 MLF Experimental Report	提出日(Date of Report) 2017年9月14日
課題番号(Project No.) 2015AX0002、2015PX0004 実験課題名(Title of experiment) データ処理プログラムソフトウェアの改良のためのグルコースイソメラーゼ結晶データ取得、工業的糖異性化酵素におけるプロトン移動機能解明 実験責任者名(Name of principal investigator) 奥田 夏樹、田中 伊知朗 所属(Affiliation) 株式会社ヴィジブルインフォメーションセンター、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.) BL03 iBIX 実施日(Date of Experiment) 2016年3月18日から20日 および3月20日から4月2日

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>本実験の主な目的は、次の2つである。</p> <p>(1) グルコースイソメラーゼ(GI)は糖を異性化する工業的にも重要な酵素であり、甘味料の工業的生産法の改良ほか、バイオマス利用に応用されることが期待されている。これまで、X線は100構造以上、中性子では10構造決定されているが、いずれも酵素反応が進行する自然な条件での結晶構造解析されておらず、反応機構の詳細は不明であった。そこで、より自然な反応条件での糖と補因子金属複合体の単結晶を用いて中性子構造解析を行い、反応機構を詳細に解明することを目的とした。</p> <p>(2) 最適な測定方位(ゴニオ角)の決定の支援を目的とした当社製ソフトウェア「Pirouette」の検証を行う。Pirouetteは、ブラグ反射の出現位置を予測した上で、それらを効率よく測定できるような測定方位を算出する機能を有するソフトウェアである。ただし、反射の強度については考慮せず、反射出現位置が検出器上に乗っていればその反射は測定できるものとみなして、最適化計算を行っている。</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>放線菌由来グルコースイソメラーゼ(E.C. 5.3.1.5)を重水バッファ(pD7.7)中で結晶育成し、グルコース、マグネシウムをソーキングで導入し、3者複合体の単結晶試料(大きさ: 1.5mm × 1.5mm × 1.0mm)を得た。これを石英キャピラリーに封入して実験に用いた。</p> <p>2.2 実験方法(Experimental procedure)</p> <p>まず、本測定の候補となる試料をいくつかテスト測定し、それらの結果を比較して、本測定用の試料を決めた。</p>

J-PARC 陽子出力 200kW で正味約 12 日間の測定時間に対して、上記 Pirouette を用いてゴニオメーターの方位の最適な組み合わせを計算して、その結果に基づいて室温測定を行った。データ処理は STAGazer を用いて行い、分解能は 2.00 Å となった。のちほど、同じ結晶を KEK-PF BL-5A に持込み、X 線の室温測定も行い、1.39 Å 分解能のデータを得た。これらのデータ測定、処理(HKL2000)をまとめたものを下左の表に示す。()内の数字は最外殻のものである。

X 線と中性子のデータを用いて同時精密化(Phenix および Coot)を行い、下右の表のような解析結果となった。なお、占有率を考慮していない分子数となっている。また、分子構造の描画は PyMOL を用いた。

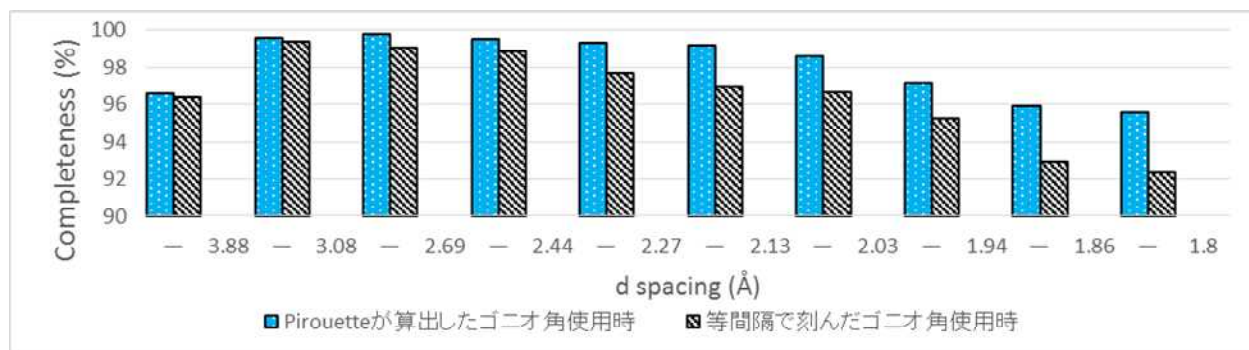
	Neutron	X-ray		Neutron	X-ray
Beamline	MLF BL03 iBIX	KEK PF BL-5A	R _{work}	20.69	15.52
Wavelength (Å)	3.0 ~ 5.7	1.00	R _{merge}	23.53	16.43
Space group	I 222		RMSD (bond)	0.009	
Cell ; a, b, c (Å)	94.09, 99.69, 102.92		RMSD (angle)	1.330	
Resolution (Å)	2.00	1.39	Amino acid	388	
R _{merge} (%)	24.81 (44.07)	5.9 (37.9)	Solvent	127	
Completeness (%)	94.9 (86.0)	99.4 (100.0)	Mg	2	
Redundancy	4.04 (2.66)	8.0 (8.0)	D-glucose (cyclic)	1	
I/σ	3.69 (1.41)	55.9 (6.8)	D-glucose (linear)	1	

