

 MLF Experimental Report	提出日(Date of Report)
課題番号(Project No.) 2019PX2009 実験課題名(Title of experiment) 銅含有亜硝酸還元酵素の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) 2019 7/2~4 2020 1/26~2/9

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 の亜硝酸結合型結晶
2.2 実験方法(Experimental procedure)
<p>上記結晶を用い、キャピラリーに封入した常温のものと、クライオノズル下で低温窒素気流によりクライオルーブ上で凍結したものについて iBIX においてテスト測定をおこなった。フルデータ測定は低温で行い、得られた中性子回折強度データの処理を行った。</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.

2019A 期のテスト測定にて、室温での測定をおこなった。解析可能と思われる分解能での回折点は確認できたが、その後同一結晶から X 線回折データを収集し構造解析を行ったところ、亜硝酸イオンの電子密度が観察されず、常温では亜硝酸が数日以内に分解することが判明した。中性子回折データ収集には 10 日以上かかるため、常温での測定を断念し、クライオストリームで凍結させた結晶について 2019B 期にあらためてテスト測定をおこなった。

低温測定において良好な回折点が観測できたため、1 月下旬から 2 月頭にかけてフルデータ測定可能な大型結晶を用いて、データ収集をおこない、同一結晶から取得した X 線回折測定データと合わせて構造精密化を行った。最終的に分解能 1.7 Å での構造決定に成功した。解析の結果、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た。さらに、活性中心の銅イオン(T2Cu)には脱プロトン化状態の亜硝酸イオンが観察された。これは基質が脱プロトン化状態で CuNIR の活性中心に配位するという初めての知見である。

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、今後さらに別の状態の中性子構造解析も行ったうえで論文を投稿する予定である。