

Coprinopsis cinerea 由来 α -L-アラビノフラノシダーゼ *CcAbf62a* の立体構造 Structure of an α -L-Arabinofuranosidase from *Coprinopsis cinerea*, *CcAbf62a*

殿塚隆史*, 田中祐太郎, 奥山舜朔, 宮崎剛亜, 西河淳, 吉田誠

東京農工大学大学院農学府, 〒183-8509 府中市幸町 3-5-8

Takashi Tonozuka*, Yutaro Tanaka, Shunsaku Okuyama, Takatsugu Miyazaki, Atsushi Nishikawa
and Makoto Yoshida

Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu 183-8509, Japan

1 はじめに

我々のグループでは、担子菌の木質腐朽能に着目し、キノコ研究のモデル生物である、*Coprinopsis cinerea* のセルロース分解機構の研究を行っている[1]。糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 62 に属する α -L-アラビノフラノシダーゼは、キシラン鎖に α -1,2-および α -1,3-結合している L-アラビノフラノースを、加水分解により遊離させる性質を持ち、ヘミセルロースの分解を担う酵素である。GH62 の酵素ファミリーは 2 つのサブファミリー GH62_1 と GH62_2 に分類される。GH62_2 の酵素は数多いのに対し GH62_1 は比較的マイナーな酵素であるが *C. cinerea* は GH62_1 の酵素を 3 つも有しており、このような生物は他に知られておらず興味深い。本研究では、*C. cinerea* の GH62 酵素の 1 つである *CcAbf62a* の触媒ドメインの構造を決定した[2]。

2 実験

CcAbf62a の触媒ドメインの cDNA を pET21a プラスミドに組み込むことにより発現ベクターを構築した。大腸菌で酵素の生産を行い、精製は Ni-NTA アガロースによるアフィニティークロマトグラフィーで行った。結晶化は 0.1 M MES 緩衝液 pH6.5、0.1 M NaBr、3 % PEG20000、20 % PEG 3350 をリザーバーとしたハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。PF-AR NW12A および PF-AR NE3A ビームラインおよびにて回折強度データを収集し、既知の GH62 の構造を鋳型とした分子置換法により立体構造を決定した。

3 結果および考察

リガンドなしの構造を 1.7-Å 分解能で、活性中心に阻害剤の Pb 原子が結合した構造を 1.48-Å 分解能で決定した。*CcAbf62a* は他の GH62 酵素と同様、5 葉の β -プロペラフォールドの触媒ドメインであった。*CcAbf62a* の活性中心付近のアミノ酸残基は、他の GH62 酵素にもほぼ保存されていた。しかし、活性中心のカルシウム原子はアスパラギン残基 Asn279 と結合しており、この残基は他の GH62 では Cys または Gln であった。

基質との相互作用を解析するため、キシラン鎖およびアラビノースが結合したモデルを作製した。 α -

L-アラビノフラノシダーゼは、アラビノースが結合している部位はサブサイト-1 と呼ばれる。また、キシラン鎖は、アラビノースが分枝しているキシロースと結合する部位はサブサイト+1 とされ、これより非還元末端側と結合する部位はサブサイト+2NR、+3NR、+4NR、還元末端側と結合する部位はサブサイト+2R、+3R というように名付けられている。*CcAbf62a* のサブサイト+3R、+2NR、+3NR、およびいくつかの残基は、他の *C. cinerea* の GH62 酵素では保存されていなかった。特に His221 は、*CcAbf62a* のサブサイト+2NR に特有であり、本酵素の基質特異性に重要な役割を果たしていると考えられた。

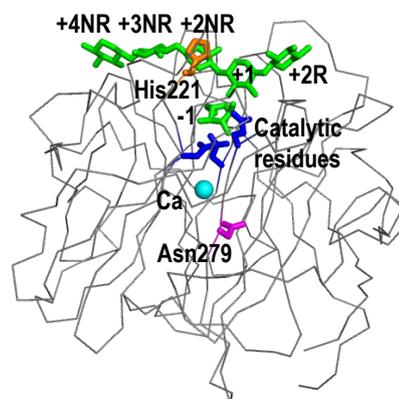


図1 : *CcAbf62a* の立体構造
緑は基質のモデルを表す

4 まとめ

本研究では、*CcAbf62a* の立体構造を決定した。その結果、GH62 に属する酵素は全体の構造は互いに類似しているが、キシラン鎖を認識するアミノ酸残基には多様性があることが明らかになった。*C. cinerea* は基質特異性の異なる 3 つの GH62 酵素により、多様なヘミセルロース鎖を効率的に分解しているものと考えられる。

参考文献

- [1] T. Miyazaki *et al.*, *FEBS Lett.* **587**, 2193 (2013)
[2] T. Tonozuka *et al.*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **181**, 511 (2017)

* tonozuka@cc.tuat.ac.jp