

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850066

研究課題名(和文)植物の細胞壁構築に関するキチナーゼ様タンパク質CTLの構造と機能

研究課題名(英文)Structure and function of chitinase-like proteins involved in cell wall biosynthesis.

研究代表者

大沼 貴之(OHNUMA, Takayuki)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：60446482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナが発現するキチナーゼ様(CTL, Chitinase-like)タンパク質AtCTL1とAtCTL2およびイネ由来CTLタンパク質OsCTL1は、それぞれN末端シグナル配列、膜貫ドメイン、糖質加水分解酵素ファミリーのGH19キチナーゼ様ドメインとC末端領域から成る。本研究では、AtCTL1とAtCTL2のGH19キチナーゼ様ドメインのみをグルタチオンS-トランスフェラーゼおよびユビキチン様タンパク質との融合タンパク質として、大腸菌を用いた発現システムにより生産することに成功した。また、カラムクロマトグラフィーにより、SDS-PAGEにおいて均一なまでに精製した。

研究成果の概要(英文)：AtCTL1, AtCTL2 and OsCTL1 are CTL, chitinase-like, proteins from Arabidopsis and rice (*Oryza sativa*). They consist of an N-terminal signal sequence, transmembrane region, GH19 chitinase-like domain, and C-terminal extension. We expressed the GH19 chitinase-like domains of AtCTL1 and AtCTL2 as fusion protein with glutathione S-transferase and SUMO protein, respectively, and purified them to homogeneity as judged by SDS/PAGE.

研究分野：生化学

キーワード：chitinase-like protein

### 1. 研究開始当初の背景

キチナーゼ (EC3.2.1.14) は、N-アセチルグルコサミンが $\beta$ -1,4 結合で連なった多糖であるキチンを加水分解する酵素である。植物にはキチンが存在していないが、ほぼ全ての陸上植物において、キチナーゼや酵素の活性中心付近のアミノ酸置換により加水分解活性を欠失したキチナーゼ様 (CTL) タンパク質の発現が認められている。それ故、植物キチナーゼや CTL タンパク質の内在性基質の同定とともに、それらの生理的役割について興味もたれてきた。

近年になって、CTL タンパク質がシロイヌナズナの正常な成長と発達に不可欠であることが明らかにされてきた。Hauser らや Kwon らは、シロイヌナズナの CTL タンパク質の一つである AtCTL1 をコードする *atctl1* 遺伝子の変異が細胞の異形、エチレンの過剰生産やリグニンの異常蓄積、および根の伸長阻害や地上部の矮性化をもたらすことを報告した (Hauser *et al.*, *Development*, 1995; Kwon *et al.*, *Plant J.*, 2007)。また、Zhong らは *atctl1* 変異体において細胞壁成分である結晶性セルロースの含量が減少し、ヘミセルロースの組成変化が起こっていることを示した (Zhong *et al.*, *Plant Cell*, 2002)。このような表現型をもたらす分子メカニズムについてはよくわかっていないものの、現在までに AtCTL1 がアポプラストに分泌されることと、細胞内における AtCTL1 がセルロース合成酵素複合体と共に局在することが明らかにされている。最近、Sánchez-Rodríguez らは AtCTL1 と AtCTL2 (70%配列相同) を用いた糖鎖アレイ実験の結果、両 CTL タンパク質は細胞壁のアルカリ抽出画分 (主にヘミセルロースを含む)、不溶性画分 (主にセルロースを含む) およびキチンに結合し、さらにセルロースやキシログルカンにも強く結合することを示した (Sánchez-Rodríguez *et al.*, *Plant Cell*, 2012)。また、単子葉および双子葉植物のヘミセルロースの組成は異なるが、*ctl* 遺伝子の変異はどちらの植物の生育にも影響を及ぼすことも報告されている (Wu *et al.*, *Plant Physiol.*, 2012)。これらの結果から、CTL タンパク質は植物細胞壁におけるセルロース微繊維の合成とセルロース - ヘミセルロース間の架橋構造形成に参与することが強く示唆されていた。

### 2. 研究の目的

近年、バイオマス有効利用の観点から、主に微生物が生産するセルラーゼを中心とした植物細胞壁分解酵素群の構造と機能に関する研究が強力に推し進められてきており、これまでに植物細胞壁の中で結晶化度の高い成分であるセルロースや、複雑な構造をもつヘミセルロースの分解機構も明らかにされつつある。一方、植物自身による細胞壁構築のメカニズムについては、まだ

