

 <b>茨城県</b> <small>IBARAKI Prefectural Government</small>	<b>MLF Experimental Report</b>	提出日(Date of Report)
課題番号(Project No.) 2017PX0022 実験課題名(Title of experiment) ビリン還元酵素 PcyA の反応を水素原子レベルで見る 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: BL-03 実施日(Date of Experiment) 2017.12.03

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.

<b>1. 実験目的(Objectives of experiment)</b>
<p>PcyA はヘム分解産物であるビリベルジン IX <math>\alpha</math> (BV) をフェレドキシン依存的に還元し、光合成や光応答で重要な役割を担うビリ色素フィコシアノビリンを合成する。BV へのプロトンドナーである重要なアミノ酸 Asp105 の近傍に位置する Ile86 をアスパラギン酸に置換した PcyA 変異体 I86D と BV の複合体 (I86D-BV) の吸収スペクトルは、野生型 PcyA と BV の複合体 (WT-BV) と比較して 730 nm 付近の吸光度が大きく増大する。その吸収極大は、一段階目の反応で PcyA によって BV にプロトンが付加された BVH<sup>+</sup>由来であると推測されている。そこで I86D-BV 複合体結晶の中性子結晶構造解析から得る水素原子の位置情報によって、BVH<sup>+</sup>の構造と分子内アミノ酸のプロトン化状態を可視化し、PcyA の反応機構解明を目指す。</p>
<b>2. 試料及び実験方法</b>
Sample(s), chemical compositions and experimental procedure
<b>2.1 試料 (sample(s))</b>
フェレドキシン依存性ビリ還元酵素 PcyA の I86D 変異体と基質ビリベルジン(BV)の複合体 I86D-BV 複合体
<b>2.2 実験方法(Experimental procedure)</b>
<p>蒸気拡散法やボタン透析法などの様々な結晶化方法を試みた。また、緩衝液や沈殿剤の濃度や種類、pH などの結晶化条件を検討していった。さらに、室温 X 線回折実験を行い、Wilson plot で算出される温度因子から各結晶化条件で得られた結晶の評価を行った。また、結晶化相図を実験的に描き、溶解度曲線から大型結晶を得られる条件を探索した。得られた最適条件のスケールアップを行った。得られた結晶は重水素置換し、キャピラリーに封入して、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.

最長軸が約 2.0 mm の I86D-BV 複合体の結晶の作製に成功した（図 1）。この結晶を重水素置換し、J-PARC 内の茨城県生命物質構造解析装置（iBIX）で中性子回折実験（テスト測定）を行ったところ、最高分解能 1.86 Å を観測した。その後、ドイツ・ミュンヘンにある BIODIFF（FRM II）で中性子回折強度データ収集を行ったところ、1.8 Å 分解能に相当する中性子回折強度データが得られた。同一結晶を用いて放射光施設 Photon Factory の BL17A で X 線回折強度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。その結果、BV がプロトン化した BVH<sup>+</sup>の状態を観測することができた（図 2）。この結果は分光學と計算科学の結果[1]と一致した。また、Asp105 と変異導入した Asp86 はどちらもプロトン化しており水素結合を形成していた。X 線結晶構造解析で同定できなかった活性部位の水素結合ネットワークを同定することができた。

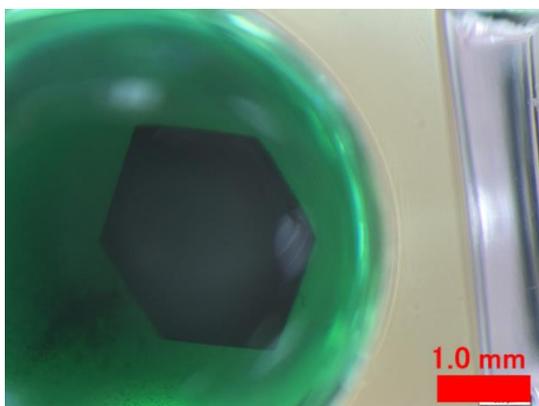


図 1. I86D-BV の結晶

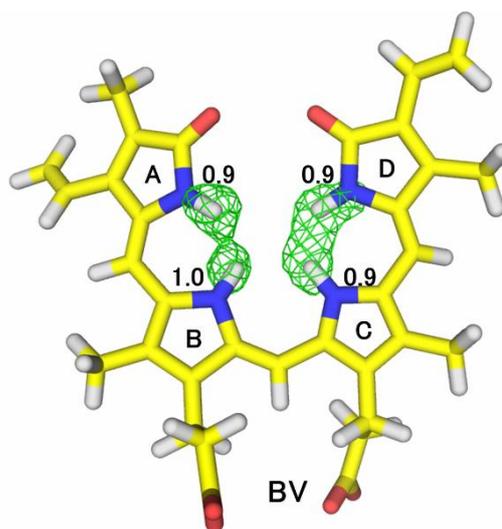


図 2. I86D-BV の BV のプロトン化状態。

Fo - Fc 中性子散乱長密度（水素原子を除いて計算したもの。数値は occupancy を表す。）

### 4. 結論(Conclusions)

J-PARC, MLF の iBIX でテスト測定を行い、結晶が中性子結晶構造解析に適していると確認できた。同様の結晶から、ドイツ・ミュンヘンの FRM II の BIODIFF で中性子回折データ収集を行うことが出来、水素原子レベル構造を決定できた。BVH<sup>+</sup>と BV が混在していた WT-BV 複合体と違い、I86D-BV の中では、I86D-BV 複合体では BVH<sup>+</sup>のみが存在し完全プロトン化していた。色素の色が、プロトン化状態と相関することを解明する第一歩となった。