

植物キチナーゼに存在する LysM ドメインの構造と糖結合特性

○北奥喜仁¹、沼田倫征²、平良東紀³、深溝 慶¹、大沼貴之¹

(¹近畿大院農・バイオ、²AIST・バイオメディカル、³琉球大・亜熱帯生物資源)

Lysin motif (LysM)ドメインは糖質結合モジュール (Carbohydrate Binding Modules: CBM) ファミリー50 に分類されるタンパク質で、約 50 アミノ酸残基からなる $\beta\alpha\beta$ フォールドをもち、キチンおよびその類縁糖質に対して特異的に結合する。LysM ドメインは主に細菌の溶菌酵素において見出されているが、植物がもつキチンエリシター受容体タンパク質 (CERK1) の細胞外領域や、真菌が植物免疫応答を阻害するために産生するエフェクタータンパク質 (Ecp6) 中にも見出されており、植物-微生物間相互作用のインターフェースにおいて、重要な役割をもつものと考えられている。しかし、その糖認識の分子機構の全容は明らかではない。本研究では、植物の生体防御において機能していると考えられる植物キチナーゼ中の LysM ドメインの構造を決定し、キチンオリゴ糖との相互作用に寄与する機能構造について調べた。研究対象としては、スギナ (*Equisetum arvense*) が産生する糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー18 キチナーゼ、EaChi-A 中の LysM ドメインを用いた。

EaChi-A は、N 末端の LysM ドメインと C 末端の GH18 に分類される触媒ドメインをもつ。まず、EaChi-A および EaChi-A の LysM 欠損型変異体 (EaChi-A cat) を大腸菌発現系で発現・精製した。HPLC を用いて、EaChi-A および EaChi-A cat によるキチンオリゴ糖分解産物を分析したところ、LysM ドメインの欠損が、キチン分解活性を低下させることがわかった。一方、大腸菌発現系を用いて EaChi-A の LysM ドメイン (EaChi-A LysM) だけの発現を試みたが、発現が認められなかった。そこで、チオレドキシニン融合型 LysM を発現させ、TEV プロテアーゼを用いて LysM ドメインのみを遊離、精製した。X 線結晶構造解析により EaChi-A LysM の結晶構造を 2.5 Å で決定した。EaChi-A LysM は LysM ドメインに特徴的な $\beta\alpha\beta$ フォールドをもち、触媒ドメインとは独立して折りたたまれていることがわかった。等温滴定型熱量計 (ITC) を用いて EaChi-A LysM とキチンオリゴ糖の結合実験を行ったところ、EaChi-A LysM は 3 糖から 6 糖のキチンオリゴ糖と結合することがわかった。このことから、EaChi-A LysM とキチンオリゴ糖の結合が、EaChi-A のキチン分解活性に影響を与えることが示唆された。核磁気共鳴法 (NMR) を用いて、キチンオリゴ糖の滴定実験を行い、キチンオリゴ糖との相互作用に関与するアミノ酸残基を、結晶構造上にマッピングしたところ、既にキチンオリゴ糖との複合体の X 線結晶構造が報告されている CERK1 LysM2 (PDB ID: 4EBY) や Ecp6 LysM (PDB ID: 4B8V)、および細菌の溶菌酵素である NlpC/P60 中の LysM (PDB ID: 4UZ3) と同様の部位でキチンと結合することがわかった。この結果に基づき、キチナーゼがもつ LysM ドメインと他の機能をもつタンパク質がもつ LysM ドメインの構造と機能の比較を行った。