

 MLF Experimental Report	提出日 Date of Report 2014.10.17
課題番号 Project No. 2013PX0008 実験課題名 Title of experiment タンパク質と基質／阻害剤複合体の中性子結晶構造解析 実験責任者名 Name of principal investigator 山田太郎 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 2013.05.01-2013.05.11

試料、実験方法、利用の結果得られた主なデータ、考察、結論等を、記述して下さい。(適宜、図表添付のこと)
Please report your samples, experimental method and results, discussion and conclusions. Please add figures and tables for better explanation.

1. 試料 Name of sample(s) and chemical formula, or compositions including physical form.
pD7.9 溶液で調整したヒト由来 α -thrombin-bivalirudin 複合体の単結晶

2. 実験方法及び結果 (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 method and results. If you failed to conduct experiment as planned, please describe reasons.
1. 中性子回折実験 大型結晶はマクロシーディング法により作成した。結晶の体積は 3.5 mm^3 であった。この結晶を直径 3.5 mm の石英キャピラリー(Hirugenberg Mark Tube)に重水を含む人工母液とともに封入した。このキャピラリーサンプルをゴニオメータヘッドにマウントして測定を行った。図1に測定時のiBIXの検出器配置および結晶の様子を示す。測定は中性子の検出効率が55%である改良片桐型検出器30台を用いた。MLFにおける陽子の加速器出力は300 kWであり、使用した中性子の波長範囲は $2.2 - 6.2 \text{ \AA}$ である。測定は室温で行った。24の結晶方向について、一方向あたり7.7時間測定した。全測定時間はビーム停止時間を含めて10日間である。図2に測定で得られたTOFラウエ回折像の一部を示す。#22 検出器で面間隔 d が 2.2 \AA である反射が確認された。中性子回折データの処理はSTARGazer ver. 1.0.0-rc3を用いて行った。ピークサーチはIntensity threshold with rebinning and filtering法、格子組み立てはreal space indexing法、積分はbox sum法を用いて行った。積分強度の統計処理および等価反射の平均化は茨城大学iBIX装置グループの日下勝弘氏作成のFortranプログラムMergeを用いた。 $I/\sigma(I) > 0$ の回折データを処理に使用した。結晶学的データをそれぞれ表5.2.2-1に示す。分解能

2. 実験方法及び結果(つづき) Experimental method and results (continued)



図1 実験時の iBIX と試料の様子

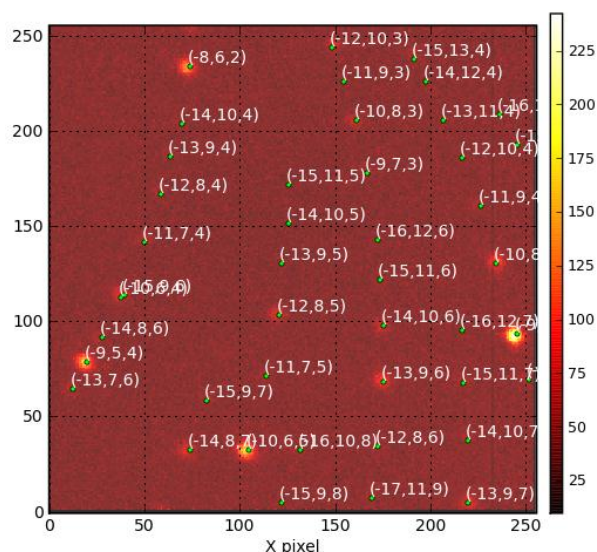


図2 TOF 中性子ラウエ回折像 (検出器#10)

計値より得られた回折強度データが比較的良好であることが判明した。この中性子及びX線回折データを用いて X/N 結合解析を行った。使用したプログラムは PHENIX ver. 1.8.3 である。結合長や角度のパラメータはプログラムで用意されているものを使用した。また交換可能な水素原子は水素と重水素の乱れ構造として扱い、その占有率を決定した。初期構造としてプロテインデータバンクに報告されている X 線構造 (pdb_ID:2HGT) を使用した。X 線および中性子回折データを PHENIX に入力し、交差検定のために中性子回折データ数にして約 10% の共通するテストセットを選んだ。まず初期構造に交換しない軽水素を発生させたのち精密化を行い、中性子散乱長密度図を見て、水和水の酸素を構造に含めた。さらに精密化を繰り返しながら交換可能な水素原子を配置した。精密化の結果を表 1 に示す。観測された構造因子と構造から計算される構造因子との一致度を表す信頼度因子 R が X 線と中性子の両方のデータに対して 20% 前後と許容できる結果となった。

表 1 結晶学的データ

	X-ray	Neutron
Space group, Z		C2, 4
$a, b, c / \text{\AA}$	71.04, 72.02, 72.36	
$\beta / ^\circ$		100.5
Resolution / \AA	36-1.6	20.4-2.0
R_{merge}	0.033	0.119
R_{work}	0.165	0.172
R_{free}	0.180	0.230

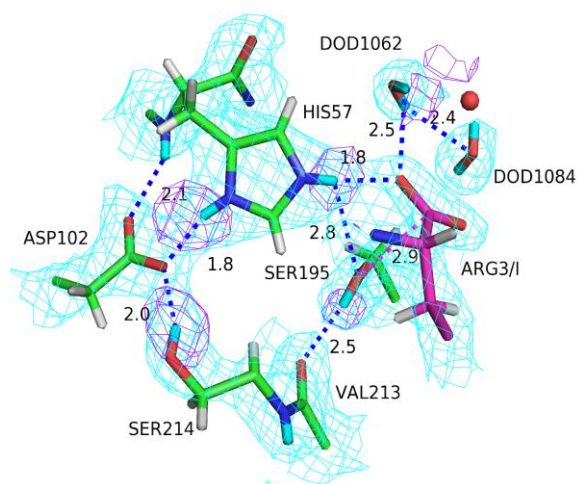


図3 得られた中性子散乱長密度図

図 3 に今回の解析で得られた活性部位の構造を示す。His57 と生成物の間には水素結合が存在する。