

 <b>MLF Experimental Report</b>	提出日(Date of Report)
課題番号(Project No.) 2022PX3007 実験課題名(Title of experiment) 酸化還元反応に関与する金属酵素の中性子結晶構造解析 実験責任者名(Name of principal investigator) 庄村康人 所属(Affiliation) 茨城大学	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) 2022/1/24-2022/1/25 (テスト測定) 2022/5/25-2022/6/5 (本測定)

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.

<b>1. 実験目的(Objectives of experiment)</b>
<p>過酸化水素不均化酵素には活性部位にヘムをもつタイプと二核マンガンをもつタイプがあるが、後者の Mn-カタラーゼの方がより高い熱安定性・阻害剤耐性をもつことが知られている一方、これまでに報告されてきたこれらの X 線結晶構造解析においては X 線還元の問題がほとんど考慮されておらず、活性サイクル中の酸化状態も含めて反応機構の詳細には不明な点が多い。また、本酵素は光合成において水の分解を行う光合成系 II と同様にマンガクラスターをもつため、その超酸化混合原子価 (Mn(III)Mn(IV)) の構造機能相関を解明するうえで有用なモデルとなり得ることも、学術的に非常に重要な点である。今期の測定においては超酸化型 Mn-カタラーゼの結晶を測定対象とし、水素を含む立体構造情報の取得を目的とした。</p>
<b>2. 試料及び実験方法</b>
Sample(s), chemical compositions and experimental procedure
<b>2.1 試料 (sample(s))</b>
Mn-カタラーゼ (超酸化型) 結晶
<b>2.2 実験方法(Experimental procedure)</b>
<p>事前に重水素化試薬からなるクライオプロテクタントに 16 日間浸漬した結晶について超酸化処理を行い、液体窒素気流中で凍結処理した結晶を液体窒素デュワーでビームラインに持ち込み、回折データ測定を行った。測定時の出力は 836 kW で、測定は 11 日かけて 14 方位について行い、回折データ処理プログラム STARGazer を用いて構造因子ファイルに変換した。</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.

Mn-カタラーゼの結晶は最大で体積約 3.2 mm<sup>3</sup> のものが得られ（図 1），超酸化処理を施して凍結した結晶を中性子，X 線の順に回折データ測定に供した。テスト測定においては目視で約 2.4 Å までの回折点を確認できていたが，表 1 に示すようにデータ処理後の最高分解能は 2.80 Å であった。しかしながら，精密化後の  $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$  値は X 線データおよび中性子データについてそれぞれ 0.140/0.156 および 0.177/0.208 であり，図 2 に示すように重水素が集中している箇所（図ではアルギニン側鎖のグアニジウム基と N 末端メチオンのアミノ基を示す）においては，中性子散乱長  $F_o-F_c$  オミットマップにおいて比較的強いシグナルが観察された。また，タンパク質の外側に位置する主鎖のアミド窒素やアスパラギン側鎖においても顕著な重水素のシグナルが多数見られた。

表 1. データ処理および構造解析の統計値

	X-ray data	Neutron data
<b>Crystal parameters</b>		
State	Superoxidized	
Space group	P2 <sub>1</sub> 3	
Cell dimensions $a = b = c$ (Å)	131.11	
<b>Data collection</b>		
Wavelength (Å)	1.0000	2.63-6.06
Resolution range (Å)	46.35-1.42 (1.44-1.42)	22.84-2.80 (2.90-2.80)
Total reflections	937885 (45892)	142416 (13084)
Unique reflections	140775 (7005)	18598 (1860)
$R_{\text{merge}}$	0.058 (0.867)	0.238 (0.562)
$R_{\text{pim}}$	0.024 (0.365)	0.088 (0.222)
Average $I/\sigma$	17.9 (2.2)	4.0 (1.5)
CC <sub>1/2</sub>	1.000 (0.700)	0.974 (0.709)
Completeness	1.000 (1.000)	0.990 (1.000)
Multiplicity	6.7 (6.6)	7.7 (7.0)
<b>Refinement</b>		
Resolution range	46.35-1.42 (1.44-1.42)	22.82-2.80 (2.95-2.80)
$R_{\text{work}}$	0.140	0.177
$R_{\text{free}}$	0.156	0.208

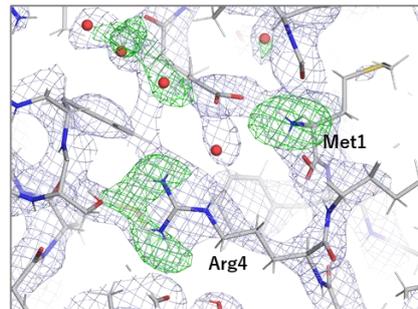
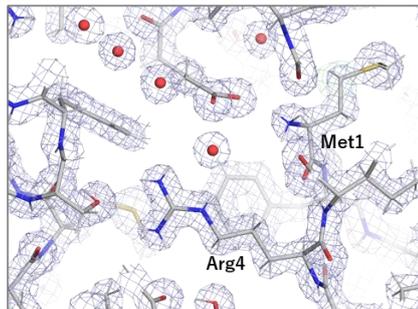
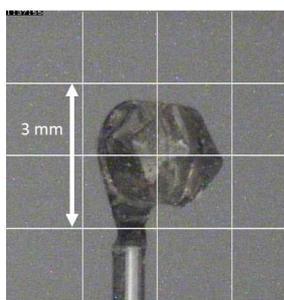


図 1. 超酸化型 Mn-カタラーゼ結晶 図 2. 電子密度図（左）と中性子散乱長密度図（右）の一例

### 4. 結論(Conclusions)

昨年度の還元型に引き続き，今年度は超酸化型の Mn-カタラーゼの X 線・中性子結晶構造解析を行った。これまでに得られた中で最も大きな結晶を用いたにも関わらず，分解能は還元型の 2.33 Å に対して 2.80 Å であった。現在 PDB に登録されている 212 の中性子結晶構造データの中で分解能が 2.8 Å より悪いものは 2 例しかないが，実際に解析をしてみるとタンパク質中で構造の揺らぎが少ない箇所においては重水素のシグナルが明瞭に確認できるケースが多く見られ，用途によっては分解能 2.80 Å でも十分に目的を達成できると考えられる。今後さらに解析を進め，超酸化型の構造決定を目指す。