

高度好熱菌由来マンガンカタラーゼの X 線結晶構造解析 X-ray Crystallographic Analysis of Manganese Catalase from *T. Thermophilus*

山田太郎*, 矢野直峰, 日下勝弘

¹茨城大学 iFRC, 〒319-1106 東海村白方 162-1

Taro Yamada* and Nomine Yano

¹iFRC Ibaraki University, 162-1 Shirakata, Tokai, 310-1106, Japan

1 はじめに

茨城県生命物質構造解析装置 iBIX は大強度陽子加速器施設 J-PARC の物質・生命科学実験施設 MLF に設置された飛行時間型中性子回折計である。この回折計は最大 135 Å の格子長を有する立方晶系のタンパク質サンプルの中性子構造解析が行えるように設計されている。この性能が達成されていることを確認するために、格子長が 133 Å である結晶構造が報告されている高度好熱菌 *T. Thermophilus* 由来マンガンカタラーゼを対象に選んだ。このマンガンカタラーゼは活性部位に μ -オキソ架橋を持つマンガン二核クラスターを有する過酸化水素分解酵素である。これまでに V. V. Barynin らにより、マンガンクラスターの酸化状態が (Mn^{2+} , Mn^{2+}) で塩化物イオンが架橋するもの、(Mn^{3+} , Mn^{3+}) で酸素原子が架橋するものについて構造を報告している[1]。これらの結晶構造と EPR の研究からマンガンカタラーゼの反応機構が推定されているが、構造解析例が少ないために、各段階の構造的な確証は得られていない。とくに架橋酸素のプロトン化状態はマンガンイオンの酸化状態に依存すると考えられるため X 線・中性子単結晶構造解析により反応機構が明らかにできるのではないかと考えた。今回この目的に必要な大型の結晶を得るための結晶化条件と結晶構造の検討を行った。

2 実験

結晶化は V. V. Barynin らの報告を参考にして重水溶液中で結晶化を行った。結晶は 70 mg/ml のタンパク質溶液と同体積の 1.2 M 硫酸アンモニウム d-8, 10 v/v% エチレングリコール, 50 mM リン酸緩衝溶液 (KP) pD 6.4 もしくは 1.7 M 硫酸アンモニウム d-8, 14.5 v/v% エチレングリコール, 50 mM AMPSO 緩衝溶液 pD 9.6 のリザーバー溶液を混合したのちシッティングドロップ蒸気拡散法により得た。結晶の凍結は 30%のエチレングリコールを含むリザーバー様溶液を抗凍結材として使用して行った。X 線回折実験は BL-5A で 100 K で行った。照射 X 線強度は最大の 20-30%程度に設定した。1 フレームあたり 0.5° スキャン, 0.25 秒露光で測定を行って 200 フレームを得た。データ処理プログラムは HKL2000 を使用した。なお、X 線・中性子結晶構造解析に用いるための X 線回折データは BL-17A で収集した。構造精密

化は既知構造 PDB:2v8u を初期構造として使用して、構造精密化プログラム Phenix 1.8.1 を用いて行った。

3 結果および考察

2 つの結晶化条件 pD 6.4 および pD9.6 で得られた結晶についてそれぞれ X 線構造解析を行った。得られた結晶学的データと精密化結果を表 1 に示す。構造精密化により得られたマンガンカタラーゼ活性部位の pD6.4 と pD9.6 における構造を図 1、図 2 に示す。

表 1: 結晶学データ

	KP pD 6.4	AMPSO pD9.6
Beam Line	KEK BL-5A PILUTAS 2M	KEK BL-5A PILUTAS 2M
Wavelength / Å	1.00	1.00
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 3	<i>P</i> 2 ₁ 3
Unit cell dimensions / Å	132.009	131.926
Resolution / Å	33 – 1.69	36 – 1.55
No. observed reflections	735,247 (<i>I</i> / σ (<i>I</i>) > -3)	2,046,629 (<i>I</i> / σ (<i>I</i>) > -3)
No. unique reflections	85,485	110,459
Average <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	19.0 (2.4)	5.7 (3.0)
Completeness / %	99.6 (98.9)	100.0 (100.0)
<i>R</i> _{merge}	0.114 (0.721)	0.152 (0.911)
Redundancy	8.6 (6.9)	18.5 (15.7)
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{Free}	0.160 / 0.183	0.147 / 0.160

