

 茨城県 IBARAKI Prefectural Government MLF Experimental Report	提出日(Date of Report) 2021/11/26
課題番号(Project No.) 2019PX3002 実験課題名(Title of experiment) 有用オリゴ糖生産に向けた糖質分解酵素の反応機構に関する構造機能解析 実験責任者名(Name of principal investigator) 矢野直峰 所属(Affiliation) 茨城大学	装置責任者(Name of responsible person) 日下勝弘 装置名(Name of Instrument : BL No.) iBIX/BL03 実施日(Date of Experiment) 2020/2/13-23, 2/25-3/3

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><i>Fusarium oxysporum</i> 12S 由来ラムノースグルクロン酸リアーゼはアラビアガム末端を構成するグルクロン酸とラムノースの間の結合を β-脱離反応により切断し、L-ラムノースを遊離する。野生型、野生型と生成物であるL-ラムノースとの複合体、変異を導入した H105F 活性欠損体と基質であるラムノシルグルクロン酸との複合体でそれぞれ 1.05 Å, 1.40 Å, 2.42 Å 分解能の X 線結晶構造が得られている。X 線結晶構造とアミノ酸変異体の活性測定の結果から His85 がグルクロン酸から水素原子を引き抜き、グルクロン酸 O4 原子へ水素原子を付加する反応機構が共同提案者により提唱されている。グルクロン酸とラムノースの間の切断では水素原子の引き抜きと付加が起こるので、水素原子を含めた反応機構を提唱することを目的として中性子構造解析を行う。</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>糸状菌 <i>Fusarium oxysporum</i> 12S 株由来 ラムノースグルクロン酸リアーゼの単結晶 体積は約 0.8mm³</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単結晶を用い、上記の実施期間中、常温、35 結晶方位、波長 2.28-6.19 Å、加速器出力 500kW で中性子の照射実験を行い、回折データを収集した。検出器 34 台を用いて得られたデータを処理した。同一結晶を用いて、X 線回折データを収集し、中性子のデータと合わせて構造精密化を行い、中性子散乱長密度図を作成し、水素原子位置を特定した。</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.

常温の単結晶(図 1)に中性子を照射したところ、2.0 Å 分解能の回折データが得られた。回折斑点は綺麗なものが得られた(図 2)。同一結晶を用いて、1.42 Å 分解能の X 線回折データを収集した。X 線回折データと中性子のデータを合わせた構造精密化を行ったところ、軽水素と重水素由来と考えられる散乱長密度が観測された。軽水素と重水素の見え方を分解能が同程度の他のタンパク質と比較した。軽水素は主鎖、側鎖ともによく観測されていたが、重水素は明らかに観測される割合が主鎖、側鎖ともに少なく、観測されても占有率は最大でも 0.7 程度と低かった。重水素があまり観測されなかった理由については、測定データが 1 つしかないため、断定することは出来なかった。最も可能性が高い理由としては、重水中で結晶化を行う時に何らかの理由により軽水が混ざってしまい、重水素の割合が下がってしまったことが考えられる。



図 1. 中性子測定に用いた結晶

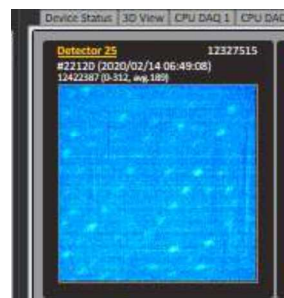


図 2. 中性子の回折斑点

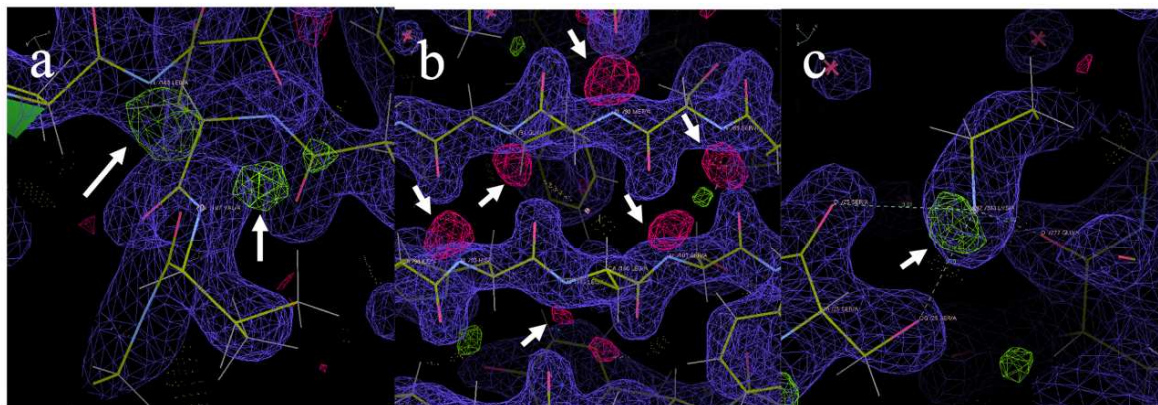


図 3. 中性子散乱長密度図

a. 主鎖の重水素, b. 主鎖の軽水素, c. リシン側鎖の重水素

4. 結論(Conclusions)

Fusarium oxysporum 12S 由来ラムノースグルクロン酸リアーゼで中性子測定可能な結晶を作成し、2.0 Å 分解能の回折データを得られた。軽水素由来の散乱長密度ははっきりと観測出来たが、重水素由来の散乱長密度は分解能が同程度の他のタンパク質と比較すると、あまり見えていなかった。重水中で結晶化を行う時に何らかの理由により軽水が混ざってしまい、重水素の割合が下がってしまった可能性が考えられる。今後、ラムノースとの複合体でも中性子構造解析を目指す、同様のことが起こらないように結晶化に用いる沈殿剤 PEG が軽水を吸収していないか等軽水が入らないように注意する必要がある。