

細菌由来ノイラミニダーゼの中性子結晶構造解析

茨城大学 山田太郎

1. 緒言

ノイラミニダーゼは糖鎖中の *N*-アセチルノイラミン酸のグリコシル結合を加水分解する酵素である。過去の X 線結晶構造解析や部位特異的変異導入実験で活性部位に存在するチロシン残基が最も重要なアミノ酸残基であることが示されている。グルタミン残基がチロシン残基の水酸基のプロトンを引き抜いて生じるフェノキシドイオンが *N*-アセチルノイラミン酸のグリコシド結合が切断される時に生じるカルボカチオン中間体を安定化し、加水分解反応を容易化すると考えられている。一方で近年、ノイラミニダーゼと類似の立体構造を有するトランスシアリダーゼの X 線結晶構造解析でチロシン残基側鎖のフェノール酸素がフッ素化されたノイラミン酸基の 2 位の炭素に求核攻撃して共有結合を形成した中間体様式を持つ構造が見出された。この結果はノイラミニダーゼの反応においてもカルボカチオン中間体を経由するのではなく、同様の共有結合中間体を経由する可能性もでてきた。そこでカルボカチオン中間体と類似した DANA 阻害剤とネズミチフス菌由来ノイラミニダーゼ複合体の中性子結晶構造解析を行うことにより活性部位に存在するアミノ酸残基のプロトン化状態を決定することで、この酵素反応の機構に関して知見が得られるのではないかと考え iBIX を用いて中性子回折実験を行った。また DANA はインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼの阻害剤で主なインフルエンザ治療薬の基本骨格を有している。今回実験に用いたネズミチフス菌ノイラミニダーゼとインフルエンザウイルス由来のノイラミニダーゼは活性部位の重要アミノ酸残基の配置が一致している。DANA 阻害剤の結合に関与する水素原子を観測することも本実験の目的のひとつである。

2. 実験

体積 1.2 mm^3 のネズミチフス菌由来ノイラミニダーゼ結晶を人工母液と共に $\phi 3.5 \text{ mm}$ のガラスキャピラリーに封入した。室温で iBIX の 3 軸ゴニオメータにマウントした。実験時の MLF の運転出力は 728 kW であった。2.0–6.0 Å の中性子波長を選択するため、ディスクチョッパーの位相を -30.5° にセットした。回折データは 34 台の iBIX 中性子検出器ユニットを用いて中性子イベントデータ形式で収集した。静止した結晶に対し約 5 時間 (476,000 TO カウント) の中性子ビームを照射した。ゴニオメータで 44 の異なる結晶方位を選択し、独立な逆格子空間をカバーするようにデータ収集を行なった。測定後、自家製プログラムを用いて 1550 個程度の中性子イベントデータをヒストグラムデータに変換し、そこから回折ピークの抽出、指数付け、さらにプロファイルフィッティング法による回折強度の算出を行った。さらに等価反射強度の平均化を行なった。

3. 結果

使用した結晶が良かったため中性子回折像を得ることができた。図 1 に 5 時間の中性子ビーム露光後に得られた 34 台分の検出器の回折像を示す。この回折像をライブモニター上で目視で確認したところ、 $d_{min} = 2.1\text{--}2.2 \text{ \AA}$ 程度の明らかな回折斑点が確認された。すべてのデータ取得後にデータ処理を行ったところ、等価反射の一致度 R_{merge} は 0.322、データ測定の平均繰り返し回数で 10.4 であり、それを考慮した等価反射の一致度 R_{pim} は 0.103 となった。回折データの完全性は 0.99 であった。データ処理で得られた CC1/2 などの統計値より回折データの分解能 d_{min} は 1.5 \AA であった。(最外殻の $CC1/2 = 0.346$)

4. 結論

iBIX を用いて飛行時間法中性子回折実験を細菌由来ノイラミダーゼ DANA 複合体について行い、99% の反射収率で 1.5 Å 分解能の回折データを得ることに成功した。現在、X 線・中性子結合構造精密化を実施しているところである。解析の途中段階であり詳細はここでは述べないが構造精密化の初期段階で多数の重水素、軽水素に由来する中性子散乱長密度が明瞭に観測されており、DANA 分子に関する水素もすべて同定できた (図 2)。今後、さらに重水素と軽水素を付加しながら構造精密化を継続する予定である。

