

好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 株由来 細胞内キシラン分解酵素 β -xylosidase(BxlA)の X 線結晶構造解析

大阪薬科大学大学院薬学研究科 薬品物理化学研究室 修士2年 齋藤 慧

【背景】

好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 株から由来する Bxl タンパク質群(BxlA,BxlF,BxlG,BxlE,BxlR)は、キシラン分解産物の輸送及び分解を担っている。キシロピオースに代表されるキシラン分解産物は、BxlE により BxlF・BxlG 複合体に受け渡され、細胞内で BxlA によりキシロースにまで分解されると考えられています(Fig.1)。BxlA のようなヘミセルロース分解酵素は自然界におけるカーボンサイクルの維持にきわめて重要な役割を担っており、植物バイオマスによる完全な分解は微生物や高等動物に炭素源、エネルギー源として利用されています。また最近ではパルプ製紙工業における漂白作用やリグノセルロース物質を発酵製品(バイオエタノール)に転換するなどの実用的な使用法の可能性を秘めており関心を集めています。

今回着目した *Streptomyces* 属由来 β -xyloseidase(BxlA)は 770 アミノ酸残基からなるタンパク質で、Glycoside Hydrolase family 3 (GH3)に分類されています。GH3 に分類される β -xyloseidase において現在得られている構造情報はなく、さらに BxlA は他の β -xyloseidase とは異なり、C 末端側に1つ多くのドメインを持ち、新たな特徴を有することが推測されます。そこで本研究は、BxlA の立体構造を原子レベルで解明することを目的として、その酵素活性評価、結晶化及び X 線結晶構造解析に着手しました。

【結果・考察】

β -xyloseidase の活性残基保存領域を比較した際、286 番目と 316 番目のアスパラギン酸が共通なものとして配列されていたので、この 2 残基は加水分解に重要な役割を担うのではないかと推測し、それぞれの残基を変換した変換体 D286A、D316A 遺伝子を作成し、高純度サンプルの収集に成功しました。この変換体 BxlA を用いて酵素活性を評価した結果、D286A、D316A の活性が劇的に低下し、活性に重要なアミノ酸であることを明らかにしました。さらに構造情報を得るため、ハンギングドロップ蒸気拡散法による BxlA 結晶の作成を行い、X 線回折強度データ測定により分解能 2.29 Å のデータ収集に成功しました。さらに位相決定の手段として MAD 法を適用するため、セレノメチオニン変異体 BxlA(SeMet-BxlA)の発現、単離精製、結晶化を行い、得られた結晶を SPring-8 のビームライン BL26B1 にて X 線回折強度データを収集し、MAD 法による BxlA の全体構造決定に成功しました。得られた構造をもとに、活性サイトを確認したところ D286 が求核触媒残基として機能していることが明らかとなり、D316 番目は活性サイトから離れた位置に存在しているため、今までにない新たな役割を担うアミノ酸であると推測されます。今後さらにこの D316、さらに活性サイトに関わる周辺アミノ酸についての詳細を明らかにしていきたいと考えています。

【研究を通じて…】

研究を行ううえで、BxlA 及び SeMet-BxlA の結晶作成が最大の壁でした。この BxlA、SeMet-BxlA 結晶は、結晶化を行って観察するまで 3 ヶ月かかり、結晶化条件探索を行う際、本当にこの条件は適しているのかという判断をすることが非常に困難でした。しかし結晶が出るか出ないかを考え立ち止まるよりも、とにかく可能性のある条件をひたすら試すことを続けました。何度も諦めそうになりましたが、「絶対に結晶を出すんだ」という強い気持ちで研究を続けた結果、卒業 1 ヶ月前で結晶データの測定に成功しました。大学院生活 2 年間を通じ知識だけでなく、1 つの目標に向かって諦めず努力し続ければ必ず成果は出るのだと自分自身の経験を通じて改めて感じる事ができ、今後の人生に必ず生きる貴重な経験をすることができました。

最後に御指導御鞭撻を賜りました石田寿昌教授、辻坊裕教授、友尾幸司准教授、宮本勝城講師、尹康子講師、箕浦克彦助教に深謝致します。また常日頃からご支援を頂いた両親に深く感謝致します。

