

## *Coprinopsis cinerea* 由来セロビオヒドロラーゼ CcCel6A の結晶構造解析 Crystal structure of a cellobiohydrolase, CcCel6A, from *Coprinopsis cinerea*

殿塚隆史\*, 田村瑞, 宮崎剛亜, 田中祐太郎, 西河淳, 吉田誠  
東京農工大学大学院農学府 〒183-8509 府中市幸町 3-5-8

### 1 はじめに

糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 6 に属するセルラーゼは、植物バイオマスの利用に有用な酵素である。GH6 に属する酵素には、エンドグルカナナーゼ (EC 3.2.1.4) とセロビオヒドロラーゼ (EC 3.2.1.91) が存在する。このうち、セロビオヒドロラーゼは、セルロースやセロオリゴ糖を非還元末端側から加水分解し、セロビオースを生成させる酵素として知られている。GH6 に属するセロビオヒドロラーゼの立体構造は、糸状菌由来のものしか報告されていなかったが、私達は、担子菌由来の酵素として初めて *Coprinopsis cinerea* よりセロビオヒドロラーゼ CcCel6C の立体構造を報告した[1]。C. cinerea は5種類の GH6 に属するセルラーゼを生産しており、これらの酵素の構造機能相関に興味を持たれる。今回は、C. cinerea 由来の GH6 に属する別のセロビオヒドロラーゼである CcCel6A の触媒ドメインの立体構造を決定したので報告する[2]。

### 2 実験

CcCel6A の触媒ドメイン (以下単に CcCel6A とする) は、His タグ融合タンパク質として大腸菌で発現させた。精製は Ni-NTA アガロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーによった。結晶化は、100 mM HEPES/KOH (pH 7.0 - 7.5)、20 - 25% ポリエチレングリコール 8000、50 - 200 mM 酢酸マグネシウムをリザーバーとし、CcCel6A とリザーバーを 1:1 で混合した溶液をドロップとした、ハンギングドロップ蒸気拡散法によった。リガンドとの複合体の構造決定のため、結晶をセロビオースおよび *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-cellobioside (以下 *p*NPG3) の溶液に5分間浸した結晶を、回折データ収集に供した。回折データは PF-AR NW12A ビームラインで収集した。データのプロセスは、HKL2000 を使い、構造は、CCP4 の Molrep により、PDB 番号 1BVW を鋳型とした分子置換法によって決定した。構造の精密化は Refmac と Coot によった。

### 3 結果および考察

CcCel6A のリガンドなしの構造、および CcCel6A-セロビオース、CcCel6A-*p*NPG3 の各複合体の立体構造を決定した。GH6 のセロビオヒドロラーゼの特徴は、活性部位がトンネルの中に存在し、活性部位のトンネルを形成しているループは、オープン型から、リガンドの結合によってクローズ型へ構造変化を起

こし、その結果トンネルの幅が狭くなることである。リガンドの結合していない CcCel6A は、オープン型の構造であった。これに対し、CcCel6A-セロビオース、CcCel6A-*p*NPG3 の各複合体ではクローズ型の構造であることが分かった。

特に興味深いのは、CcCel6A-*p*NPG3 である。糖質加水分解酵素は、基質が加水分解される際、加水分解される箇所より非還元末端側の基質と結合している酵素の部位をマイナスサブサイト、還元末端側の基質と結合している酵素の部位をプラスサブサイトと呼ぶ。GH6 のセロビオヒドロラーゼは、活性部位がトンネル構造であることから、基質は、まずプラスサブサイトに結合した後、トンネル中をスライドしマイナスサブサイトに達した後、加水分解を受けると推定される。*p*NPG3 は CcCel6A によって分解されることのない、いわゆる阻害剤である。今回、*p*NPG3 はプラスサブサイトにのみ結合した構造として決定され、マイナスサブサイトには見られないことが判明した (図1)。このことは、*p*NPG3 はマイナスサブサイトに結合した後、活性部位のトンネル中をスライドすることができず、いわば、酵素反応の途中の状態を反映している構造であると考えられる。

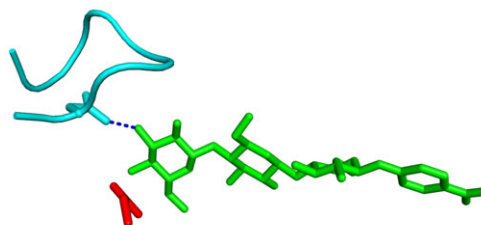


図1 : CcCel6A-*p*NPG3 の活性部位付近の構造  
水色 : トンネルを形成するループと Asp164、緑 : *p*NPG3、赤 : 触媒酸残基 (Asp210)、青 : 水素結合

### 4 まとめ

本研究では CcCel6A の構造を決定した。特に、CcCel6A-*p*NPG3 において、*p*NPG3 はプラスサブサイトにのみ結合した構造として決定された。

### 参考文献

- [1] Y. Liu *et al.*, FEBS J. **277** (2010) 1532.  
[2] M. Tamura *et al.*, FEBS J. **279** (2012) 1871.

\* tonozuka@cc.tuat.ac.jp