

キチンを加水分解するキチナーゼは、CAZy (Carbohydrate Active enZymes) データベースにおいて GH18 と 19 に分類されている。様々な生物種が GH18 を生産しているのに対し、GH19 は植物と一部の細菌のみに見出されている。植物においてキチナーゼをコードする遺伝子は一般的に遺伝子ファミリーとして存在しており、構成的にもしくは誘導により複数種の GH18 および 19 遺伝子が発現されている。しかし、キチンを構成成分として有していない植物が、なぜ多様なキチナーゼを生産しているのか？という点については、現在でもよくわかっていない。演者らは植物から様々なキチナーゼを得、それらの反応特異性や立体構造を明らかにしてきた。本講演ではその過程で得られた知見に加え、それらを用いたキチンオリゴ糖の化学-酵素合成法についても報告する。

GH19 キチナーゼの立体構造は 1993 年に最初に報告されたものの、その後基質との複合体の結晶が得られず、酵素の基質結合様式や触媒反応機構に対する理解が十分に進んでいなかった。演者らは GH19 キチナーゼの酵素-基質複合体構造の決定に初めて成功し報告した (*FEBS Lett.* 587, 2691-7, 2013)。その結果 GH19 キチナーゼには分子量の大きいループ付加型と小さいループ欠損型が存在し、前者の基質結合サブサイトは幾つかのループ構造によって延長され、 $-4 \sim +4$ の 8 サイト、後者は $-2 \sim +2$ の 4 サイトであることを明らかにした。また得られた構造と変異体の解析から、酵素の触媒基と基質結合に重要なアミノ酸残基を同定し、これまでに推定されていた加水分解機構を実証する実験データを得た。さらに得られた構造情報を基に GH19 キチナーゼに変異を導入し、グライコシターゼへの変換を行った。その結果、キチンオリゴ糖 4 糖と 7 糖を合成することができるグライコシターゼの作出に成功した (*Biochem J.* 444, 437-43, 2012)。

植物由来の GH18 キチナーゼには、分子量の小さいクラス III 型と大きいクラス V 型があることが知られている。演者らはこれまでに未決定であったクラス V 型キチナーゼの立体構造を決定した。構造の比較から、クラス V 型はクラス III 型と細菌由来のマルチドメイン型 GH18 キチナーゼの中間的な構造であることがわかり、酵素の分子進化の過程で構造ドメインの取捨選択が行われたことを示した (*Plant Mol Biol.* 75, 291-304, 2011)。また、糖転移活性を示すクラス V 型キチナーゼの同活性をもたらす構造的要因を明らかにした。さらにクラス V 型キチナーゼの活性中心近傍の +1 サブサイトに Trp 残基を導入することにより、糖転移活性が強められ、この変異型酵素が長鎖のキチンオリゴ糖の酵素合成に有用であることを示した (*Glycobiology.* 23, 81-90, 2013)。

キチンに結合性を示す糖質結合モジュールには、CBM2、5、12 や 18 がありよく研究されているが、LysM ドメインと呼ばれるタンパク質がキチンに特異的に結合することを示した。また、結晶構造決定および NMR と ITC を用いた滴定実験の結果から、LysM ドメインにおけるリガンド結合部位を決定した (*J Biol Chem.* 283, 5178-87, 2008)。以上の結果から、LysM ドメインを CBM50 として新たに CAZy に登録した。

以上の研究成果は多くの共同研究者および学生らの協力によって得られたものであり、その代表として本奨励賞を拝受させていただきます。これまでご指導いただいた先生方、公私にわたりご支援いただいた方々に心より御礼申し上げます。