

 <b>MLF Experimental Report</b>	提出日(Date of Report) 2019/3/26
課題番号(Project No.) 2018PX0004, 2018PX0019 実験課題名(Title of experiment) バイオマス高度利用に向けた立体反転型糖質加水分解酵素の活性 に関する水分子の機能解析 実験責任者名(Name of principal investigator) 五十嵐 圭日子 所属(Affiliation) 東京大学大学院農学生命科学研究科	装置責任者(Name of responsible person) 日下 勝弘 教授 装置名(Name of Instrument : BL No.) iBIX/BL03 実施日(Date of Experiment) 2018/4/27~5/8, 2019/2/1~2/15

実験目的、試料、実験方法、利用の結果得られた主なデータ、考察、及び結論を記述して下さい。

実験結果などの内容をわかりやすくするため、適宜図表添付して下さい。

Please report experimental aim, samples, experimental method, results, discussion and conclusions. Please add figures and tables for better explanation.

<p>1. 実験目的(Objectives of experiment)</p> <p>セルロース系バイオマスの有効利用に貢献することを目的として、立体反転型に分類されるセルロース加水分解酵素（セルラーゼ）について、活性に関する水分子の位置・向き・状態（プロトネーションなど）を中性子構造解析により決定し、その反応メカニズムを明らかにすることを目指した。今回実験対象としているセルラーゼ <i>PcCel6A</i> はこれまでに高分解能 X 線結晶構造解析および中性子構造解析を継続して行っており、今回の実験でアポ体の重水化結晶の中性子回折データの取得、および、DH コントラスト解析のためのリガンド複合体の軽水結晶の中性子回折データの取得を行うこととした。また、宇宙実験からの中性子構造解析実験への技術確立に向けて、セルラーゼ <i>PcCel45A</i> の打ち上げサンプルの中性子テスト測定を行うこととした。</p>
<p>2. 試料及び実験方法</p> <p>Sample(s), chemical compositions and experimental procedure</p> <p>2.1 試料 (sample(s))</p> <p>セルラーゼ <i>PcCel6A</i>          セルラーゼ <i>PcCel45A</i></p> <p>2.2 実験方法(Experimental procedure)</p> <p>石英キャピラリーに封入した結晶を用い、上記の実施期間中 iBIX において常温にて中性子の照射実験を行った。検出器 30 台を用いて得られた回折データの処理を行ったのち、X 線回折測定データと合わせて構造精密化を行った。</p>

### 3. 実験結果及び考察（実験がうまくいかなかった場合、その理由を記述してください。）

Experimental results and discussion. If you failed to conduct experiment as planned, please describe reasons.

#### *PcCel6A* のアポ体の中性子構造解析

*PcCel6A* のアポ体の重水結晶を作製して 12 日間の中性子解析測定を行い、分解能 1.9 Å データを取得した。また、2017 年に取得した軽水での中性子構造解析データと合わせて DH コントラスト法による高感度の水素原子の可視化を検討した。京都大学複合原子力科学研究所の茶竹俊行准教授の開発した DH コントラスト法が、新しいプログラムを作製することで *PcCel6A* にも適用可能であることがわかった。詳細な構造解析の結果、アポ体での触媒残基のプロトン化状態や、タンパク質分子内で配向してプロトンの移動に関与し得る水分子が明らかとなった。特に、活性中心付近に位置するアスパラギンにイミド酸型をとるものが新たに見出された。イミド酸型の安定化機構を検討したところ、これまで不明確であった *PcCel6A* の反応機構について、これまでプロトンを受容できないと考えられていたアスパラギン酸からのプロトン転送経路の存在を示唆する重要な知見が得られた。

#### *PcCel6A* のリガンド複合体の中性子構造解析

*PcCel6A* のリガンド複合体については宇宙実験での大型結晶化を検討している SLC キャピラリーを用いて作製した結晶を用いて回折実験を行った。サイズは 0.5 mm<sup>3</sup> 程度であったが、テスト測定でも良好な反射が得られ、目視では 2.3 Å 程度と考えられた。しかし、本測定中に結晶が劣化してしまったため、同条件で得られた結晶と入れ替えての測定を行うこととなった。今後は封入の気密性を保つため、改善された封入法を検討する。得られたデータについては現在解析を進めている。

#### *PcCel45A* の変異体の中性子構造解析

また、宇宙実験から帰還したセルラーゼ *PcCel45A* の結晶および触媒残基の変異体 N92D、D114N の複数の結晶をキャピラリーに封入し、テスト測定を行った。分解能は 8 時間の測定で目視分解能 3.2 Å が得られた。今後、結晶化条件や封入までの工程等の最適化を行い、変異体の中性子構造解析を目指すとともに、宇宙での結晶化実験から中性子回折測定までのシステムの確立について検討する。

### 4. 結論(Conclusions)

2018 年度は主に *PcCel6A* の 2 条件での中性子構造解析を行い、その反応機構に関する知見を得た。これまでプロトン転送によって触媒反応を行うと考えられていた水分子ネットワークについて、*PcCel6A* のリガンド複合体の常温での構造では水分子の配向が起こっていなかったことを明らかにし、新たな反応機構を検討することとなった。*PcCel6A* アポ体の構造からイミド酸型のアスパラギンを発見し、新たなプロトン転送経路の提案に至った。これらの反応機構に関連する重要な知見は今回の中性子構造解析ではじめて得られたものであり、来年度論文として発表する予定である。