

 MLF Experimental Report	提出日(Date of Report) 2021年11月5日
課題番号(Project No.) 2021PX3003 実験課題名(Title of experiment) 酸化還元反応に関与する金属酵素の中性子結晶構造解析 実験責任者名(Name of principal investigator) 庄村康人 所属(Affiliation) 茨城大学	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) 2021/6/17-2021/6/18 (テスト測定) 2021/6/19-2021/6/29 (本測定)

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>過酸化水素不均化酵素（カタラーゼ）には活性部位にヘムをもつタイプと二核マンガンをもつタイプがあるが、後者の Mn-カタラーゼの方がより高い熱安定性・阻害剤耐性をもつことが知られている。一方、これまでに報告されてきた Mn-カタラーゼの X 線結晶構造解析においては X 線還元の問題がほとんど考慮されておらず、活性サイクル中の酸化状態も含めて反応機構の詳細には不明な点が多い。X 線と比較すると中性子は照射による損傷の影響がほぼ無視できるため、本研究ではあらかじめ酸化状態を制御した結晶による中性子結晶構造解析を目的とした。今期の測定においては、ヒドロキシアミンのよって還元型に変換した Mn-カタラーゼの結晶を対象とした。</p>
2. 試料及び実験方法
Sample(s), chemical compositions and experimental procedure
2.1 試料 (sample(s))
Mn-カタラーゼ（還元型）結晶
2.2 実験方法(Experimental procedure)
<p>事前に重水素化試薬からなるクライオプロテクタントに浸漬した結晶について還元処理を行い、液体窒素気流中で凍結処理した結晶を液体窒素デューワーでビームラインに持ち込み、回折データ測定を行った。測定は約 10 日かけて 14 方位について行い、回折データ処理プログラム STARGazer を用いて構造因子ファイルに変換した。</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.

体積約 1.8 mm³ の還元型 Mn-カタラーゼ結晶を 100 K 液体窒素気流中にマウントし（図 1）、出力 740 kW（途中で 630 kW に変更）で、回折データ測定を行った。回折点は分解能 2.2 Å 付近まで目視で確認することができた（図 2）。分解能 2.0 Å までの回折データを用いて処理を行った結果、最外殻の Completeness が 88.8% で I/sigma が 1.5 となりともに許容可能な値であったが、 R_{merge} は 1.824 とかなり悪い値であった（表 1）。有効な分解能はまだ定かではないが、今後は X 線回折データと合わせて構造解析を進め、水素の位置情報を含めた構造の理解を目指す。

表 1. 中性子回折データ処理統計値

dmax (Å)	dmin (Å)	NPeaks (unmerged)	NPeaks (merged)	Comp[%]	Rint	Rpim	Redundancy	I/sig_Normal
Overall								
22.87	2.00	474614	48542	95.0	0.854	0.285	9.8	3.1
Shell								
22.87	4.30	46329	5216	98.1	0.319	0.109	8.9	19.9
4.3	3.42	57863	5150	99.9	0.381	0.117	11.2	11.6
3.42	2.99	67615	5118	99.9	0.566	0.158	13.2	6.6
2.99	2.71	59016	5095	99.7	0.784	0.235	11.6	3.4
2.71	2.52	50788	4943	97.5	0.976	0.309	10.3	2.5
2.52	2.37	47793	4839	94.5	1.240	0.403	9.9	2.0
2.37	2.25	42301	4634	92.1	1.488	0.502	9.1	1.6
2.25	2.15	38244	4605	90.4	1.683	0.596	8.3	1.4
2.15	2.07	33327	4493	88.5	1.934	0.726	7.4	1.3
2.07	2.00	31338	4449	88.8	1.824	0.700	7.0	1.5

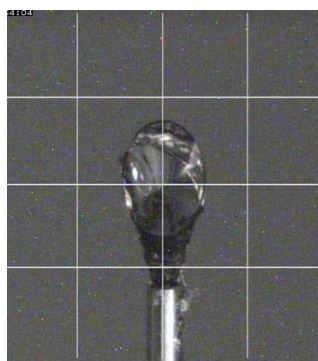


図 1. 還元型 Mn-カタラーゼ結晶

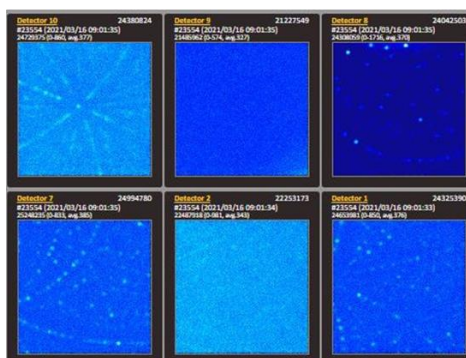


図 2. 中性子回折像の例

4. 結論(Conclusions)

還元型 Mn-カタラーゼ結晶の中性子回折データを測定した。データ処理後の統計値から、分解能 2.0-2.2Å 程度までを構造解析に用いることができると考えられる。これは構造が揺らいでいなければ水素・重水素として同定可能な分解能であるため、今後の構造解析により活性部位周りの化学種の同定が進み、反応機構の解明に向けて重要な知見が得られることが期待される。