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.

3.1 Pirouette

Pirouette には Completeness のみを基準に最適化するモードと、Completeness と Redundancy を基準に最適化するモードがあるが、前者を用いた。Pirouette の計算を実行する際には、UB 行列や測定方位数等を決めておく必要があるのだが、UB 行列はテスト測定の結果から算出したものを用いた。測定方位数は、ビームタイムを考慮して 26 方位と定めた。Pirouette が算出したゴニオ角を用いた場合の Completeness 予測値を下図に青色の棒グラフとして示した。横軸が分解能シェル、縦軸が Completeness である。ここで、Pirouette が算出したゴニオ角を用いて測定を行うのではなく、ある刻み幅で等間隔にゴニオメーターを回転させて測定を行うとした場合を比較対象として、そのときの Completeness 予測値を算出してみると、下図の黒斜線の棒グラフで示される値となった。

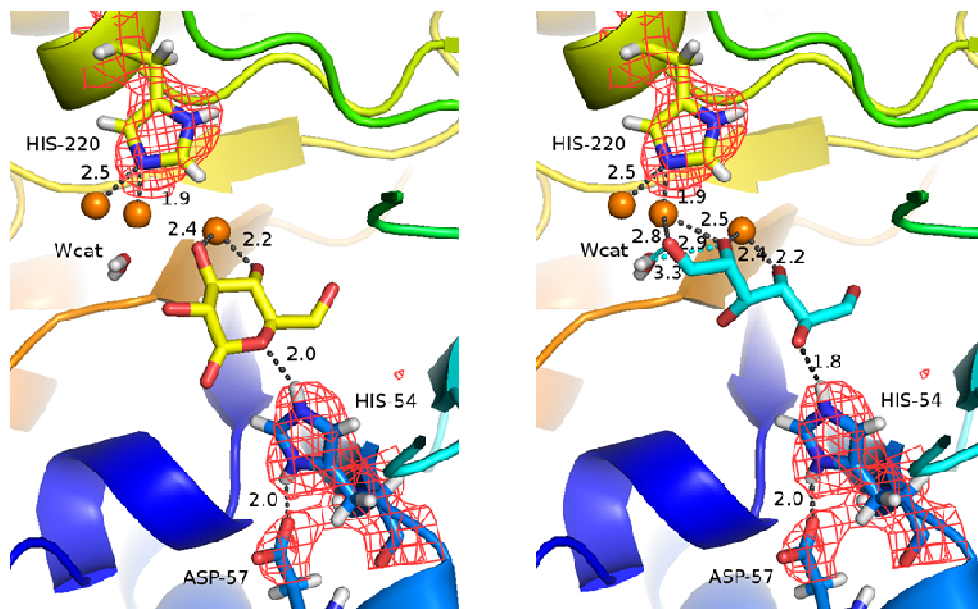


両者の棒グラフを比較すると、いずれの分解能シェルにおいても Pirouette が算出したゴニオ角を使用した場合の方が Completeness の値が高いことが読み取れる。もちろん、比較対象とするゴニオ角の選び方を工

