

 MLF Experimental Report	提出日(Date of Report)
課題番号(Project No.) 2021PX2006 実験課題名(Title of experiment) 銅含有亜硝酸還元酵素の高分解能中性子線結晶構造解析 実験責任者名(Name of principal investigator) 福田庸太 所属(Affiliation) 大阪大学	装置責任者(Name of responsible person) 日下勝弘 教授 装置名(Name of Instrument : BL No.) iBIX/BL03 実施日(Date of Experiment) 2021 5/13~5/24

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>ハーバー・ボッシュ法の登場以来、土壌や水中への窒素の過剰流入が自然の窒素循環を崩してきた。水中や土壌中の窒素は微生物が行う脱窒という働きによって大気中へと戻されるため、脱窒に関わる微生物酵素の機構解明は大気環境や農業環境の改善へ繋がると期待されている。銅含有亜硝酸還元酵素(CuNIR)は脱窒過程の鍵酵素であり、亜硝酸イオンを一酸化窒素と水に変換する。この反応にはプロトン共役型電子移動(PCET)が関わっており、その理解のためには、水分子やアミノ酸上の水素・プロトンの位置を知らねばならないが、活性中心周りのそれらの可視化は、X線結晶構造解析では原子分解能においても困難である。そこで本実験では、中性子結晶構造解析を用いて全原子構造情報を取得し、CuNIRの反応機構の完全解明を目指した。</p>
2. 試料及び実験方法
Sample(s), chemical compositions and experimental procedure
2.1 試料 (sample(s))
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> 由来 CuNIR の変異体 C135A のギ酸結合型結晶
2.2 実験方法(Experimental procedure)
上記結晶をキャピラリーに封入し、iBIX において常温でのテスト測定をおこなった。フルデータ測定も常温で行い、得られた中性子回折強度データの処理を行った。

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.

2021A 期にフルデータ測定可能な大型結晶を用いて、5 月 14 日からデータ収集をおこない、その後同一結晶から収集した X 線回折データと同時精密化することにより分解能 1.9 Å での構造決定に成功した。現在、まだ解析を継続中であるが、活性中心周りの水素原子およびプロトンの位置をすべて決定でき、活性残基 Asp98 と His244 がそれぞれ休止状態や亜硝酸結合状態と同様に脱プロトン化状態とプロトン化状態にあることが判明している。さらに、活性中心の銅イオン(T2Cu)にはギ酸と思われる分子が結合しているのが観察されたほか、中性子散乱長密度マップから休止状態や亜硝酸結合状態では水酸化物イオンが配位している T2Cu 部位に水分子が複数のコンフォメーションを取りながら配位しているらしいことが示唆された。重金属原子近傍における水素ひとつレベルでの知見は CuNIR の反応機構に関する新規かつ重要なものであり、中性子構造解析からしか得られないものである。

4. 結論(Conclusions)

これまで X 線結晶構造解析では得られなかった CuNIR の反応機構に関する新規かつ重要な知見を中性子構造解析から得られることができた。本成果については、2019 年度に取得している亜硝酸結合型のデータや他の X 線結晶構造解析結果と合わせて 1 年以内に論文を投稿する予定である。