よく理解されていない。本研究ではシロイヌナズナとイネが発現する CTL タンパク質 AtCTL1 (At1g05850) と AtCTL2 (At3g16920) および OsCTL1 (Os09g0494200) の機能構造解析を行うことを目的としている。CTL タンパク質はシロイヌナズナとイネの正常な生育に必要なタンパク質であり、糖質加水分解酵素 (GH、Glycoside Hydrolase) ファミリー 19 に分類されるキチン分解酵素であるキチナーゼと高い配列相同性を有している。これらのタンパク質はセルロース微繊維の合成とセルロース - ヘミセルロース間の架橋構造形成に参与することにより、正常な細胞壁を構築することが示唆されているが、その詳細な分子メカニズムはよくわかっていない。

### 3. 研究の方法

(1) 各 CTL タンパク質は一次構造から N 末端シグナル配列、膜貫通ドメイン、GH19 キチナーゼドメインおよび C 末端領域からなる。本研究ではまず、大腸菌を用いて膜貫通ドメイン以降の GH19 キチナーゼドメインと C 末端領域から成るタンパク質 (GH19C-term) の発現系構築を行った。AtCTL1 および AtCTL2 をコードする遺伝子はシロイヌナズナ緑葉から作製した cDNA ライブラリーから PCR クローニングによって増幅した。OsCTL1 は人工合成遺伝子として取得し、大腸菌でのタンパク質発現効率が上昇するように使用コドンを変更した。タンパク質発現ベクターの構築は迅速に行うために Lucigen 社の Expresso Rhamnose Cloning and Expression System を用い、pRam N-His ベクターに相同組み換えによってクローニングし、*E. coli* 10G 内で構築した。GH19 キチナーゼは分子内に 3 つのジスルフィド結合を有することから、CTL タンパク質の GH19 キチナーゼドメインも同様の構造を有するものと予測し、発現には細胞質でのジスルフィド結合の形成と異性化能が高い大腸菌 SHuffle T7 を用いて行った。同様の実験を GH19C-term から C-term を欠損させた GH19 キチナーゼドメイン (GH19) のみを用いて行った。

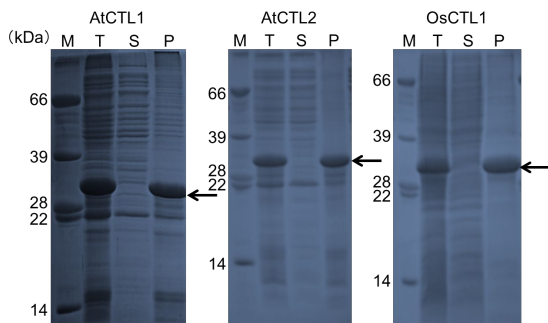
(2) CTL タンパク質の分泌発現による簡便な発現 - 精製系構築を目的として、AtCTL1 の GH19C-term のプレビバチルス (*Brevibacillus*) 発現系を構築した。発現系の構築は、BIC 法 (*Brevibacillus In vivo Cloning* 法) を用いて、GH19C-term のコード領域を pBIC1 にクローニングした。また、プレビバチルス菌体内での発現も行った。

(3) AtCTL1 と AtCTL2 の GH19 をそれぞれユビキチン様タンパク質およびグルタチオン S 転スフェラーゼとの融合タンパク質として発現した。発現した融合タ

ンパク質はそれぞれ SUMO プロテアーゼとエンテロキナーゼによって消化し、グルタチオンセファロースと Ni-NTA カラムを用いたクロマトグラフィーにより、それぞれタグタンパク質を除去した。

#### 4. 研究成果

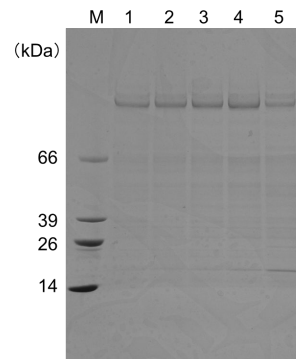
(1) 取り扱った全ての CTL タンパク質 AtCTL1、AtCTL2、OsCTL1 の GH19C-term を大腸菌 10G と SHuffleT7 を用いて発現させた結果、可溶性タンパク質としてではなく、機能を示さない不溶性のタンパク質として発現された。可溶性タンパク質としての発現を期待して、発現誘導用ラムノースを添加してから大腸菌の培養を低温の 15 °C で行ったが、状況は改善されなかった(図1)。次にアミノ酸配列から CTL タンパク質の立体構造を予測した結果、C-term は二次構造を取らないフレキシブルな構造を取ることがわかった。そこでこの領域を欠損させた GH19 キチナーゼドメイン (GH19) のみを同様の条件下で発現させたが、すべて不溶性タンパク質として発現された。



