

 茨城県 <small>IBARAKI Prefectural Government</small>	MLF Experimental Report	提出日(Date of Report)
課題番号(Project No.) 2018PX0010 実験課題名(Title of experiment) 銅含有亜硝酸還元酵素の中性子線結晶構造解析 実験責任者名(Name of principal investigator) 福田庸太 所属(Affiliation) 大阪大学		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) 2018 4/23~24, 2018 6/16~17 2018 11/25~12/9

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)
<p>ハーバー・ボッシュ法の登場以来、土壌や水中への窒素の過剰流入が自然の窒素循環を崩してきた。水中や土壌中の窒素は微生物が行う脱窒という働きによって大気中へと戻されるため、脱窒に関わる微生物酵素の機構解明は大気環境や農業環境の改善へ繋がると期待されている。銅含有亜硝酸還元酵素(CuNIR)は脱窒過程の鍵酵素であり、亜硝酸イオンを一酸化窒素と水に変換する。この反応にはプロトン共役型電子移動(PCET)が関わっており、その理解のためには、水分子やアミノ酸上の水素・プロトンの位置を知らねばならないが、活性中心周りのそれらの可視化は、X線結晶構造解析では原子分解能においても困難である。そこで本実験では、中性子結晶構造解析を用いて全原子構造情報を取得し、CuNIRの反応機構の完全解明を目指した。</p>
2. 試料及び実験方法 Sample(s), chemical compositions and experimental procedure
2.1 試料 (sample(s)) <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> 由来 CuNIR の結晶 2.2 実験方法(Experimental procedure) 上記結晶を用い、クライオノズル下で低温窒素気流によりクライオループ上で凍結してiBIXにおいてテスト測定をおこなった。フルデータ測定も低温で行い、得られた中性子回折強度データの処理を行った。

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.

2018A 期のテスト測定にて、データ収集に適した大型結晶の準備方法（重水素と抗凍結剤の導入方法）と凍結条件を検討した。クライオストリームで直接凍結させると高分解能データが得られることが判明した。

2018A 期 11 月にフルデータ測定可能な大型結晶を用いて、11 月 26 日からデータ収集をおこない、その後同一結晶から収集した X 線回折データと同時精密化することにより分解能 1.5 Å での構造決定に成功した。解析の結果、活性中心周りの水素原子およびプロトンの位置をすべて決定でき、活性残基 Asp と His がそれぞれ脱プロトン化状態とプロトン化状態にあることが判明した。さらに、結晶化条件は低 pH (pH 4.6) であったにもかかわらず、休止状態の活性中心の銅イオン (T2Cu) には従来考えられていた水分子ではなく、水酸化物イオンが配位しているという予想だにできなかった知見が得られた。また、歪んだアミド結合の存在なども確認できた。ほかにも、T2Cu に配位する 3 つのヒスチジンのうち His134 の側鎖 N δ 原子上の重水素置換率が低いことが明らかになり、この原子が Cys135 の主鎖カルボニル O 原子と強い水素結合を形成していることが示唆された。このことはこの水素結合がタンパク質内電子移動の主たるルートであるとする過去の量子計算結果と一致していた。

4. 結論(Conclusions)

これまで X 線結晶構造解析では得られなかった CuNIR の反応機構に関する新規かつ重要な知見を中性子構造解析から得られることができた。本成果については、来年度中に論文を投稿する予定である。