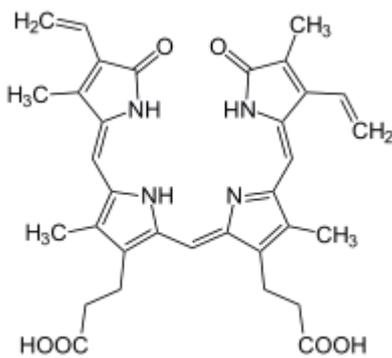


 MLF Experimental Report	提出日 Date of Report
課題番号 Project No. 2012PX0011 実験課題名 Title of experiment フェレドキシン依存性ピリン還元酵素 PcyA の中性子結晶構造解析 実験責任者名 Name of principal investigator 海野昌喜 所属 Affiliation 茨城大学	装置責任者 Name of responsible person 日下勝弘 装置名 Name of Instrument/(BL No.) BL03 実施日 Date of Experiment 2013年4月2日

試料、実験方法、利用の結果得られた主なデータ、考察、結論等を、記述して下さい。(適宜、図表添付のこと)
 Please report your samples, experimental method and results, discussion and conclusions. Please add figures and tables for better explanation.

<p>1. 試料 Name of sample(s) and chemical formula, or compositions including physical form.</p> <p>ピリン還元酵素 PcyA とその基質ビリベルジン(BV)との複合体の結晶(以下、PcyA-BV と訳す。)</p> <p>PcyA の一次配列は (http://www.uniprot.org/uniprot/Q55891) に記されている。</p> <p>BV の化学構造は、$C_{33}H_{34}N_4O_6$ (右図)。</p>	
---	--

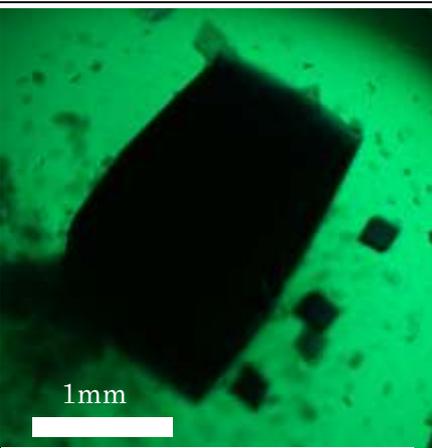
<p>2. 実験方法及び結果 (実験がうまくいかなかった場合、その理由を記述してください。)</p> <p>Experimental method and results. If you failed to conduct experiment as planned, please describe reasons.</p> <p>BV が色素で、PcyA と複合体を作った状態でも光に晒されると、安定でないために、暗所で試料を取扱い、結晶化を行った。PcyA をできるだけ濃縮し(～70mg/mL)、BV も溶解できる限界まで濃度を上げ、共結晶化を行った。ドロップサイズは 20 μL (PcyA-BV)+ 20 μL (リザーバー溶液)である。リザーバー溶液の条件は、1.4 mM 硫酸アンモニウム、200mM NaCl, 50 mM MES (pH 5.9)。結晶サイズは、2.2 mm X 1.8 mm X 0.8 mm 程度(右写真、図 1)。MES 以外は重水素試薬を使い、重水素置換溶液に 18 日間ソーキング(そのうち 2 回浸漬溶液を変えた。)を行った。これらの操作も全て暗所で行った。重水素置換を行った結晶を内径 3.5 mm の石英キャピラリーに詰め、できるだけ結晶周囲の溶液を取り除いた後、乾燥を防ぐため重水素リザーバー溶液を結晶から 10 mm ほど離れたところに足して、蜜蝋で予備的に封入し、蝋で完全に</p>	
--	---

図 1. 中性子回折実験に用いた PcyA-BV 複合体結晶

2. 実験方法及び結果(つづき) Experimental method and results (continued)

