、結合の熱力学的パラメータ) の決定。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
11 th Carbohydrate Bioengineering Meeting	口頭	2015.7.