

 MLF Experimental Report	提出日 Date of Report 2015.11.25
課題番号 Project No. 2014PX0006 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.) BL03 iBIX 実施日 Date of Experiment

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.
ヒト α -トロンビン・アセチルヒルジン断片複合体単結晶

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.
<p> 体積 1.2 mm³ のヒトα-トロンビン・アセチルヒルジン断片複合体単結晶をマクロシーティング法により作成した。この結晶を重水素化人工母液と共に石英ガラス管に封入して、iBIX の3軸型ゴニオメータに取り付けた。回折実験は室温で行った。加速器の出力は 300 kW であった。回折像の分解能を考慮して 2.4-6.4 Å の波長範囲を選択した。使用検出器台数は 30 台であった。24 個の結晶方位についてそれぞれ 6.5~8 時間の露光を行い TOF ラウエ回折データの収集を行った。測定で得られたイベントデータをヒストグラムデータに変換した。得られたヒストグラム像の一つを図1に示す。検出器感度及び入射中性子の波長依存性はϕ 4.8 mm のバナジウム球の非干渉性散乱データを用いて補正した。ヒストグラムデータから回折斑点情報を抽出し、結晶格子の組み立て、結晶方位の精密化、回折強度の積分、等価反射強度の平均化を行った。測定後、高エネルギー加速器機構の PF BL5A にて同一結晶による X 線回折データを収集した。この2つのデータを同時に用いた XN 結合構造解析を行った。解析途中ではあるが、R_{free} が 25%程度となり、比較的良い精度で構造解析結果が得られた。現在得られているヒトα-トロンビン・アセチルヒルジン断片複合体単結晶の活性部位の構造と中性子散乱超密度図を図2に示す。酵素反応で重要な役割を果たす Ser195 の側鎖が乱れた構造をとっていることが、X 線および中性子構造解析により確認することができた。Ser195 の片方の乱れた水酸基と His57 の側鎖との間に明確な重水素による散乱超密度が得られ、水素結合していることが観測された。 </p>

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

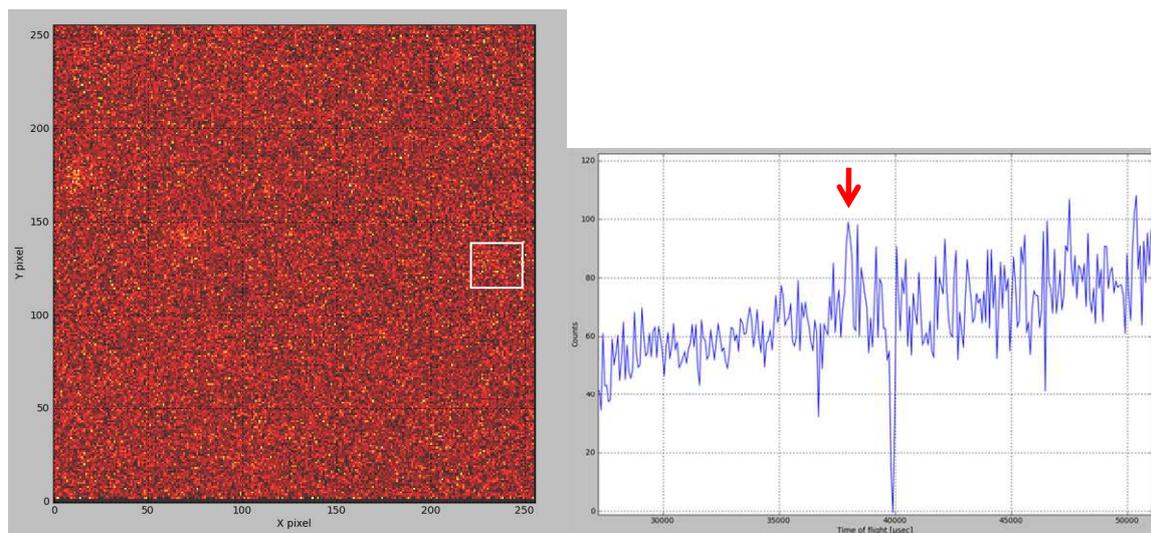


図1 検出器#4 (2θ 95.6°) で得られた TOF ラウエ回折像。
右図は白い四角で囲まれた面間隔 $d=2.4$ Å の回折点の TOF プロファイルを示した。

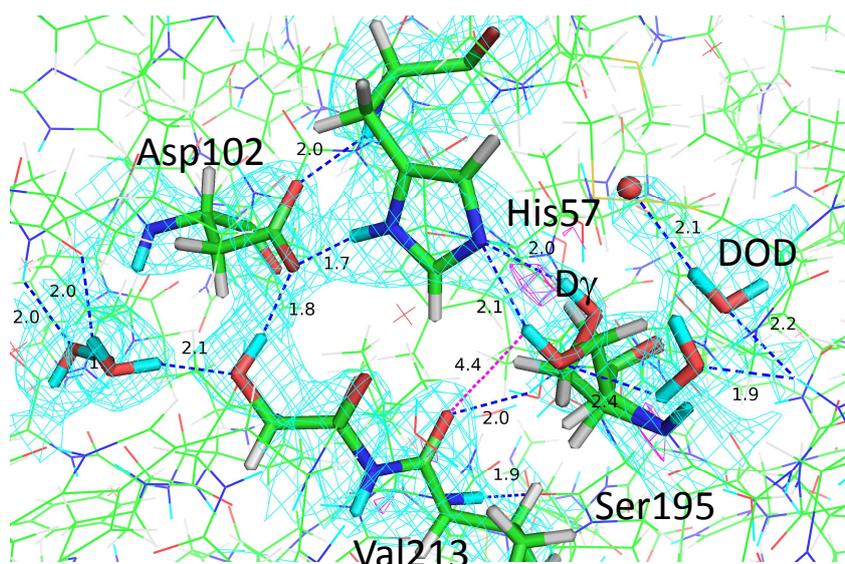


図2 ヒト α -トロンビン・アセチルヒルジン断片複合体の活性部位の構造と中性子散乱超密度図
シアン: $2mFo - Dfc$ (1.5σ) マゼンダ: Ser195 Dy原子の Omit マップ (3σ)

以前に報告した *Achromobacter* Protease I の基質や阻害剤フリーな構造では Ser195 のほとんどが His57 の方向を向いておらず、明確な水素結合による散乱超密度が観測されなかった。今回得られた構造とは一見対照的である。一般にセリンプロテアーゼについては His57 により Ser195 の水酸基水素が引き抜かれて反応が進行する反応機構が提唱されており、この2つのアミノ酸残基の間には水素結合が存在すると考えられてきた。しかしながら基質阻害剤を活性部位に結合しない α -トロンビンにおいても Ser195 の水酸基のコンフォメーションが水素結合により一つに固定されず、ある自由度を持つことが今回の中性子構造解析結果により示唆された。