

# 糸状菌由来セロビオヒドロラーゼ II (Cel6A) の高分解能 X線結晶構造解析と 中性子結晶構造解析

## High-resolution X-ray Crystallography and Neutron Crystallography of Fungal Cellobiohydrolase II (Cel6A)

立岡美夏子<sup>1</sup>, 五十嵐圭日子<sup>1,2,\*</sup>, 鮫島正浩<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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

Mikako Tachioka<sup>1</sup>, Kiyohiko Igarashi<sup>1,2,\*</sup> and Masahiro Samejima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657, Japan

<sup>2</sup>VTT Technical Research Centre of Finland, P.O.Box 1000, Tietotie 2, Espoo FI-02044 VTT, Finland,

### 1 はじめに

セロビオヒドロラーゼ II (CBHII) はセルロースを  $\alpha$ -セロビオース単位に加水分解する立体反転型酵素であり、糖質加水分解酵素ファミリー6 に分類されている。本ファミリーでは、求核水分子を直接活性化する触媒残基が存在せず、水分子のネットワークを介して離れた位置にあるアスパラギン酸がプロトンを受け取る反応機構が提案されている[1]。しかしながら、通常の X線結晶構造解析では水素原子を観測できないため、触媒残基のプロトン化状態や水素結合の向き等、反応機構の検討に必要な情報が得られていない。本研究では、高分解能 X線結晶構造解析および中性子結晶構造解析から、水素原子を含めた詳細な立体構造情報を取得し、CBHII の加水分解反応時の水素結合様式を明らかにすることを試みた。

### 2 実験

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の CBHII (PcCel6A) の触媒ドメインの結晶を作製し、PF のビームライン BL-5A, BL-17A, AR-NE3A, AR-NW12A にてアポ体および基質複合体の X線回折測定を行った。高分解能 X線構造解析のため、X線照射量と結晶の損傷について検討した。X線・中性子回折データの共解析のため、重水化した PcCel6A 結晶の常温での X線回折測定を行った。

### 3 結果および考察

PcCel6A 触媒ドメインの構造決定に成功し、アポ体と基質複合体の構造から、触媒中心を覆う 2 つのループの構造変化が基質の結合によって起こることを明らかにした (成果 1)。また、高分解能 X線構造解析の結果より、一部のアミノ酸の水素原子を可視化し、触媒残基のプロトン化状態を決定した。中性子構造解析の結果より、触媒中心のアミノ酸残基及び基質、水分子の水素結合様式を決定した。

### 4 まとめ

高分解能 X線結晶構造及び中性子結晶構造解析の結果から、PcCel6A の反応機構に関する詳細な知見が得られた。今後、この知見をもとに生化学実験を行い、反応機構について検討を行う。

### 謝辞

X線回折測定の際に KEK の皆様に大変お世話になりました。深く感謝申し上げます。

また、現岡崎統合バイオサイエンスセンター・中村彰彦先生、現宇宙航空研究開発機構・石田卓也先生、太田和敬先生、株式会社コンフォーカルサイエンス・田仲広明先生、株式会社丸和栄養食品・伊中浩治先生、古林直樹先生、京都大学大学院・竹田一旗先生、三木邦夫先生、茨城大学日下勝弘先生、山田太郎先生、矢野直峰先生をはじめとする共同研究者の皆様に大変感謝致します。ビームタイムでお世話になりました東京大学大学院・伏信進矢先生、秋田県立大学・鈴木龍一郎先生、J-PARC の皆様に厚く御礼申し上げます。

### 参考文献

[1] A. Koivula *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10015–10024 (2002).

### 成果

1. 論文発表: Crystal structure of a family 6 cellobiohydrolase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. M. Tachioka, A. Nakamura, T. Ishida, K. Igarashi & M. Samejima (2017). *Acta Cryst.* F73, accepted.

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