

 <b>茨城県</b> IBARAKI Prefectural Government <h2 style="text-align: center;">MLF Experimental Report</h2>	提出日(Date of Report) 2019/3/28
課題番号(Project No.) 2017PX0002 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 に關与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) 2017/4/11~5/1

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.

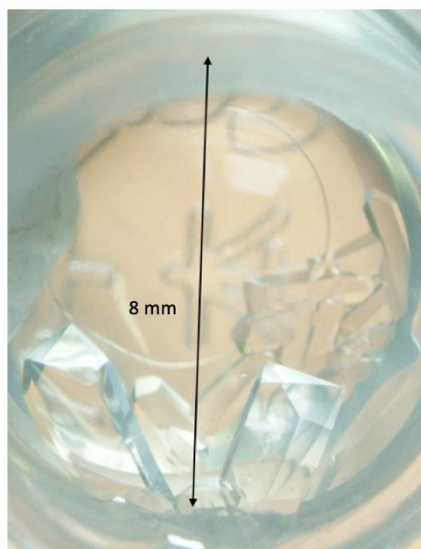
<p>1. 実験目的(Objectives of experiment)</p> <p>セルロース系バイオマスの有効利用に貢献することを目的として、立体反転型に分類されるセルロース加水分解酵素（セルラーゼ）について、活性に關与する水分子の位置・向き・状態（プロトネーションなど）を中性子構造解析により決定し、その反応メカニズムを明らかにすることを旨とした。今回実験対象としているセルラーゼ <i>PcCel6A</i> はこれまでに高分解能 X 線結晶構造解析による触媒残基のプロトン化状態の解析等を行っているが、反応メカニズムの詳細を明らかにするためには水分子の配向の解析が必須となる。今回の実験でリガンド複合体の性子回折データの取得を行うこととした。</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)) セルラーゼ <i>PcCel6A</i></p> <p>2.2 実験方法(Experimental procedure) 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。）

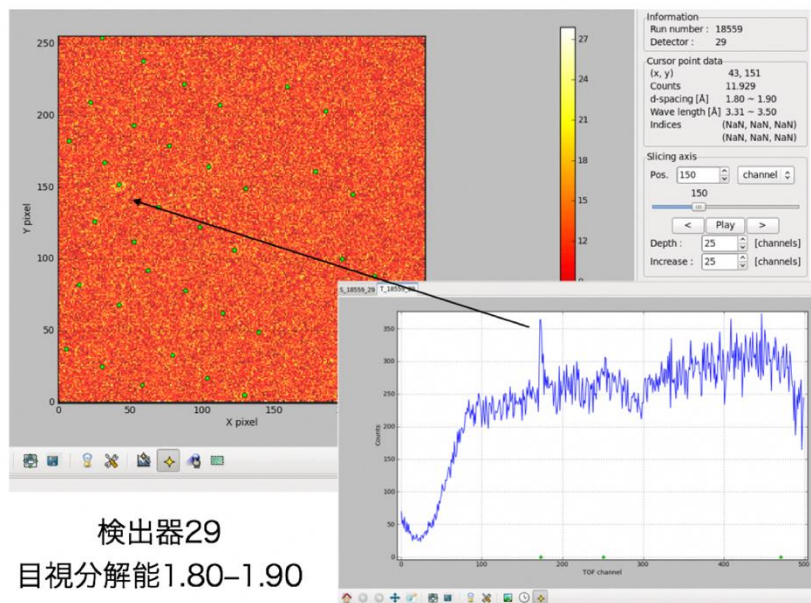
Experimental results and discussion. If you failed to conduct experiment as planned, please describe reasons.

#### 【PcCel6A のリガンド複合体の中性子構造解析】

PcCel6A のリガンド複合体の重水結晶を作製して中性子回折実験に用いた。テスト測定を行ったところ、目視最高分解能は検出器 6 番と 29 番で 1.8-1.9 Å であった。



PcCel6A結晶



検出器29  
目視分解能1.80-1.90

さらに 16 日間の本測定を行い、分解能 1.9 Å のデータを取得した。構造解析の結果、活性中心付近に位置する 2 つの水分子が常温では配向を決定できないような固定されていない水分子であることがわかった。本ファミリーの反応機構として水分子を介したプロトン転送が考えられているため、これまで凍結状態でデータ測定を行っている X 線結晶構造解析では見落とされていた新たな知見となった。また、よく配向している水分子について検討したところ、一般酸触媒の周囲にプロトンネットワークが形成されていることが明らかとなった。これまで水分子ネットワークから一般塩基触媒としてプロトンを受容すると考えられていたアミノ酸はこの酸触媒付近のネットワークの形成に関与していると考えられたため、これまで提唱されていたメカニズムを再考する必要性がさらに高まるような結果となった。今後、アポ体の立体構造等も含めて新たな反応メカニズムの検討を進めていく予定である。

### 4. 結論(Conclusions)

2017 年度は PcCel6A のリガンド複合体の中性子構造解析を行い、はじめて PcCel6A の中性子立体構造解析により水素原子の可視化を行った。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。今後、PcCel6A アポ体の構造からの知見と合わせて反応機構について検討し、2019 年度中に論文として発表する予定である。