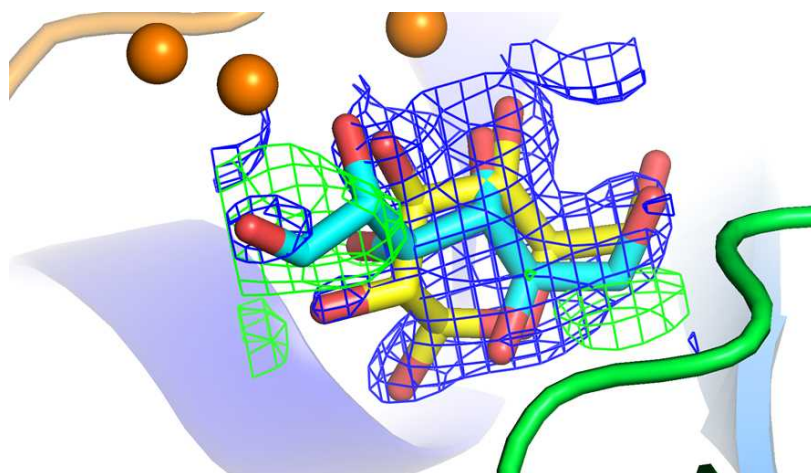
夫すればその差は縮まるが、そのような手間をかけることがなくなるという点で、Pirouette を用いることは有用だといえる。

3.2 中性子構造解析

X-N 同時精密化の結果、酵素反応条件下での活性部位のヒスチジン残基のプロトネーション状態が観測され、基質が環状構造と線状構造の 2 つを取っていることも観測された。Mg 金属も基質の構造に対応したサイトにディスオーダーしている様子も合わせて観測できた。右図の左側には、活性部位の環状基質に対してのアミノ酸のプロトネーションを含む相互作用を示し、右図の右側には線状基質に対する同様のものを示す。橙色の球で示した Mg がそれぞれの基質と相互作用していることが分かる。



右の図には、環状基質をモデル(黄色)に置いたときに生じる余剰電子密度(緑色の網)に線状モデル(水色)を重ねた図を示す。占有率はそれぞれ 2 : 1 の割合で精密化されており、異性化の前の状態のものか異性化後のものかは、水素の位置を精密に決めないとはっきりしないので、精密な解析を計画している。



今後、これらのデータを用いて、基質の開閉の状態や異性化の有

無、周辺のアミノ酸や水和水の相互作用を詳細に解析することで、反応機構の解明が期待できる。

4. 結論(Conclusions)

- (1) 中性子解析の結果、反応途中の活性部位のアミノ酸および金属原子の位置および基質に対する相互作用が判明した。また、このような酵素反応が自然に起こる条件での結晶構造解析により、初めて基質の 2 つの分子構造が観測することができた。
- (2) Box sum 法の結果(Completeness)から、Pirouette に十分実用性があることが確認できた。

以下は、MLFで内部資料として使用します。(日本語で記載)

The following sheet is for internal use only. Please describe in Japanese.

○実験成果の効果(学術的価値、産業応用上の意義、社会的意義、教育的意義等)を記述下さい。

Please describe merits of the experiment (scientific merits, industrial application merits, social merits, educational merits, etc.).

- (1) 酵素反応が自然に起こる条件での結晶構造解析により、ダイナミックな基質の構造が初めて明らかとなり、酵素反応機構解明への糸口が見出せた。
- (2) Pirouette の信頼性が向上したため、売り上げに繋がることが期待される。

○論文等による成果発表の予定(Publication of results)

a) 発表形式 ^(*1) Publication style ^(*1)	b) 発表先(誌名、講演先) ^(*2) Publication/Meeting information ^(*2) (Name of journal/book or meeting)	c) 投稿/発表時期 ^(*3) Date of paper submission or presentation ^(*3)
ポスター発表	日本化学会関東支部茨城地区研究交流会 (東海)	2016年11月25日
ポスター発表	2016年度量子ビームサイエンスフェスタ (つくば)	2017年3月14日
論文	Physica B (Elsevier)	2017年9月5日 (投稿済)

【記入要領】(Instructions)

(*1) 原著論文、総説、プロシーディングス、単行本、特許、招待講演(国際会議)、その他口頭発表等、具体的な発表方法を示して下さい。

Please describe planned publication and/or presentation style; *ex.* refereed journal, review article, conference proceedings, book, patent, invited talk, oral presentation *etc.*

(*2) 成果を発表する誌名、講演先を示して下さい。

Please describe the name of journal or book you are planning to submit, or name of meeting you will make a presentation.

(*3) およその発表予定時期を示して下さい。(3月以内、6月以内、1年以内、2年以内、2年以上先、等)

Please describe the estimated date of paper submission or presentation; *ex.* within 3 months, within 6 months, within 1 year, within 2 years, beyond 2 years, *etc.*

○成果になる予定が立たない場合の理由と今後の計画を記述してください。

In case you can not publish your results, please describe reasons and future plan.

(例:「論文になる十分な結果が得られなかった」、「複数回の実験が必要で次回の課題終了後に発表予定」、等) 特になし。