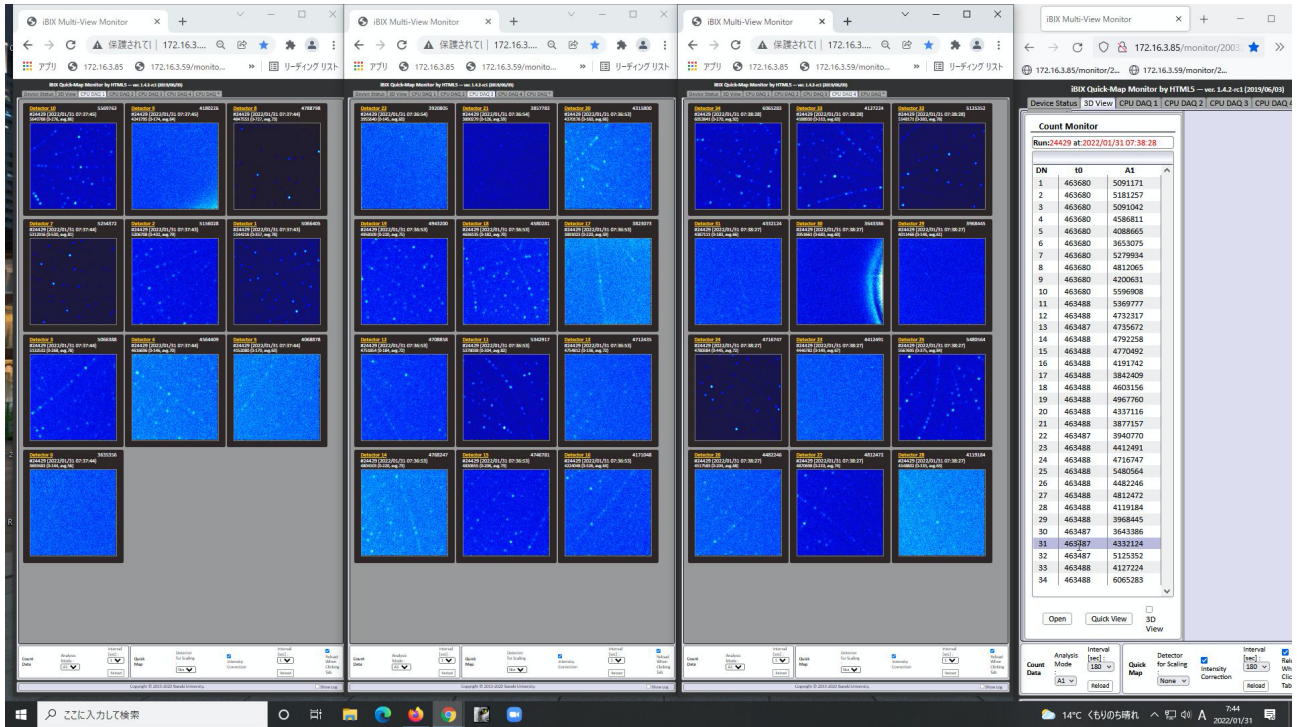


図 1 5 時間後の中性子露光により得られた 34 台分の中性子回折像

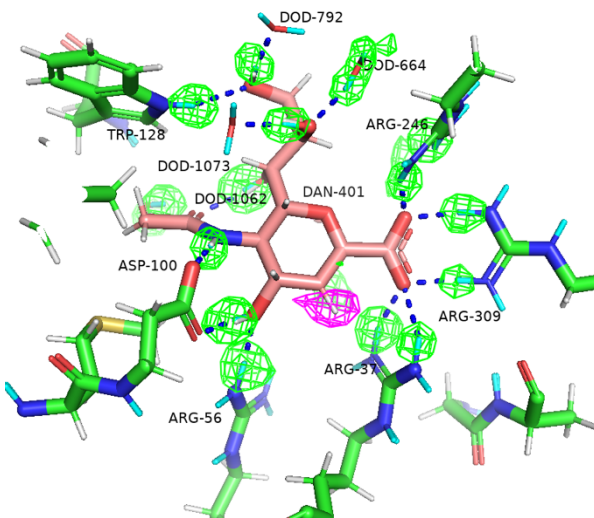


図 2 XN 構造精密化により得られた DANA 分子周囲の水素に関する中性子散乱長差密度図。DANA 分子はオレンジ色、ノイラミダーゼ分子は緑色で示した。+3 σ 、-3 σ レベルの差密度を緑とマジエンタのメッシュで示した。DANA 分子とその結合に関与するすべての水素が明瞭に観測された。