

 茨城県 <small>IBARAKI Prefectural Government</small>	MLF Experimental Report	提出日(Date of Report)
課題番号(Project No.) 2020PX2002 実験課題名(Title of experiment) [NiFe]ヒドロゲナーゼの構造・機能解明 実験責任者名(Name of principal investigator) 樋口芳樹 所属(Affiliation) 兵庫県立大学		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) 2020/4/6~17

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>水素の合成と分解の両反応を通常の金属触媒を凌駕する高い効率で触媒するヒドロゲナーゼの機能をより詳細に知るためには、水素原子の可視化が必要不可欠である。そこで、[NiFe]ヒドロゲナーゼの不活性状態および活性状態の中性子結晶構造解析を実施している。これまでに、不活性状態（酸化型）については、2.0 Å 分解能の回折データを収集し、2つの酸化型構造の混合比も加味した構造解析を完了し、現在投稿準備中である。活性状態（水素還元型）についても2.0 Å 分解能の回折データを収集し現在精密化を実施中である。本課題では、水素分解反応において発生するプロトンの輸送経路を、水素還元型との比較を通じてコントラスト的に浮かび上がらせることを目的として、活性状態（重水素還元型）の中性子回折データの収集を実施した。</p>
2. 試料及び実験方法 Sample(s), chemical compositions and experimental procedure
<p>2.1 試料 (sample(s)) [NiFe]ヒドロゲナーゼ（重水素還元型）結晶 : 好気精製試料を嫌気環境で結晶化し、還元試薬存在下で重水素ガスを反応させた結晶を計 10 個用意した。</p> <p>2.2 実験方法(Experimental procedure)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ビーム出力 : 525kW ・ 測定温度 : 100K ・ 測定法 : 静止写真法 ・ phase delay : -30.5 °

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.

2019PX2003 課題で用意した 10 個の結晶の回折能をチェックした（2019 年 12 月 16 日実施）。その結果、最も回折能がよかった結晶（体積 1.88mm³、図 1）を 2020PX2002 課題でのフルデータ収集に供した。1 セットあたりの照射時間は 6.5~7 時間で、計 32 セットの回折データを収集した。1.6Å 分解能近傍の回折点を確認できており（図 1）、1.9Å 分解能でのデータ処理を完了した。データ処理は STARGazer に実装された複数の積分方法を試したが、Profile fitting (rectangle) で積分した結果が統計値のバランスが最も良かった。積分後のデータは CCP4 の SCALA でいくつかの波長範囲でスケールリングを行った（表 1）。波長範囲を狭くすることで R 値は改善するが、その分データの完全性は低下し、最外殻の I/σ 値も小さくなっている。同一結晶から X 線回折データ（分解能 0.98 ~1.2Å で処理）も取得済みで、構造精密化も実施中である。

一方で、上述のようにこの結晶は 1.6Å 分解能近傍の回折点を確認できており、より高い分解能の回折データとすることができるはずである。STARGazer での積分の際に、高角側に分類した検出器群でエラーにより結果から除かれてしまう検出器・Run が複数存在していた（図 2）。現在、この解決を目指したデータの再処理も実施中である。

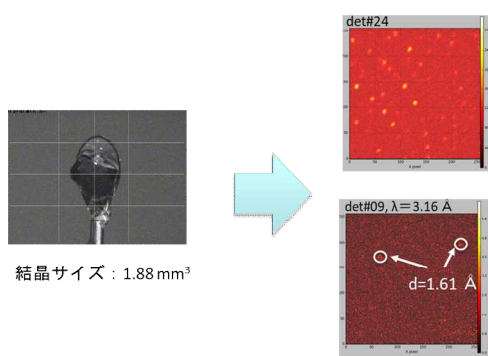


図1. ヒドロゲナーゼ（活性状態：重水素還元型）結晶と回折点
中角の検出器で良好なラウエパターン、高角の検出器で1.6Å分解能
近傍の回折点を確認

表1. ヒドロゲナーゼ（活性状態：重水素還元型）中性子回折データ統計値

Wavelength (Å)	2.15 – 4.89	2.4 – 4.89	2.8 – 4.89	3.2 – 4.89	3.6 – 4.89
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁				
Unit cell a, b, c (Å)	98.54, 126.67, 86.81				
Resolution (Å)	16.7-1.90 (2.00-1.90)	16.7-1.90 (2.00-1.90)	16.7-1.90 (2.00-1.90)	16.7-1.90 (2.00-1.90)	16.7-1.90 (2.00-1.90)
Observed	540109	484020	395231	300177	199887
Unique	66123	66073	65880	65067	59421
Completeness	99.4 (99.9)	99.3 (99.7)	99.1 (99.5)	98.0 (96.2)	89.7 (61.6)
I/σ(I)	7.2 (2.3)	7.5 (2.1)	7.1 (2.0)	6.3 (1.5)	5.7 (1.2)
R _{merge} (%)	39.3 (91.8)	36.2 (85.2)	33.9 (82.4)	33.0 (81.6)	24.3 (51.7)
R _{sym} (%)	14.5 (35.4)	14.3 (36.5)	15.2 (39.7)	17.5 (50.5)	14.6 (42.5)

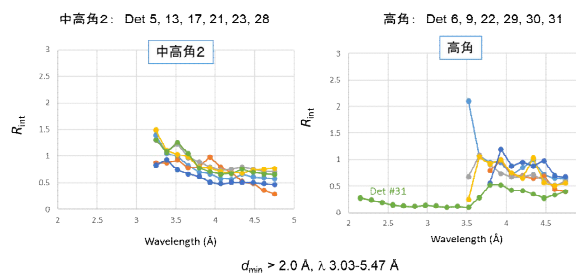


図2. 高角側検出器における波長範囲毎のR値
短波長側の反射が欠落している

4. 結論(Conclusions)

[NiFe]ヒドロゲナーゼ（重水素還元型）結晶から 1.9Å 分解能でのフルデータを収集することに成功した。一方で、結晶が示す回折能から、より高い回折データにすることが可能と考えられるため、データの再処理にも取り組んでいる。最終的な構造精密化は再処理後のデータを用いて実施する予定である。