

担子菌のバイオマス分解に関与するファミリー131 タンパク質の構造解析 Structural Analysis of Basidiomycete Family 131 Proteins Involved in Biomass Degradation

殿塚隆史*, 石川涼一, 奥山舜朔, 林昌宏, 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*, Ryoichi Ishikawa, Shunsaku Okuyama, Masahiro Hayashi, 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

セルロース系バイオマスは自然界に豊富に存在することから、効率的なセルロース系バイオマスの利用に関する技術開発が囑望されている。申請者のグループでは、担子菌の卓越した木質腐朽能に着目し、キノコ研究のモデル菌であり全ゲノム解析が終了している担子菌 *Coprinopsis cinerea* のセルロース分解機構の研究を行っている。糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 131 に属するタンパク質は、子囊菌 *Neurospora crassa* においてセルロースで生産が誘導されるタンパク質として初めて同定された。その後、子囊菌 *Podospora anserina* において、これに相当するタンパク質 PaGluc131A が、様々なβ-グルカンを分解する活性があると報告された。しかしながら、これ以外の GH131 に属するタンパク質についての報告はなく、その機能はほとんど不明である。本研究では *C. cinerea* 由来 GH131 に属する2種類のタンパク質 CcGH131A および CcGH131B について、その構造を明らかにすることを目的としている。これまでに CcGH131A の立体構造を GH131 のタンパク質として初めて明らかにしている[1]。本研究では CcGH131B の立体構造を決定した。

2 実験

CcGH131B の発現系は、cDNA ライブラリより PCR で増幅した DNA 断片を pET21a プラスミドに組み込むことによって、大腸菌の発現ベクターを構築した。得られたベクターによって形質転換した大腸菌を培養し、菌体より得られた粗酵素液を 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によって、CcGH131B を精製した。限外濾過により、10~20 mg/mL 程度に濃縮し、結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法によった。リザーバーに 0.1 M MES pH6.5、3% ポリエチレングリコール 20000、10% ポリエチレングリコール 10000 を用いた条件で結晶を得た。X線回折強度測定は AR-NE3A ビームラインで行った。

3 結果および考察

1.9 Å 分解能で回折データを収集した。空間群は $P6_1$ で、結晶学的非対称単位中に2分子の CcGH131B が存在することが分かった。CcGH131B は、立体構造が既知の二つの GH131 タンパク質、

CcGH131A および PaGluc131A との相同性はそれぞれ 30% および 28% と低いため、分子置換法は難しいと考えられたが、ソフトウェア CCP4 中のプログラム MrBump を使い、CcGH131A および PaGluc131A を組み合わせたモデルを生成させた分子置換法により位相を決定することができた。CcGH131B は他の GH131 タンパク質同様βゼリーロールフォールドによって構成されていた(図1)。ゼリーロールフォールドは図1において緑および青で示した2枚のβシートから構成され、βシートの周りにオレンジで示した小さなαヘリックスがいくつか存在していた。CcGH131A の立体構造と比較し、最大の特徴として基質結合部位と考えられるクレフト(図1で緑で示したβシートの湾曲部)が CcGH131A および PaGluc131A では大変浅いのに対し、CcGH131B では深かった。

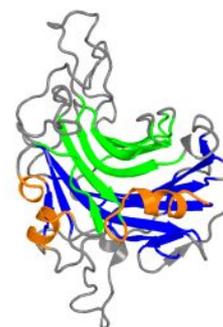


図1 : CcGH131B の立体構造

4 まとめ

本研究では、CcGH131B の立体構造を明らかにした。CcGH131B は、CcGH131A と比較して深い基質結合クレフトを持ち、このクレフトには疎水性のアミノ酸残基が多いことから、CcGH131B は単糖のみで構成される物質ではなく、例えば、糖と疎水性領域から構成される分子に作用するような、これまでに知られていない活性を持つ酵素である可能性が考えられた。

参考文献

[1] T. Miyazaki *et al.*, *FEBS Lett.* **587**, 2193 (2013)

* tonozuka@cc.tuat.ac.jp