

# 細菌由来ノイラミナーゼの中性子結晶構造解析

茨城大学 山田太郎

## 1. 緒言

ノイラミナーゼは糖鎖中の *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。インフルエンザウイルスのカプシドに存在するものが有名で、インフルエンザ治療薬のターゲットである。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ル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。多くの X 線結晶構造解析でグルタミン残基とチロシン残基の間に比較的短い水素結合が形成されることが示されている。しかしながらこれらのアミノ酸残基のプロトン化状態は決定されていない。この水素結合中のプロトンの位置を決定することで反応機構に関して何らかの知見が得られるのではないかと考えた。そこで、本研究では試料の入手が簡単な細菌由来のイラミナーゼを用いて中性子単結晶構造解析を行い、この水素結合の性質を調べることにした。

## 2. 実験

あらかじめ体積  $2.08 \text{ mm}^3$  のノイラミナーゼ結晶を  $100 \text{ K}$  の窒素気流化で凍結し、液体窒素中に保存しておいた。それを低温窒素ガス吹付装置  $100 \text{ K}$  の窒素気流化で 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  $600 \text{ kW}$  であった。 $2.0 - 6.0 \text{ \AA}$  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  $-30.5^\circ$  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 ( $459,000 \text{ TO}$  カウント) の中性子ビームを照射した。ゴニオメータで 41 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 1400 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

結晶凍結に成功し、良い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した。この回折像をライブモニターを使用して目視で確認したところ、 $d_{min} = 1.7 \text{ \AA}$  程度の明らかな回折斑点が確認された。測定後、データ処理を行ったところ、等価反射の一致度  $R_{merge}$  は  $0.282$  と高いものの、データ測定の平均繰り返し回数が  $9.3$  であり、それを考慮した等価反射の一致度  $R_{pim}$  は  $0.094$  となった。回折データの完全性は  $0.98$  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  $d_{min}$  を  $1.5 \text{ \AA}$  と見積もった。(最外殻の CC1/2 =  $0.569$ )

## 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ナーゼについて行ったところ、 $1.5 \text{ \AA}$  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開始したところである。解析の途中で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（図2）、注目している部位の水素結合様式についても決定できる可能性が高いものと考えている。今後、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。

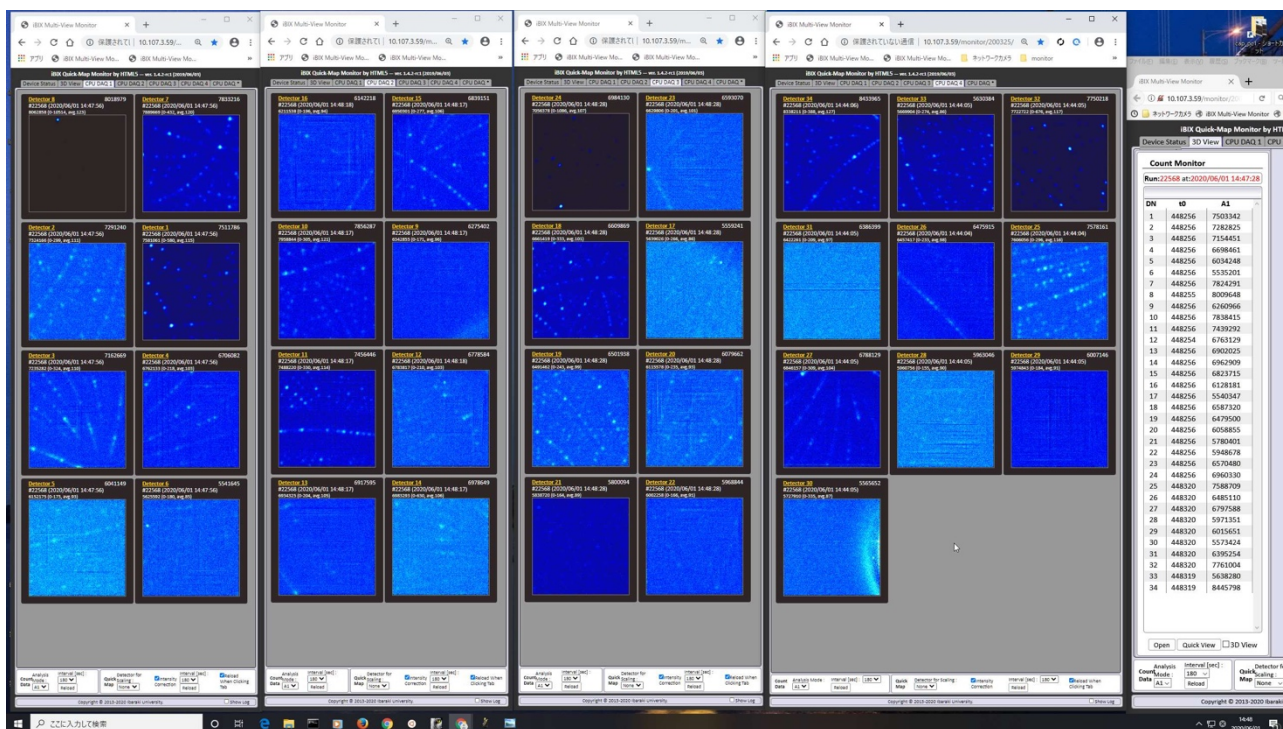


図1 5時間後の中性子露光により得られた34台分の中性子回折像

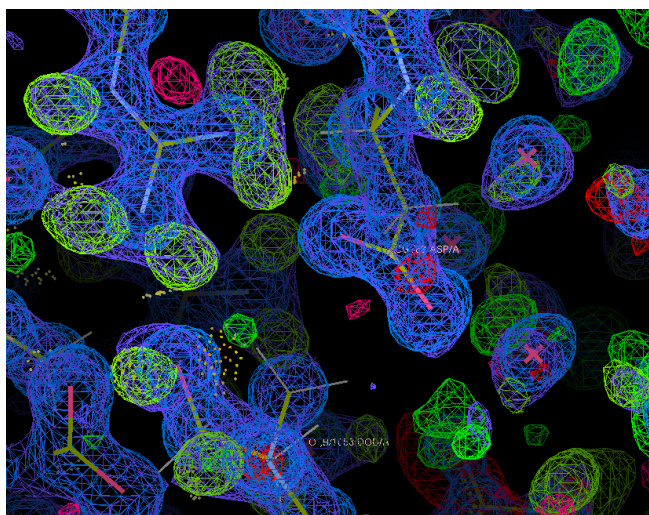


図2 構造精密化の初期段階で得られた電子および中性子散乱超密度図の一部。黄緑色で表される球状メッシュの多くが重水素原子の存在を示唆している。