 <p style="text-align: center;">MLF Experimental Report</p>	提出日(Date of Report) 2021年11月11日
課題番号(Project No.) 2021PX2003 実験課題名(Title of experiment) グルコース耐性 GH1 β -グルコシダ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) 伏信進矢 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) 2021年6月29日～7月10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>低炭素・循環型社会の実現に向けたバイオマス利用において分解酵素(セルラーゼ)が盛んに利用されているが、その最終段階のボトルネックがβ-グルコシダーゼ(BGL)である。BGLの多くは反応産物のグルコースで強く阻害されるためにその後の発酵・変換効率が著しく落ちる。Td2F2は堆肥メタゲノムから得られたGH1ファミリーに属するBGLである。Td2F2は高濃度のグルコースでむしろ活性化されるグルコース耐性BGLであり、糖鎖を転移する糖転移活性も高いことが分かっている(内山ら <i>JBC</i>, 2013)。我々はTd2F2のX線結晶構造解析を行いグルコース耐性に寄与する残基(N223)を同定した(松沢ら <i>FEBS J</i>, 2016)。またGH1の反応機構はグルコシル-酵素共有結合中間体を経ると想定されており、これが糖転移活性の要因となっていると考えられているが、確定的な実験的根拠は得られていない。本課題では中性子構造解析により水素原子を含む立体構造を決定し、Td2F2の反応機構、特にグルコース耐性と糖転移活性の構造基盤を明らかにすることを目的とする。グルコース耐性BGLは実際のバイオマス生産工場で使われるセルラーゼ製剤にも添加されており、その生産力向上に向けた改変BGLの作出につながると期待される。</p>

<p>2. 試料及び実験方法</p> <p>Sample(s), chemical compositions and experimental procedure</p>

2.1 試料 (sample(s))

堆肥メタゲノム(環境中 DNA)由来 β -グルコシダーゼ Td2F2 単結晶(野生型、重水置換)

2.2 実験方法(Experimental procedure)

石英キャピラリーに封入した4個の野生型 Td2F2 結晶でテスト測定(中性子回折像の観察)を行い、そのうち1個で本測定を行った。条件は以下の通りである。

実験日	6/29-7/10	結晶体積	約 5.51mm ³	測定温度	常温
測定方位数	33	結晶方位	中性子の波長範囲	2.28-6.19 Å	
加速器出力	600kW	検出器	34 台		

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.

重水中で成長させた、4個の野生型 Td2F2 結晶(柱状で外形寸法は①4.18 mm×1.88 mm、②3.53 mm×1.58 mm、③3.51 mm×1.25 mm、④2.31 mm×1.16 mm)でテスト測定を行った。結晶①の外形を図1に示す。そのうち、最も成績の良かった結晶①で本測定を行った(図2)。

プログラム STARGazer を用いて回折像の処理を行い、空間群 $P2_12_12_1$ ($a = 69.95$, $b = 71.18$, $c = 97.52$ Å)、最大分解能 1.80 Å、反射の総数 867,901、 $R_{pim} = 0.0944$ 、完全性 99.1%、冗長度 8.09 の中性子回折データセットを得た(表1)。その後 2021 年 10 月 20 日に、KEK PF BL5A にて同一結晶を用いて X 線回折データを測定し、プログラム XDS を用いて回折像を処理し、最大分解能 1.19 Å の X 線回折データセットを取得した。現在、X 線回折データと中性子回折データの両方を用いた XN refinement をプログラム Phenix を用いている。X 線で $R/R_{free} = 0.164/0.179$ 、中性子で $R/R_{free} = 0.267/0.277$ まで精密化が進んでおり、中性子散乱長密度図を参考に D および H 原子を追加している段階である。H および D 原子は中性子散乱密度図で確認できている(図3)。

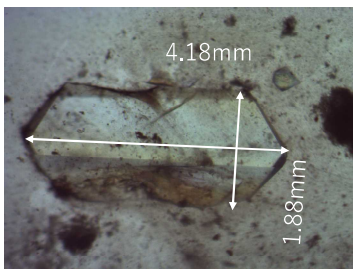


図1 中性子測定に用いた結晶①

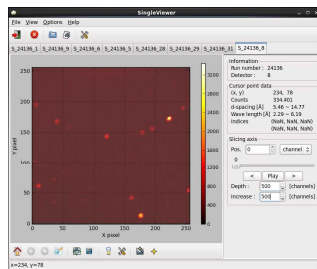


図2 中性子の回折斑点

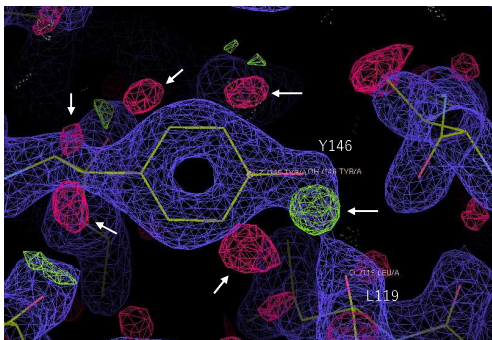


図3 Tyr146周辺の中性子散乱長密度図

表1 中性子回折データセットの統計値
Td2F2(Apo)

Data collection	Neutron
Beamline	iBiX (J-PARC)
Space group	$P2_12_12_1$
a,b,c (Å)	69.95, 71.18, 97.52
α,β,γ (°)	90, 90, 90
Resolution (Å)	22.21-1.80 (1.86-1.80)
No. of observed reflections	367901
No. of independent reflections	45460 (4448)
Rmerge	0.2544 (0.9854)
Rpim	0.0944 (0.4187)
CC1/2	0.9811 (0.4686)
$I/\sigma I$	8.47 (1.71)
completeness	99.1 (98.4)
Redundancy	8.0929 (6.1996)

4. 結論(Conclusions)

野生型のリガンドフリー結晶については十分なデータが得られたため、現在では、グルコース複合体の結晶を調製中である。