

 <b>MLF Experimental Report</b>	提出日 Date of Report
課題番号 Project No. 2014PX0001 実験課題名 Title of experiment パルス中性子による酸化還元酵素の構造・機能解明 実験責任者名 Name of principal investigator 玉田太郎 所属 Affiliation 日本原子力研究開発機構	装置責任者 Name of responsible person 日下勝弘 装置名 Name of Instrument/(BL No.) BL03 実施日 Date of Experiment 2014.5.12-2014.5.24

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.
高電位鉄イオウタンパク質(HiPIP) 化学式: C383 H592 N110 O118 S9 Fe4

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.
<p>HiPIP の大型結晶は、マクロシーディング法により作製した。小容量の結晶成長溶液を用いたタンパク質濃度と結晶化沈殿剤濃度の相図を作製し、その条件を元に大容量の結晶成長溶液を用いて種結晶を成長させることで、最終的に体積 1 mm<sup>3</sup>を超える良質な大型結晶を取得することに成功した。取得した大型結晶は、回折データのバックグラウンドを低減するため、重水溶液に浸漬した。また、結晶を冷却することで原子の揺らぎを抑え、高分解能の回折データを取得できると考え大型結晶の冷却条件の検討を行った。抗凍結剤として重水素化グリセロールを用い、最終的な抗凍結剤濃度に達するまで段階的に結晶周囲の溶液を抗凍結溶液に置換することで、結晶の劣化を防ぎ高分解能回折データが取得可能な冷却条件を決定した。中性子回折実験は、加速器出力 300 kW、検出器 30 台、波長範囲 1.1-5.0 Å において、結晶を 100 K の窒素気流中で冷却しながら実施した(図 1)。回折データセットは、結晶の 28 方位について、1 方位あたり 8.5 時間照射し、10 日間かけて取得した。回折点は高分解能側の検出器においてもはっきりと観測することができ、最高で 1.08 Å 分解能の回折点を観測することができた(図 2)。回折データ処理は、プログラム STAR<b>G</b>azerを用いて行った。回折点強度の積分領域、波長範囲を検討し、最終的にタンパク質として世界最高分解能である 1.1 Å 分解能の回折データセットとして処理を行うことができた。</p>

取得した中性子回折データの統計値は、Resolution range 15–1.1 Å、completeness 98.6%、 $R_{\text{int}}$  18.6%、 $I/\sigma(I)$  3.8であった。

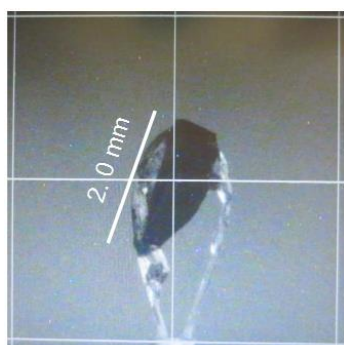


図 1 HiPIP 大型結晶

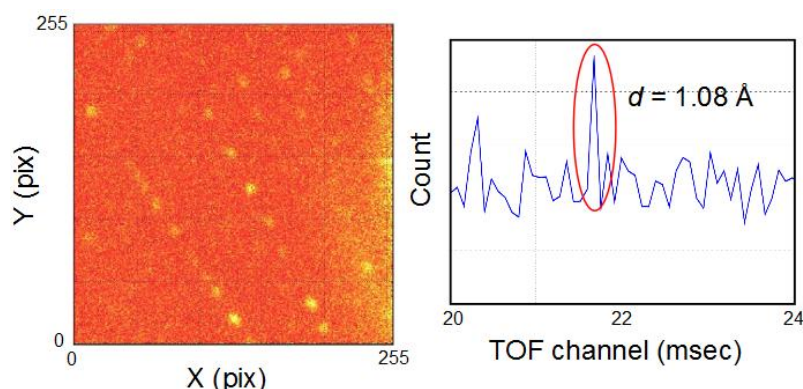


図 2 (左)回折像(検出器#30)、(右)高分解能回折点シグナル

中性子データと X 線データを相補的に利用した立体構造精密化を行うため、中性子回折データを取得した同一の結晶を用い、放射光施設 KEK Photon Factory の BL-5A ビームラインにおいて X 線回折データ収集を行った。その結果、X 線においても超高分解能である 0.66 Å 分解能の回折データセットを取得することができた。中性子データと X 線データを相補的に利用した立体構造精密化は、プログラム PHENIX を用いて行った。精密化は、通常の解析で用いられる手法に従い、まず X 線データのみを用い水素原子以外の原子座標と原子の揺らぎに対応する温度因子について行った。その後、中性子データと X 線データを相補的に利用し水素原子を含めて、原子座標と温度因子の精密化を行った。重水素と置き換わる可能性のある窒素原子、酸素原子に結合する水素原子については、重水素、軽水素の占有率の精密化を行った。通常分解能データでは、データ数の制約のため、水素原子の関与する原子間結合距離、結合角度を標準値付近に収束するような制約をかけた精密化が行われる。しかし、今回超高分解能の中性子回折データを取得できたため、制約をゆるめた精密化を実施した。その結果、データとモデルの一致度を示す  $R$  値は 20%程度となった (Table 1)。立体構造精密化の結果、アミノ酸残基の全ての水素原子をモデルに含めることができた。また、タンパク質表面の解離性アミノ酸残基全てについて、プロトン化状態を決定することができた。超高分解能中性子回折データを用いた立体構造精密化により、標準的な結合距離、結合角度によって決まる位置からずれた水素原子を多数観測することができた。

Table 1 中性子結晶学的データ

Resolution (Å)	15–1.1
Space group	$P2_12_12_1$
Unit cell parameters (Å) $a, b, c$	46.3, 58.9, 23.5
$R_{\text{work}}$ (%)	18.4
$R_{\text{free}}$ (%)	22.2