

セロビオヒドロラーゼの熱安定化メカニズム解明を目指した 宇宙空間での大型結晶化

Preparation of Large-Volume Crystal of Cellobiohydrolase Under Microgravity to Investigate the Mechanism of Thermal Stabilization

山口空¹, 砂川直輝¹, 松山佳織¹, 立岡美夏子², 五十嵐圭日子^{1*}

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科, 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

² 国立研究開発法人海洋研究開発機構 海洋機能利用部門生命理工学センター,
〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2 番地 15

Sora YAMAGUCHI¹, Naoki SUNAGAWA¹, Kaori MATSUYAMA¹,
Mikako TACHIOKA², and Kiyohiko IGARASHI^{1*}

¹The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657, Japan

²Deep-Sea Nanoscience Research Group, Research Center for Bioscience and Nanoscience,
Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology,
2-15 Natsushima-cho, Yokosuka City, Kanagawa, 237-0061, Japan

1 はじめに

糖質加水分解酵素 (GH) による糖化反応は、物理化学的処理よりも少ないエネルギーでバイオマスから可溶性糖を作り出す手法として期待されている。これまでの研究では、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来で GH ファミリー 6 に属するセロビオヒドロラーゼ *PcCel6A* の高温活性型変異体 Δ freeCysにおいて、活性中心から離れたシステイン残基のセリン残基への置換が、高温環境中での酵素の安定性に影響を及ぼすことを明らかにしてきた[1]。

そこで、これらのアミノ酸置換変異が酵素の熱安定性に影響するメカニズムを明らかにするために、中性子結晶構造解析によって変異酵素内の水素結合ネットワークを可視化することを着想した。一方、中性子結晶構造解析を行うためには、通常の X 線結晶構造解析と比較してはるかに大きなタンパク質結晶の取得が必須となる。

よって本研究では、タンパク質結晶の成長を妨げる対流が起こりにくい宇宙の微小重力下において *PcCel6A* Δ freeCys の大型結晶を作製するための工程を確立し、得られた宇宙結晶を用いて中性子/X 線結晶構造解析を試みた。

2 実験

PcCel6A Δ freeCys の触媒ドメインを酵母 *Pichia pastoris* を用いた異宿主発現系で生産し、2段のカラム精製を行った。結晶化においては、実験中の空気酸化による影響が危惧される従来のメチルベンタジオール (MPD) ではなく、酸化耐性のあるポリエチレングリコール (PEG) と NaCl を用いた結晶化剤条件を新たに確立した。そして、蒸気拡散法、バッチ法、カウンターディフュージョン (CD) 法と段階的に大型の反応条件へと検討を行い、1回目の

宇宙実験で採用する PEG と NaCl 濃度の組み合わせを決定した。

宇宙実験は有人宇宙システム株式会社 (JAMSS) の高品質タンパク質結晶生成サービス (Kirara) を利用し、重力が微小な国際宇宙ステーション (ISS) において約 1 ヶ月間の結晶化を行った。さ

らに、地上に帰還した結晶をキャビラリから出し、中性子および X 線による回折測定をの大強度陽子加速器施設 (J-PARC) のビームライン BL-03 および PF のビームライン BL-5A にて行った。

2 回目の宇宙実験に向けては、宇宙結晶の中性子回折測定フローを効率化すべく、重水素化した結晶化剤を用いた条件検討を行った。

3 結果および考察

Kirara で用いる CD 法では大量のタンパク質試料が必要となるため、蒸気拡散法によって *PcCel6A* Δ freeCys の結晶化条件を広く探索し、バッチ法によって回折に適する形状の結晶が生成する PEG と NaCl 濃度の組み合わせを特定することで、理論的な工程から宇宙での大型結晶化条件を絞り込むことができた (成果 1)。

ISS での結晶化では、最大 $1.46 \text{ mm}^2 \times 0.3 \text{ mm}$ 程度の大型結晶の取得に成功し (図 1)、X 線回折測定の分解能は常温で 1.71 \AA 、低温で 1.08 \AA と、従来の MPD を用いて作製した結晶と同程度の品質を有することが確認された。さらに、ISS で作製した結晶へ中性子線を照射したところ、30 分間の測定で 5.22 \AA の目視分解能が得られたが、結晶が半日の間に著しく劣化してしまったことから、分解能を向上させる長時間測定の実施は断念した。

この結晶の劣化は、結晶化用キャビラリから石英製の中性子測定用キャビラリに結晶を移す過程で、結晶に負荷がかかることに起因すると考えられた。

そこで、結晶の移し替え作業を不要にするため、中性子測定に使用できる石英製の結晶化キャピラリを用意し、測定ノイズの低減を目的に予め重水素置換した結晶化剤を用いて結晶化条件の検討を行った。その結果、重水素化結晶は軽水素結晶と同程度の品質を有しており、キャピラリ中の溶液を吸い出す操作のみで、宇宙から帰還した結晶への負荷を最小限に抑えて回折測定を行う手法となり得ることが確認できた（図2・3）。

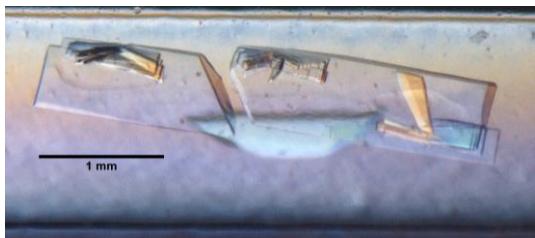


図1：宇宙実験で得られた結晶



図2：溶液を吸い出した石英製キャピラリ



図3：石英製キャピラリを用いたX線回折測定

4 まとめ

結晶の成長を妨げる対流が起こりにくい宇宙の微小重力下で大型結晶を作製するための工程を確立し、中性子回折測定を試みた。宇宙での結晶化の結果、高品質な大型結晶の取得に成功したが、中性子測定

用キャピラリに移す際の負荷によって結晶が劣化することが判明したため、宇宙結晶の中性子回折測定フローの効率化に取り組んだ。

今後は、石英製キャピラリ内で実際に大きな重水素化結晶を作製して中性子/X線結晶構造解析を完遂し、熱安定化メカニズムを解明することを目指す。

謝辞

X線回折測定の際にはKEKの皆様に大変お世話になりました。深く感謝申し上げます。

また、宇宙航空研究開発機構 石田卓也先生、株式会社コンフォーカルサイエンス 田仲広明先生、高橋幸子先生、広田恵理華先生、茨城大学 日下勝弘先生をはじめとする共同研究者の皆様に大変感謝致します。Kiraraサービスをご提供いただいたJAMSSの皆様、中性子回折測定をご指導いただいたJ-PARCの皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] S. Yamaguchi *et al.*, *J. Appl. Glycosci.*, **67**, 79 (2020)

成果

- 論文発表 : Sora Yamaguchi, Naoki Sunagawa, Kaori Matsuyama, Mikako Tachioka, Erika Hirota, Sachiko Takahashi, Kiyohiko Igarashi “Preparation of large-volume crystal of cellulase under microgravity to investigate the mechanism of thermal stabilization”, *Int. J. Microgravity Sci. Appl.*, **38** (4) 380000 (2021); doi: 10.15011/jasma.38.38000

* aquarius@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp