

 <b>MLF Experimental Report</b>	提出日(Date of Report) 2018. 1/19
課題番号(Project No.) 2017PX0006 実験課題名(Title of experiment) 銅アミン酸化酵素ラジカル反応中間体の中性子結晶構造解析 実験責任者名(Name of principal investigator) 岡島 俊英 所属(Affiliation) 大阪大学産業科学研究所	装置責任者(Name of responsible person) 日下 勝弘 装置名(Name of Instrument : BL No.) iBIX (BL-03) 実施日(Date of Experiment) 2017 4/10 -4/ 11 2017 5/16 - 5/17 2017 11/14 -12/3

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)

銅含有アミン酸化酵素は、酸化還元補酵素トパキノン (TPQ) および二価銅イオンを活性中心に含み、一級アミン類の酸化的脱アミノ反応を触媒する。補酵素 TPQ は、前駆体となる特定の Tyr 残基から、銅イオンと溶存酸素存在下において自発的な酸化反応によって生成される。我々はこれまでに土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* に由来する銅含有アミン酸化酵素 (AGAO) を用いて、その触媒反応と補酵素生成反応の機構を、反応中間体の結晶構造解析をもとに解明してきた。変異導入および速度論解析の知見も合わせ、各ステップの反応機構を理解することに成功している。さらに詳細な構造情報を得るため、中性子結晶構造解析にも着手し、これまでに、反応開始状態である酸化型酵素において、1.72 Å 分解能で中性子 X 線共結晶構造解析に成功している (投稿準備中)。その知見に基づき、本研究では、触媒反応において形成されるセミキノラジカル中間体の中性子結晶構造解析を行う。加えて、TPQ 合成の機構を解明するため、初発状態であるアポ型酵素 (銅イオンを結合しておらず、TPQ 前駆体 Tyr を含有) についても、プロトン化状態の詳細な情報を得る。

### 2. 試料及び実験方法

Sample(s), chemical compositions and experimental procedure

#### 2.1 試料 (sample(s))

銅含有アミン酸化酵素 C3148 H4835 N879 O956 S11 Cu

#### 2.2 実験方法(Experimental procedure)

大型 AGAO 結晶は、常法通りに調製した。セミキノラジカル中間体結晶の場合には、重水素化と pH 変更のために透析ボタンゴと 25 mM TAPS, 1.05 M 重水素化酒石酸 NaK, pD 9.0-D<sub>2</sub>O 緩衝液に 2 週間以上透析した。次に、セミキノラジカル反応中間体を蓄積させるため、嫌気ボックス内において嫌気化された 25 mM TAPS, 1.05 M 重水素化酒石酸 NaK, 4mM 基質フェニルエチルアミン (2-PEA), pD 9.0-D<sub>2</sub>O 緩衝液に対して 24 時間程度透析した。さらに、クライオトラップのために、嫌気下において抗凍結剤として 3.5 M 重水素化マロン酸を含む 4 mM 2-PEA, pD 9.0-D<sub>2</sub>O 緩衝液に対して 12 時間程度透析した。結晶の色の変化 (赤褐色→淡黄緑色) が結晶の中心部まで起きたときに、セミキノラジカル形成が完了したと判断した。最終的に得られた結晶を、嫌気下、大型クライオループですくい、クライオ気流下で凍結保存した。アポ型結晶に関しては、3.5 M 重水素化マロン酸, pD 7.4-D<sub>2</sub>O 緩衝液で 2 週間以上透析することによって重水素化し、同様に凍結した。これらの結晶は液体窒素中で凍結したまま iBIX へ持ち込み、クライオ条件下において中性子回折データを収集した。

### 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.

#### 3.1 セミキノラジカル中間体結晶

凍結状態で J-PARC に輸送したセミキノラジカル中間体 AGAO 結晶は、100 K のクライオ気流下に置き、iBIX において中性子 TOF 回折実験を行った。波長領域は 2.6 から 6.6 Å に設定し、30 個の検出器を用いた。ビーム出力は 150 kW であり、数個の結晶に対して、概ね 1 個あたり約 1 時間データ収集を行なった。結晶のクオリティーは、目視で回折点の分解能およびスポット形状を観測し評価した。その結果、ベストな結晶 (ID: TPQSQ\_PD9\_2, 1.25 x 6 x 1.05 mm; 3.94 mm<sup>2</sup>; Fig. 1A) では、85 分のビーム照射によって、2.18 Å (detector #09) および 2.34 Å (detector #06) 分解能で、良好な形状をもつスポットを見出すことができた。さらに、同じ結晶に対して一晩 (870 分) ビーム照射を行なったところ、分解能は最高 1.54 Å (detector #30) および 1.71 Å (detector #09) (Fig. 1B) にまで達した。この分解能は分子量約 7 万のタンパク質としては極めて高く、重水素原子ばかりでなく置換されなかった軽水素原子も、マップ上で余裕を持って検出可能なレベルである。ただ、本結晶の空間群 (C2) で 1.5 Å 付近の最外殻では、十分な completeness を確保するには、500 kW 程度のビーム出力が必要であるため、現時点では本測定は行わず、今後の本測定に備えて得られた結晶は液体窒素中に保存した。

#### 3.2 アポ型酵素結晶

ビーム出力が 300 kW であることを除いて、前述と同様な条件において、アポ型 AGAO 結晶についても、中性子 TOF 回折実験を行った。その結果、ベストな結晶 (ID: WTAPO①171108 2.35 x 1 x 1.05 mm; 2.49 mm<sup>2</sup>; Fig. 2A) では、測定時間 7 時間で分解能 1.72 Å (detector #09 および #30) の良好な形状をもつスポットを見出すことができた。そこで、本結晶を用いて、1 セット当たり 7 時間の本測定を行なった。11/14 16:00 から 12/3 9:00 まで（正味ビームタイム約 15.5 日間）の測定期間で、46 セットのデータが収集できた (Fig. 2B)。得られたイメージデータは、現在 STARGazer を用いて処理を行なっている。測定中に検出器 2 台にトラブルがあったほか、高分解能側の反射形状が予想よりやや悪く、completeness を上げようと積分範囲を狭めると  $I/\sigma I$ , R<sub>sig</sub> の値が大幅に悪化した。このため現在、completeness をあまり下げずに  $I/\sigma I$ , R<sub>sig</sub> を上げるようなパラメーターの最適化を進めている。現時点では、分解能 1.70 Å、最外殻 (1.76–1.70 Å) での completeness 82.5 %、 $I/\sigma I$  0.65、R<sub>sig</sub> 0.8733 であった。

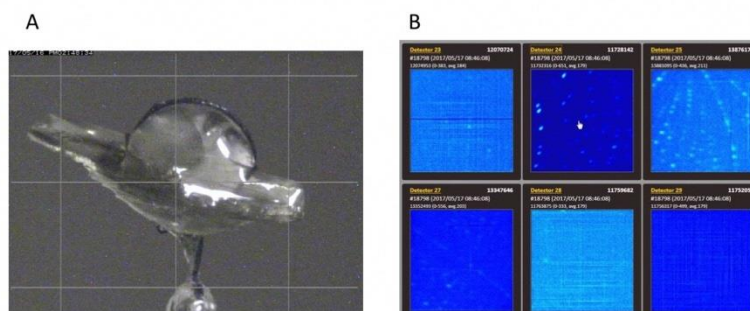


Fig. 1. 最高分解能を示したセミキノラジカル反応中間体結晶 (A) および TOF 回折イメージ (B)

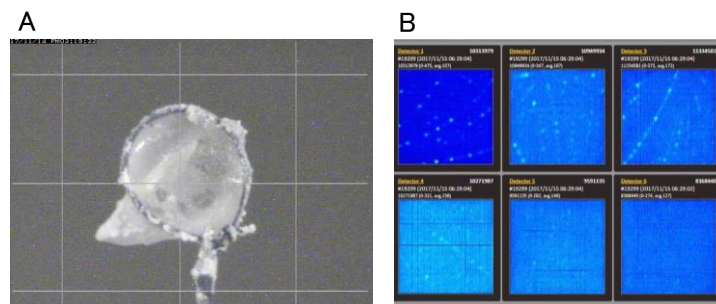


Fig. 2. 本測定に用いたアポ酵素結晶 (A) および TOF 回折イメージ (B)

### 4. 結論(Conclusions)

セミキノラジカル中間体に関しては、約 1.5 Å 分解能にまで達する極めて高分解能のデータ収集が可能なる結晶を確保することができた。今後の計画として、近々の 500kW へのビーム高出力化を待って、本測定を実施する予定である。アポ型結晶に関しては 1.7 Å 分解能付近で中性子回折イメージの処理を行なっている。すでに同一結晶で X 線回折データの収集をつくばフォトンファクトリーで実施し、イメージ処理を終了しているので (分解能 1.07 Å)、中性子回折データの処理が終われば、遅滞なく中性子・X 線の Joint Refinement を開始する予定である。