

 茨城県 <small>IBARAKI Prefectural Government</small>	MLF Experimental Report	提出日(Date of Report) 2019年3月25日
課題番号(Project No.) 2018PX0005 実験課題名(Title of experiment) 水素代謝に関与する酵素群の中性子結晶構造解析 実験責任者名(Name of principal investigator) 庄村康人 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.) BL03 iBIX 実施日(Date of Experiment) 2018/5/26-27(テスト測定) 2018/5/29-6/8(本測定)

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.

1. 実験目的(Objectives of experiment)

ルブレドキシンは多くの生物種に存在する非ヘム鉄をもつ電子伝達タンパク質である。以前より、同タンパク質の酸化還元中心の鉄をニッケルに置換すると水素分解活性を示すようになることが知られているが、その反応機構の詳細は不明である。反応機構や詳細な原子構造の解明は、酵素の触媒能や安定性の向上に必須であるが、そのためには反応物である水素分子や生成物のヒドリドイオンやプロトンが酵素のどの部位とどのように結合するかを明らかにする必要があるため、本研究課題ではその目的のために最も有用と考えられる中性子結晶構造解析を可能とする結晶の調製およびその回折データの取得により水素合成反応機構の解明を目指す。

2. 試料及び実験方法

Sample(s), chemical compositions and experimental procedure

2.1 試料 (sample(s))

超好熱菌 *Caldanaerobacter subterraneus* 由来 Ni 置換型ルブレドキシン(Cs-NiRd) 結晶(野生体・酸化型、重水溶液に2週間浸漬したもの) サイズ: 0.78 mm³

2.2 実験方法 (Experimental procedure)

標的遺伝子を大腸菌で発現させ、回収した大腸菌を超音波破碎し、遠心分離後の上清について Strep-Tactin カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、及びゲルろ過クロマトグラフィーによる精製を行った。アフィニティータグは HRV3C プロテアーゼによって精製の途中で切除し、ニッケルの挿入は陰イオン交換クロマトグラフィー後に行った。結晶化は硫酸アンモニウムを沈殿剤とした条件で行い、析出した結晶を重水素化硫酸アンモニウムおよび重水からなる抗凍結剤に二週間浸漬し、液体窒素で冷却したものを中性子回折実験に用いた。本データ測定は2018年5月29日から6月8日にかけて(506 kW 運転)合計30方位について行った。

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.

重水素化後の凍結結晶（図 1）を用いて中性子回折データ測定を行い、最高分解能 1.27 Å としてデータ処理を行った結果を表 1 に示す。I/sigma > 2 を最高分解能の決定の指標とすると最高分解能は 1.4 Å 程度が妥当であるが、より広角側に有意な回折点がある可能性を考慮して X 線回折データとの joint refinement は 1.27 Å までの反射を用いて行った。重水素のアサインはまだ行っていないが、精密化を 10 サイクルのみ行った結果（散乱長密度図）を図 2 に示す。精密化のごく初期の段階にもかかわらず、交換可能なアミノ基の重水素と交換不可な主鎖上の軽水素が明確に識別された。また、結晶析出後凍結処理まで 3 ヶ月近く時間を置いたためと考えられるが、数%程度の Ni 脱離が電子密度および散乱長密度において確認された（図 2）。

表 1. 中性子回折データ処理統計値

	[dmax	dmin]	NPeaks	Cmp[%]	Rint	Rpim	Redundancy	I/sig_Normal	I/sig_Special
Overall	13.76	1.27	84131	95.0	0.1991	0.0827	6.6068	4.45	7.40
Outer shell	13.76	2.73	7991	96.2	0.0968	0.0420	5.7119	30.88	32.30
	2.73	2.17	11765	99.7	0.1353	0.0479	8.5813	9.85	10.37
	2.17	1.90	11473	99.2	0.1685	0.0590	8.6458	6.42	7.31
	1.90	1.72	10045	98.9	0.1885	0.0707	7.5869	4.65	5.13
	1.72	1.60	8738	96.0	0.1935	0.0768	6.8372	3.83	4.15
	1.60	1.51	7862	93.8	0.2516	0.1056	6.3403	2.82	3.06
	1.51	1.43	7199	92.7	0.3190	0.1393	5.9496	2.15	2.35
	1.43	1.37	6698	91.3	0.4284	0.1936	5.5724	1.59	1.74
	1.37	1.32	6297	91.2	0.4617	0.2134	5.3184	1.44	1.59
	1.32	1.27	6063	90.6	0.5538	0.2611	5.0567	1.23	1.34



図 1. 野生体 Cs-NiRd 酸化型結晶

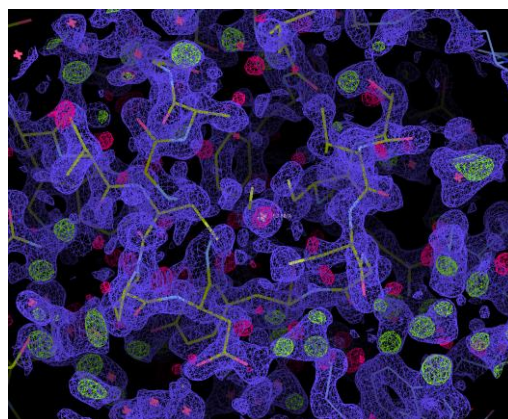


図 2. 野生体 Cs-NiRd 酸化型の中性子散乱長密度図

4. 結論(Conclusions)

超好熱近由来 Ni 置換型ルブレドキシンの大型結晶の調製に成功し、まずはその野生型・酸化型での中性子結晶構造を決定するべく、その X 線および中性子回折データを測定した。解析の結果、精密な中間体構造の解析においては無視できない程度（数%）の Ni の脱離が確認されたため、今後はタンパク質試料調製後の早い段階で凍結処理をしたり、Ni 存在下で結晶化を行ったりするなどの対策を講じる必要がある。散乱長密度図は、反応中間体で精製されると考えられるプロトンやヒドリドを同定するには十分な質であり、今後、還元型結晶の調製およびその結晶構造解析による反応機構の解明が期待される。