pD6.4 および pD9.6 で得られる結晶は結晶外形およびその大きさには差は見られないが、X 線回折データの分解能は pD9.6 の方が若干良い傾向があった。構造精密化の結果 pD6.4 ではマンガンクラスターの His-73 と His-188 に近い μ -架橋酸素原子が硫酸イオンに置換されることが新たにわかった。過酸化水素を水と酸素に分解する反応においてマンガンイオンに配位した過酸化物イオンとプロトンをやり取りすると考えられているリジン残機 Lys-162 の側鎖の NH_3^+ は硫酸イオンの酸素と水素結合を形成している。2 つのマンガンイオンの間には更に HOH-444 による μ -オキソ架橋が存在するが、占有率は 0.5 程度であった。マンガンイオンの周りには更に占有率の低

い酸素原子がいくつか存在しており、 μ -オキソ架橋マンガンクラスターの他にオープン型のマンガンクラスターが共存していることが示唆された。

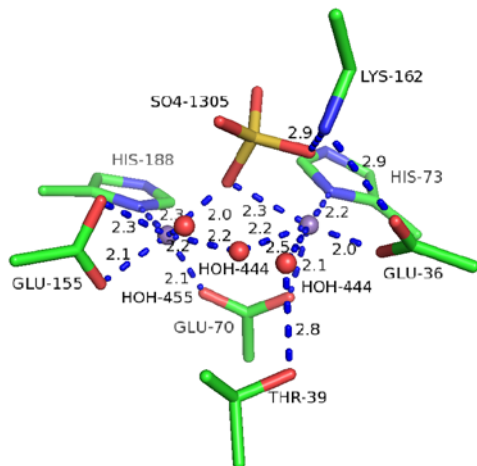


図1：pD6.4における活性部位の構造

pD9.6 結晶の構造は Barynin らが報告している pH9.0 における(Mn^{3+} , Mn^{3+})の構造と類似していた。この場合は His-73 と His-188 に近い μ -架橋酸素原子 HOH-703 は硫酸イオンによる置換を受けていない。また Thr-39 と水素結合を形成する μ -架橋酸素原子 HOH-587 が確認された。

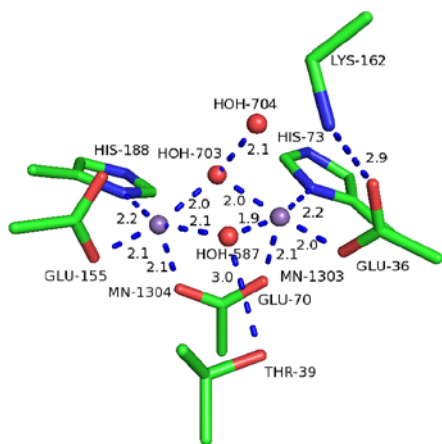


図1：pD9.6における活性部位の構造

Barynin らは結晶構造を基にしたモデリング検討から一番目の過酸化水素水の結合部位は His 側鎖側の μ -架橋酸素原子位置と予想していたが、今回得られた pD6.4 構造における硫酸イオンの結合部位と一致した。この硫酸イオンの置換は結晶化条件によるものであり、中性子結晶構造解析により反応機構を解明する上では適当でない。一方、より高分解能回折データが得られ2つの μ -架橋酸素原子をもつ構造が得られた pD9.6 結晶が現段階ではより良い候補と思われる。pD9.6 における構造でも His 残基側の架橋酸素原子近傍に乱れが観測されていることから、

この μ -架橋酸素原子のプロトン化状態を観測するのは難しいが、少なくとも Thr-39 側のプロトン化状態は決定できると予想する。

4 まとめ

マンガンカタラーゼの中性子単結晶構造解析のための結晶化条件の検討を行った。pD6.4 および 9.6 で得られた結晶について X 線結晶構造解析を行い pD9.6 が回折分解能や結晶構造の点からより良い候補であることがわかった。pD9.6 結晶についてはすでに X 線と中性子回折実験を行い、両データを併用した構造精密化を実施中である。

謝辞

高エネルギー加速器機構の松垣直宏准教授、山田悠介助教、PF 構造生物学ビームラインのスタッフの皆様のご支援とご協力に感謝いたします。また、茨城大学高妻孝光教授のご協力に感謝いたします。

参考文献

[1] V. V. Barinin *et al.*, Crystallography. Reports **45**, 105 (2000).

*taro.yamada.impromptu@vc.ibaraki.ac.jp