 <b>茨城県</b> IBARAKI Prefectural Government <b>MLF Experimental Report</b>	提出日(Date of Report) 2021/11/26
課題番号(Project No.) 2020PX3018 実験課題名(Title of experiment) <i>Fusarium oxysporum</i> 12S 由来ラムノースグルクロン酸リアーゼの 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) 2021/2/11-26, 3/11-12

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<math>\beta</math>-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。ラムノースとの複合体で中性子構造解析を行い、ラムノースの O1 原子は His85 と水素結合を形成しているかなど、水素原子を含めた立体構造から反応機構を提唱することを目的とする。</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とラムノースとの複合体の単結晶体積は約 1.5mm<sup>3</sup></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、34 結晶方位、波長 2.28-6.19 Å、加速器出力 600kW 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、1.8 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、1.25 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。水素原子位置を決定したい活性部位とラムノースでも重水素位置を決定することが出来た(図 3)。ラムノースの O1 位に結合している水素は His85 の方を向いていたことから、切断反応に必要な水素は His85 から渡される可能性が示唆された。His85 の近くに存在する Tyr150 は酢酸と水素結合していたことから、基質が活性部位に結合することを補佐している可能性が考えられた。



図 1. 中性子測定に用いた結晶

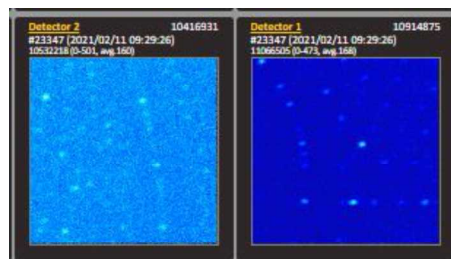


図 2. 中性子の回折斑点

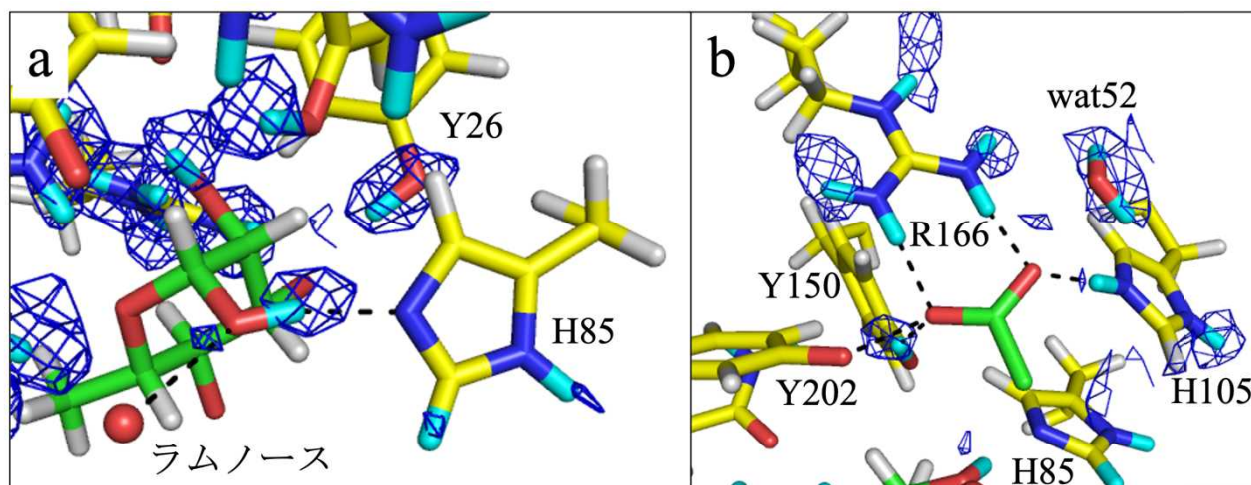


図 3. 活性部位周辺の中性子散乱長密度図

a. ラムノースと His85 2.5 $\sigma$  レベル, b. 酢酸と Tyr150 2.9 $\sigma$  レベル

### 4. 結論(Conclusions)

*Fusarium oxysporum* 12S 由来ラムノースグルクロン酸リアーゼのラムノース結合型で中性子測定可能な結晶を作成し、1.8 Å分解能の回折データを得られた。重水素原子由来の散乱長密度は酵素全体でよく見られた。水素原子位置を決定したい活性部位とラムノースでも重水素位置を決定することが出来た。今後は決定した水素原子位置を基にして、反応機構を考えていく。