封入した。このキャピラリーは、50 mL 遠沈管に粘土で固定し、その遠沈管をアルミホイルで覆い、遮光した状態で、結晶化時と同じ 20°C のインキュベーターで保管しておいた。

iBIX での実験は、常温で行われた。加速器の出力は 300 kW、波長は 3.0 Å ~ 5.6 Å を用い、一回照射に 9 時間、24 ショットの回折データを収集した。連続測定は 9 日間で行われた。回折強度データの統計値としては、1.95 Å 分解能相当で completeness 93.5 %, R_{merge} 16.4 %, Redundancy 3.7, $1/\sigma$ 5.9 程度であった。そのうち、信頼度の高い 1σ 以上の反射を精密化に用いた。

その後、J-PARC の事故もあり、結晶を持ち出す機会を逸してしまったため、別の結晶で X 線回折データを収集しジョイントリファインメントを行った。その結果、X 線の照射で構造が変化しているらしいところがあることに気付いた。今まで X 線の回折データ収集は低温 (~100 K) で行っていたが、酸化還元酵素の場合は、X 線の照射による水和電子の発生が、思わぬ反応を起こすので、特に常温の場合は考慮しなければならない。その後、結晶を MLF から持ち出せる機会を得たので、PF において、常温で回折実験を行い、1.55 Å の回折強度データを得た。ジョイントリファインメントにより、中性子構造を 1.95 Å 分解能で得た。X 線構造の方はやはり変化しているように見えた。そこは、「構造変化した」と解釈し、中性子構造について議論することにする。

興味深いことに、二重のコンフォメーションをとっている Asp105 は水素化の状態の違いがみられた。BV は結合したときにすぐに水素化され BVH⁺ になっているものが優先的に存在していることが示唆された(図 2)。BV のラクタム構造は、他の研究者の主張していたラクチムにはなっていないということが分かった。周辺のアミノ酸残基のプロトン化状態、特に His88 や水分子の水素結合ネットワークのプロトンドナー・アクセプターの関係

もわかってきた。この構造解析から、反応機構の理解も非常に深まったと考えられるが、今後は、反応中間体である 18EtBV と PcyA の複合体の中性子結晶構造解析を目指す。

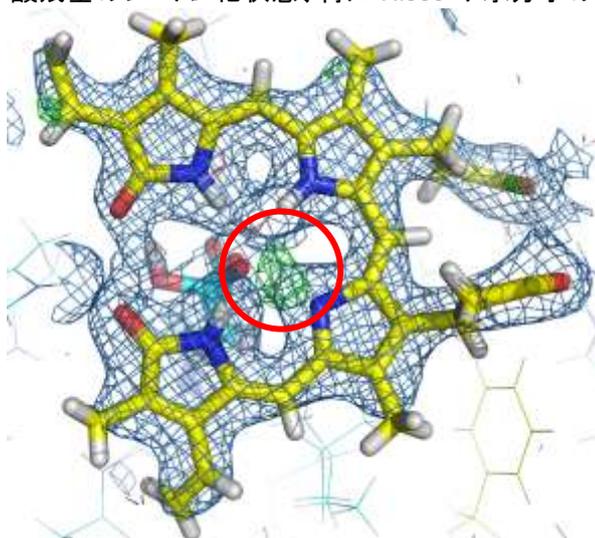


図 2. BV 周辺の中性子散乱密度図。

○で囲んだところに Fo-Fc 差フーリエ図がはっきりと見られる。これは BV に H⁺(D⁺) が結合していることを示している。

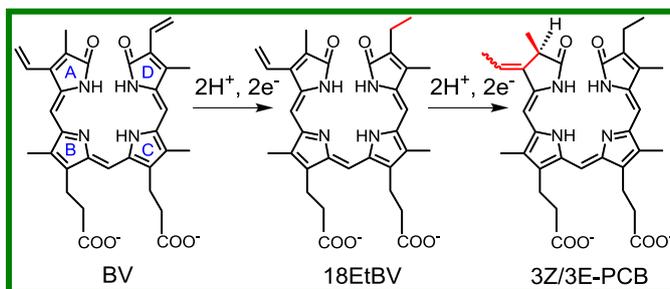


図 3. PcyA の触媒する反応

PcyA-18EtBV はすでに X 線結晶構造解析には成功している。今後は、PcyA-18EtBV 結晶の大型化・良質化を目指していく。この構造が分かれば、水素原子がどこからどこに移動したかが明確になり、さらに反応機構の理解が進むと考えられる。