

Coprinopsis cinerea 由来セロビオヒドロラーゼ CcCel6C の構造変化 The structural change in a cellobiohydrolase, CcCel6C, 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GH6 に属するセロビオヒドロラーゼは、セルロースの分解に重要な役割を担っている。GH6 のセロビオヒドロラーゼは、活性中心がトンネルの中に存在し、基質が結合することでトンネルを形成するループがオープン型からクローズ型へ構造変化を起こすことが知られている。

私達は、担子菌由来の酵素として初めて *Coprinopsis cinerea* より GH6 に属するセロビオヒドロラーゼ CcCel6C のオープン型の立体構造を報告した[1]。CcCel6C のオープン型の構造を、GH6 に属する他の構造既知のセロビオヒドロラーゼと比較すると、活性中心を形成するトンネルの幅が広いことが判明している。今回、CcCel6C の変異型酵素を構築し、クローズ型の構造を決定した[2]。

2 実験

CcCel6C の活性中心のループの構造変化に最も重要なアミノ酸残基と推定されるアミノ酸残基に変異を導入した酵素、CcCel6C D102A を構築した。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り精製し、ハンギングドロップ蒸気拡散法により野生型 CcCel6C とほぼ同様の条件 (100 mM HEPES-KOH, pH7.0, 20% PEG) で結晶を得た。回折データは、震災による PF 共同利用実験停止に伴う SPRING-8 の課題 2011A1881 により、BL26B2 ビームラインで行った。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 3A64 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

CcCel6C D102A の構造を分解能 1.6 Å で決定した。CcCel6C D102A の結晶は空間群 $P2_12_12_1$ であり、野生型 CcCel6C の $P1$ 結晶とは、全く異なる格子定数であった。両者の立体構造を比較したところ、野生型 CcCel6C はオープン型の構造であるのに対し、CcCel6C D102A はクローズ型の構造であることが判明した。

CcCel6C のオープン型からクローズ型へのコンフォメーション変化は、基本的には、私達が最近構造を決定した *C. cinerea* 由来の別のセロビオヒドロラーゼである CcCel6A の、オープン型からクローズ型へのコンフォメーション変化と類似していた。すなわち、活性中心が存在するトンネルを形成するループについて、その構造が変化し、トンネルの幅が狭

くなることは同様であった。しかしながら、特筆すべき点は、CcCel6C の構造変化は、CcCel6A や、これまでに立体構造が報告されている糸状菌の GH6 セロビオヒドロラーゼと比較し、はるかに大きな変化であることがあげられる。構造変化を比較するため、Asp115CA、Ser236CA、Asn236CA の 3 つの原子について、これらの 3 点によって作られる角度の変化 (図 1) を計算したところ 10.3° であった。これに対し、立体構造が報告されている他の GH6 セロビオヒドロラーゼでは、相当する角度の変化は、0.5~5.3° であった。

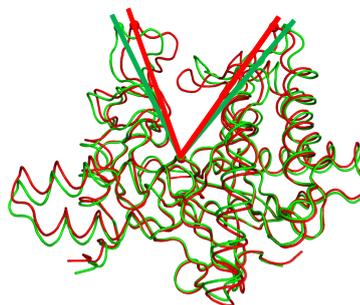


図 1 : CcCel6C の構造変化
緑 : CcCel6C 野生型 (オープン型)、赤 : CcCel6C D102A (クローズ型)、3 つの原子によって作られる角度の変化を示した。

4 まとめ

本研究において、CcCel6C のオープン型とクローズ型の構造は、これまでに立体構造が報告されている GH6 セロビオヒドロラーゼと比較し、はるかに大きな変化であることを明らかにした。*C. cinerea* において、CcCel6A は結晶性セルロースの分解の最も主要な酵素であるのに対し、CcCel6C は、*C. cinerea* において構成的に発現し、その生理学的な役割は異なることが示唆されている。本研究で示された GH6 セロビオヒドロラーゼの構造変化と、酵素の生理学的な役割の関係がより詳細に研究されることが望まれる。

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