(図1) 大腸菌 SHuffleT7 によって 15 °C で発現させた AtCTL1、AtCTL2、OsCTL1 の SDS-PAGE。M、分子量マーカー；T、全量タンパク質；S、可溶性画分；P、沈殿画分

(2) BIC 法を用いて AtCTL1 の GH19C-term を発現ベクター pBIC1 にクローニングし、培地中への分泌発現を試みたが、タンパク質の発現は確認されなかった(図2)。また、pBIC1 上の菌体外発現を促す分泌シグナルのコード領域よりも上流に AtCTL1 の GH19C-term をクローニングすることにより、ブレバチルス菌体内への発現を試みたが、菌体破碎液の可溶性画分にも不溶性画分にも発現は確認されなかった。

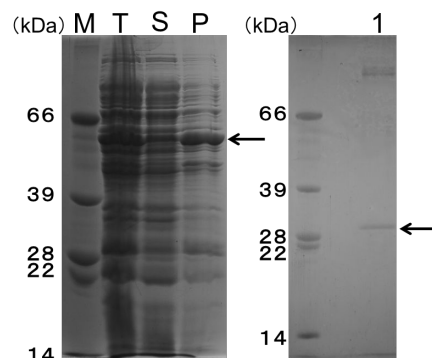
(3) pET41Ek/LIC ベクターを用いて AtCTL1 の GH19 をグルタチオン S トランスフェラーゼとの融合タンパク質として発現させたところ、大腸菌 SHuffleT7 内で可溶性タンパク質として発現された。発現された融合タンパク質を含む大腸菌抽出液



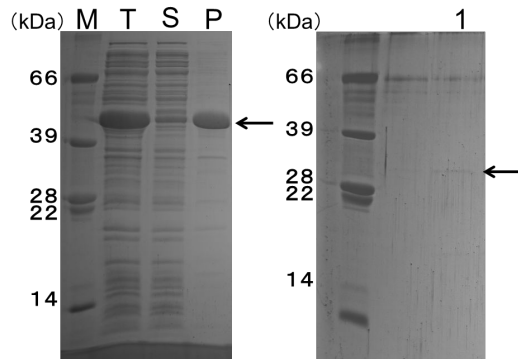
(図2) ブレバチルスを用いた AtCTL1GH19C-term の菌体外への発現。M、分子量マーカー；1~6 はコロニーナンバー。

をグルタチオンセファロースカラムに供することにより、融合タンパク質の精製を行った。精製した融合タンパク質はエンテロキナーゼによる消化を行った後、再度グルタチオンセファロースカラムに供した。その結果カラムの素通り画分に精製 AtCTL1GH19 を回収した。(図3)

pRam SUMO ベクターを用いて AtCTL2 の GH19 をユビキチン様タンパク質 (Small ubiquitin-related (like) modifier) との融合タンパク質として発現させたところ、大腸菌 SHuffleT7 内で可溶性タンパク質として発現された。発現された融合タンパク質を含む大腸菌抽出液を Ni-NTA カラムに供することにより、融合タンパク質の精製を行った。精製した融合タンパク質は SUMO プロテアーゼによる消化を行った後、再度 Ni-NTA カラムに供した。その結果カラムの素通り画分に精製 AtCTL2GH19 を回収した(図4)。



(図3) GST 融合 AtCTL1GH19 の大腸菌 SHuffleT7 による発現確認と、グルタチオン S トランスフェラーゼカラムを用いた精製後の AtCTL1GH19 の SDS-PAGE。M、分子量マーカー；T、全量タンパク質；S、可溶性画分；P、沈殿画分。1；精製した AtCTL1GH19。



(図4)SUMO融合 AtCTL2GH19 の大腸菌 SHuffleT7 による発現確認と、Ni-NTA カラムを用いた精製後の AtCTL2GH19 の SDS-PAGE。M、分子量マーカー；T、全量タンパク質；S、可溶性画分；P、沈殿画分。1；精製した AtCTL12GH19。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

大沼 貴之 (OHNUMA Takayuki)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：60446482

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：