

 茨城県 IBARAKI Prefectural Government	MLF Experimental Report	提出日(Date of Report)
課題番号(Project No.) 2018PX0008 実験課題名(Title of experiment) 世界最高分解能で明らかにするフェレドキシンの水素と電子の化学 実験責任者名(Name of principal investigator) 海野 昌喜 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.) iBIX, BL03 実施日(Date of Experiment) 2018/11/2~2018/11/19

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>グラム陽性菌 <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> 由来のフェレドキシン (BtFd) は、4Fe-4S クラスターを有するフェレドキシンの1つである。BtFd の酸化還元電位の制御機構は、アミド窒素と鉄硫黄クラスターとの水素結合 (NH...S) やバルク溶媒との水素結合によって制御されているのではないかと考えられている。一方で、BtFd については、水素原子を可視化した立体構造情報が無いため、実験的証拠に乏しい。同様の鉄硫黄タンパク質である高電位鉄硫黄タンパク質 (HiPIP) の水素原子の位置情報(水分子は除く)は既に報告されており、BtFd の酸化還元電位は大きく異なる。水素結合様式を可視化し、比較する必要がある。水素原子の正確な位置情報獲得は酸化還元電位の制御機構解明に重要であり、本研究では、中性子結晶構造解析で BtFd の水素を含んだ詳細構造を解明するのが目的である。</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>グラム陽性菌 <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> 由来の 4Fe-4S 型フェレドキシン (BtFd)</p> <p>2.2 実験方法(Experimental procedure)</p> <p>大腸菌による大量発現、硫安分画とそれに続くカラムクロマトグラフィー(疎水性クロマトグラフィー→透析→陰イオン交換クロマトグラフィー)で高純度に精製した。450 mM の塩化ナトリウムが入った緩衝液で溶液を置換しながら 60 mg/mL 程度まで濃縮した。得られた試料はボタン透析法によって、結晶化・結晶大型化を行った。ボタンは主に 20 μL のもの (Hampton, Dialysis Buttons) を用いた。低温では結晶が割れてしまったため、常温で中性子回折実験を行った。</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.

BtFd の結晶化にはボタン透析法を用いた。再現性は悪いが、 2 mm^3 を超える良質な結晶を得ることができた。結晶作製後、J-PARC MLF の iBIX で低温での中性子回折実験を行った。しかし、大型結晶の凍結条件を確立することができず、回折像は得られなかった。そこで、回折実験を常温で行ったところ、目視で 1.2 \AA 分解能程度の非常に綺麗な回折像を得ることに成功した。テスト測定から本測定までの期間が空いたことで結晶が劣化し、分解能が落ちてしまったが、最終的に 1.6 \AA の高分解能中性子回折データを得ることができた。同結晶を用いて PF-AR-NW12A で X 線回折データ収集を行い、中性子回折データと併せたジョイントリファインメントを行った。この結果、水素原子を含む無損傷の構造情報を得ることができた。この構造から酸化還元電位の制御に関わっていると思われるいくつかの水素結合を確認することができた。共同研究者によって得られていた 0.7 \AA 分解能の X 線結晶構造ではほとんど見えなかった水素原子を可視化することが出来、これによって確認できた、アミド窒素の水素原子および水分子と、鉄硫黄クラスターの硫黄原子およびシステイン残基の硫黄原子との水素結合 (NH...S, OH...S) の数は 9 個だった。また、HiPIP の X 線結晶構造で確認できた水素結合数は 5 個だった。この水素結合数の違いは BtFd のほうが電荷を蓄積しやすいことを示している。また、 0.7 \AA 分解能の X 線構造との比較を行った結果、鉄硫黄クラスターをアミノ酸残基との水素結合距離が微妙に異なっていることが分かった。X 線結晶構造で見えている水素原子は中性子結晶構造と比較して 0.2 \AA 程度のずれがあった。

また、鉄硫黄クラスターと水素結合可能な距離にある Thr63 の側鎖の OH 基は過去の研究において水素結合していると考えられていた。中性子結晶構造においても O 原子と硫黄原子は水素結合可能な距離にあったが、水素原子は鉄硫黄クラスターとは別の方向を向いており鉄硫黄クラスターとは水素結合していないことが分かった。さらに、Thr63 は別の残基と水素結合していることが分かった。この付近にはシステイン残基との水素結合をはじめとする多数の水素結合が存在し、バルク水ともつながっていることから、酸化還元電位の制御にも関わる重要な水素結合ではないかと考えられる。また、鉄硫黄クラスターと結合している水分子はタンパク質分子の空洞部分に位置しており、鉄硫黄クラスターと外界とのやり取りに関係している部分なのではないかと考えられる。その後の計算科学的解析では、Thr63 の次のアミノ酸である Asp64 に LUMO が集積していることが見られ、現在はそのアスパラギン酸の他、他のアスパラギン酸が酸化還元電位やこの BtFd の特性と関連しているかを変異体解析によって調べている。

4. 結論(Conclusions)

- 4Fe-4S 型フェレドキシンである BtFd の中性子結晶構造解析に 1.6 \AA 分解能で成功した。
- 水素原子を可視化し、鉄硫黄クラスターの S との水素結合の本数は 9 個であると考えられる結果を得た。これは同様の 4Fe-4S 型鉄硫黄クラスターを含んだ HiPIP という高電位鉄硫黄タンパク質よりも多く、酸化還元電位の制御に関わることが裏付けられた。
- Thr63 の水素原子の配向が予想されているものと異なっていることが分かった。
- Asp64 がこの BtFd の機能を制御していることが示唆された。