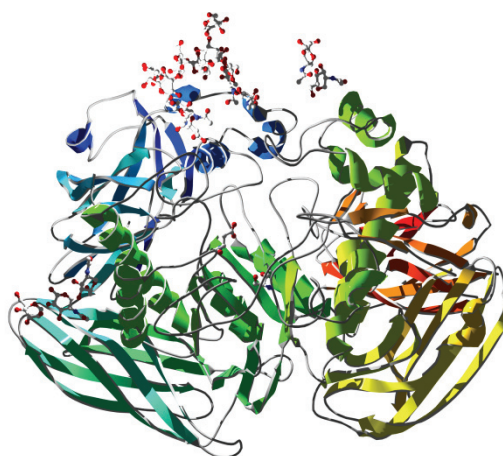


糸状菌由来 β -グルコサミニダーゼの結晶構造解析

○阪本泰光¹、田中信忠²、池正和^{3,4}、岡田宏文³、小笠原渉³、野中孝昌¹
森川康³、中村和郎²
(¹岩手医大・薬, ²昭和大・薬, ³長岡技大・工, ⁴食総研)

キチン・キトサン分解酵素は、抗菌剤やバイオ農薬としての応用が期待されている。我々は、高機能セルラーゼ高生産株としての有用性から工業的に広く利用されている *Trichoderma reesei* に着目し、*T. reesei* が産生するキトサンの非還元末端から β -グルコサミンを単糖単位で遊離する β -グルコサミニダーゼ(gls93)の産業的利用を目指して構造機能解析を行った。gls93 は、LacZ などが含まれる糖質加水分解酵素ファミリー2 (GHF2)に属する酵素である。GHF2 は β -ガラクトシダーゼ、 β -マンノシダーゼ、 β -グルクロニダーゼの3グループに分類されているが、アミノ酸配列相同性解析と系統樹解析から、gls93 は既知の3つのグループに属さない新規のサブグループに属する酵素であることが推測された。我々は、*T. reesei* 由来の gls93 を *Pichia pastoris* で異種発現させ、糖鎖修飾の違いにより分子量が異なると考えられる2種の gls93(gls93-F1 (105kDa), gls93-F2 (100kDa))を得た。得られた gls93-F1 と gls93-F2 の β -グルコサミニダーゼ活性はほぼ同じであった。我々は、gls93-F1 と gls93-F2 の結晶化に成功し、gls93-F1 については PF-AR NW12A において 1.8Å 分解能で、gls93-F2 については PF BL17A において 2.5Å の回折強度データを収集し、X線結晶構造解析に成功した。得られた電子密度図から 196、336、440、557、578 番のアスパラギン残基が糖鎖修飾され、2種の間では糖鎖の長さが異なることがわかった。また、gls93 の変異体を用いた機能解析により、触媒反応に関与するアミノ酸残基として推定していた D464 と E539 が gls93 の立体構造に於いても活性部位に存在し、触媒反応に関与することが示唆された。さらに、最近報告された放線菌由来キトサナーゼ(CsxA) (Bueren *et al.* (2009) *J. Mol. Biol.* **385**, 131-139)との構造比較を行った。



gls93-F1 の全体構造