

担子菌由来 β -1,3-グルカナーゼの結晶構造解析

○石田卓也¹、伏信進矢²、川合理恵¹、北岡本光³、五十嵐圭日子¹、鯨島正浩¹

(¹東大・院農・生材科、²東大・院農・応生科、³農研機構・食総研)

糸状菌は、細胞壁の主成分として β -1,3/1,6-グルカンを生産することが知られている。この β -1,3/1,6-グルカンの構造は、グルコースが β -1,3結合した主鎖と β -1,6結合による側鎖から成り、菌糸の形態維持や菌体外に分泌される酵素の局在性に関与することから、糸状菌はその合成と分解を制御することで、菌体外に存在する栄養源の代謝をコントロールしていると考えられている。Lam55Aは担子菌*Phanerochaete chrysosporium*を β -1,3/1,6グルカンの一種であるラミナリンを炭素源として培養した際、主に生産される β -1,3-グルカナーゼであり、糖質加水分解酵素（GH）ファミリー55に分類されている。本酵素は直鎖状の β -1,3-グルカンを基質としたとき、非還元末端側のグルコース残基をアノマー反転型機構によって切りだすことが知られている。一方、ラミナリンを基質とした場合は、主生成物としてグルコースとゲンチオビオース(2つのグルコース残基が β -1,6結合した二糖)を与えることから、本酵素が β -1,6結合による分岐の有無に関係なくラミナリン中の全ての β -1,3結合を加水分解すると考えられる。本研究では、Lam55AのX線結晶構造解析を行い、その特徴的な加水分解特性と構造との相関を明らかにすることを目的とした。

メタノール資化性酵母*Pichia pastoris*を用いた発現系によって、Lam55Aの野生型組換え酵素およびそのセレノメチオニン置換体を生産し、精製した。得られた酵素をグルコノラクトン存在下、非存在下で結晶化し、高エネルギー加速器研究機構（BL-5A、NW-12A）にて回折実験を行った。Se-MAD法による位相決定、構造精密化の後、最終的に分解能1.7 Å（リガンドフリー）、2.3 Å（グルコノラクトン複合体）の構造を得た。

GHファミリー55に属する酵素は、アミノ酸配列の解析によって、2つの β -ヘリックスドメインからなると考えられていた。本研究で明らかとなったLam55Aの構造において、2つの β -ヘリックスドメイン（NおよびC-ドメイン）は長いリンカー領域でつながれており、さらにNおよびC-ドメインのN末端同士、C末端同士がそれぞれ相互作用することで全体としてあばら骨のような構造を示すことが明らかとなった。リガンドとして用いたグルコノラクトンは、N-ドメインとC-ドメインの中央に存在しており、両ドメインのアミノ酸残基が結合に関与していたことから、Lam55Aの加水分解反応には2つの β -ヘリックスドメインが必須であると考えられた。さらに、グルコノラクトンのC6位付近にはグルコース残基が結合できるポケットが存在していた。このような構造によってLam55Aは、 β -1,3/1,6-グルカン中の β -1,6結合を含む部位を活性中心に結合して加水分解し、ゲンチオビオースを生産していると考えられた。

Reference

Ishida, T., Fushinobu, S., Kawai, R., Kitaoka, M., Igarashi, K., Samejima, M., *J. Biol. Chem.* in press.