

## LysM domain のキチンオリゴ糖認識機構の解明

((独) 生物研・植微ユニット、琉球大学・農学部)

岡村英保、大沼貴之、翁長章子、平良東紀、○加藤悦子

NMR analysis of chitooligosaccharide binding to LysM domain of *Pteris ryukyuensis* chitinase

National Institute of Agrobiological Sciences<sup>1</sup>, Ryukyu University<sup>2</sup>

Hideyasu Okamura<sup>1</sup>, Takayuki Ohnuma<sup>1</sup>, Shoko Onaga<sup>2</sup>, Toki Taira<sup>2</sup>, and Etsuko Katoh<sup>1</sup>

The LysM domain probably binds peptidoglycans, but how it does so has yet to be described. For this report, we measured the thermal stabilities of recombinant LysM domains derived from *Pteris ryukyuensis* chitinase-A (PrChi-A) and monitored their binding to *N*-acetylglucosamine oligomers ((GlcNAc)<sub>n</sub>) using isothermal titration calorimetry, and NMR spectroscopy. We thereby characterized certain of the domains' functional and structural features. We determined solution structure of LysM domain and monitored by NMR spectroscopy, allowed us to identify the domain residues that are critical for (GlcNAc)<sub>5</sub> binding. The binding site is a shallow groove formed by the N-terminal part of helix 1, the loop between strand 1 and helix 1, the C-terminal part of helix 2, and the loop between helix 2 and strand 2. Furthermore, mutagenesis experiments reiterate the critical involvement of Tyr72 in (GlcNAc)<sub>n</sub>/LysM domain binding. Ours is the first report describing the physical structure of a LysM oligosaccharide-binding site based on experimental data.

[序論]LysM domain は約 40 アミノ酸残基からなる比較的小きなドメインである。これまで原核および真核生物由来のペプチドグリカン分解酵素やキチナーゼ、植物における根粒菌形成に関与する Nod Factor や植物病原菌に対する防御応答を引き起こすキチンオリゴ糖エリシターのレセプター細胞外ドメインとして機能していることが報告されている。しかし、LysM domain の立体構造の報告例は少なく、そのリガンド認識機構は不明である。本研究では琉球シダ植物由来キチナーゼ(PrChi-A)の LysM domain の溶液構造を決定し、キチンオリゴ糖との相互作用について解析を行った。

Key words : NMR, LysM, *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), 等温滴定型カロリメトリー(ITC)

おかむらひでやす、おおぬまたかゆき、おながしょうこ、たいらとうき、かとうえつこ

## [方法]

NMR測定サンプルは 0.8 mM  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体を用いた。NMR測定は、Bruker社製 AV600 およびAV500 を用い 300 Kにて測定を行った。構造計算はCYANAを用いた。

## [結果と考察]

### 1. 立体構造解析

NOE から 782 個の距離情報、TALOS から 56 個の $\phi$ 、 $\psi$ 、13組の水素結合情報、3組の s-s 結合情報を収集し、CYANA を用いて構造計算を行った。その結果、2本の $\beta$ ストランドからなる逆平行ベータシートを2本の $\alpha$ ヘリックスが裏打ちする $\beta\alpha\alpha\beta$  fold を形成していることが明らかとなった。この構造は、すでに報告されている大腸菌由来の MltD LysM domain と類似していた (Fig.1 a)。

### 2. LysM domain と(GlcNAc)<sub>5</sub>の相互作用

NMR滴定実験により、LysM domain と(GlcNAc)<sub>5</sub>の相互作用解析を行った。その結果、(GlcNAc)<sub>5</sub>の結合部位は、N末の helix 1 と、 $\beta$  strand 1とhelix 1をつなぐループ、およびC末のhelix 2 と、helix 2 とstrand 2をつなぐループにより形成された溝であることが分かった(Fig.1 b)。またこの部分に存在する、Tyr72 が(GlcNAc)<sub>n</sub>/LysM 複合体形成に重要であることが予測された。その結果を元にY72F変異体を作成し、ITC実験により結合活性を測定した結果、明らかにTyr72 が(GlcNAc)<sub>n</sub> の認識に重要であることがわかった。また、LysM domainは多くの場合重複して存在することが知られている。そこで、LysM domainがタンデムに存在する蛋白質を作成し、NMR滴定実験を行った。しかし、現在のところ、LysM domainがタンデムに存在することによる糖鎖認識機構に明確な差は得られていない。

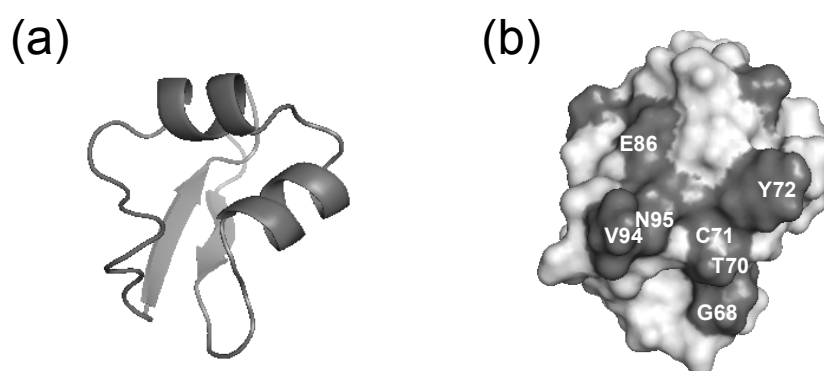


Fig. 1 The solution structure (a) and surface structure (b) of LysM domain. Residues whose amide backbone resonances were significantly perturbed owing to the presence of bound (GlcNAc)<sub>5</sub>, are colored black.