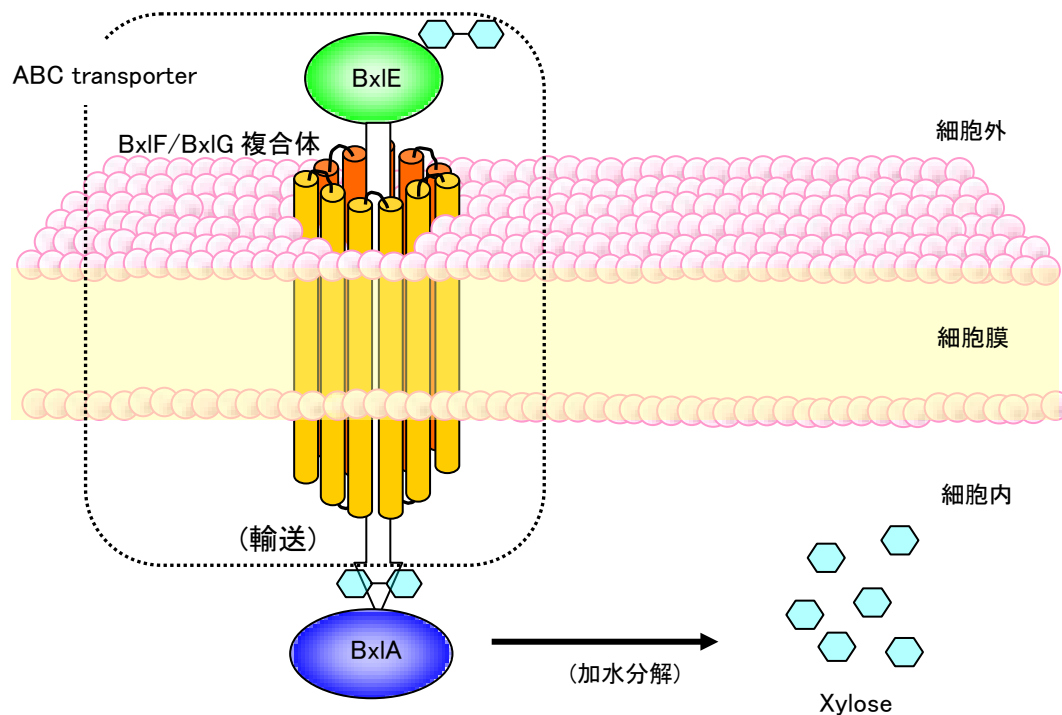


Fig.1 キシラン分解機構のモデル図

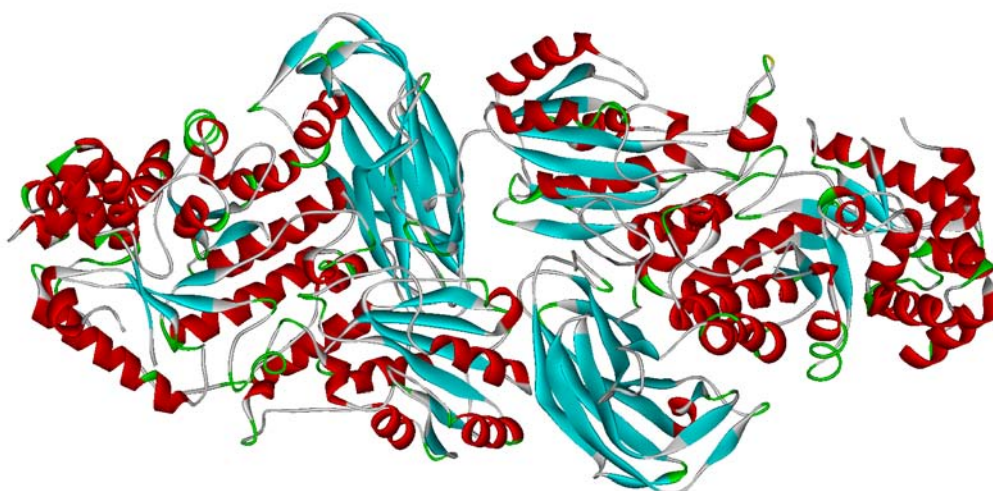


Fig.2 BxlA の全体構造 (結晶格子中に 2 分子で存在)