

# 難生分解性ポリエステル分解酵素クチナーゼの X 線結晶構造解析 X-ray crystallography of cutinase, a useful enzyme for degrading biotically refractory polyesters

宮川拓也, 田之倉優\*

東京大学大学院農学生命科学研究科, 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Takuya Miyakawa, Masaru Tanokura\*

Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,  
The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan

## 1 はじめに

ポリエチレンテレフタレート (PET) は、耐熱性、硬度、耐久性などに優れているが、極めて生分解され難い。近年、PET 分解酵素としてクチナーゼと呼ばれる一群のリパーゼファミリー酵素が注目され、*Saccharomonospora viridis* AHK190 のクチナーゼ様タンパク質 Cut190 が同定された。Cut190 の活性と熱安定性は高濃度のカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 存在下で向上することが見出され、これらの性状の向上は PET 分解に有用である。本研究では Cut190 の活性化と耐熱化をもたらす  $\text{Ca}^{2+}$  の作用機序を明らかにすることを目的とし、Cut190 の  $\text{Ca}^{2+}$  結合型と非結合型の結晶構造を解析した。

## 2 実験

大腸菌発現系を用いて Cut190 の熱安定性を向上させた S226P 変異体 (Cut190<sup>S226P</sup>) を生産し、精製後に 100 mM  $\text{CaCl}_2$  の存在下と非存在下で蒸気拡散法により結晶化した。 $\text{Ca}^{2+}$  非結合型の結晶の X 線回折データは BL-17A ビームラインにて波長 1.00 Å で収集した。一方、 $\text{Ca}^{2+}$  結合型の結晶については、AR-NW12A で波長 0.90 Å と 1.90 Å の異常分散データを収集した。結晶構造は Est119 (PDB: 3VIS) を鋳型とした分子置換法により決定し、 $\text{Ca}^{2+}$  の結合位置は異常分散差フーリエマップで同定した。

## 3 結果および考察

Cut190<sup>S226P</sup> の  $\text{Ca}^{2+}$  結合型と非結合型の結晶構造は分解能 1.75 および 1.45 Å で決定した[1]。Cut190<sup>S226P</sup> は  $\alpha\beta$ -hydrolase fold を形成し、触媒三残基 (S176, D222, H254) が空間的によく保存されていた。 $\text{Ca}^{2+}$  非結合型の構造では、F106 の側鎖フェニル基が触媒残基の S176 及び H254 の近傍に位置して活性部位を塞いでおり、Cut190<sup>S226P</sup> が  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下で不活性状態をとり易いことを示唆した。一方、 $\text{Ca}^{2+}$  結合型の構造では、 $\text{Ca}^{2+}$  が 2 つの  $\beta$  ストランド ( $\beta 1$  及び  $\beta 2$ ) をつなぐループ ( $\beta 1$ - $\beta 2$  ループ) 上の残基と tetragonal bipyramidal array の配位で結合していた。これらの相互作用により、Cut190<sup>S226P</sup> の熱安定性が

高まることが推定された。さらに、 $\text{Ca}^{2+}$  の結合は  $\beta 1$ - $\beta 2$  ループに隣接する 2 つのループに構造変化を誘起した。これにより、F106 の側鎖が活性部位の外側に約 90° 回転するとともに、主鎖の配向も変化して oxyanion hole が形成され、Cut190<sup>S226P</sup> は活性状態を形成した。

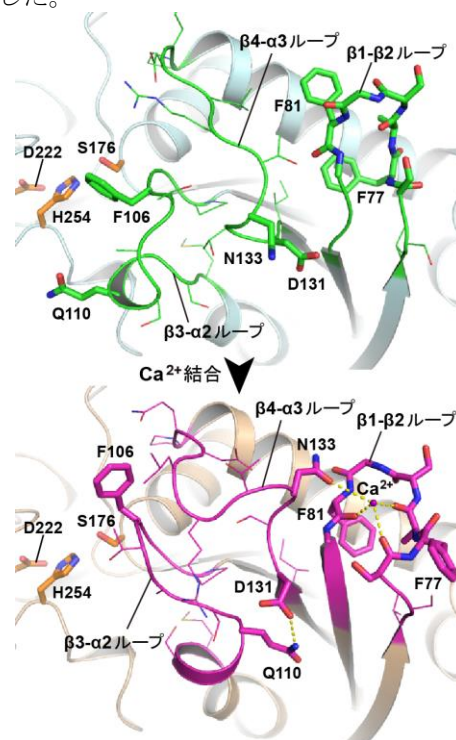


図 1 : Cut190<sup>S226P</sup> の  $\text{Ca}^{2+}$  結合による構造変化

## 4 まとめ

本研究は  $\text{Ca}^{2+}$  がアロステリック制御因子として PET 分解酵素 Cut190 の活性化に機能する機構を明らかにした。

## 参考文献

- [1] Miyakawa, T. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 4297 (2015).

\*amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp