

## CueO の中性子構造解析の基礎データの収集

Basic data collection for neutron structure analyses in oxygen reduction enzyme CueO

友寄 克亮<sup>1)</sup>

新村 信雄<sup>1)</sup>

Katsuaki Tomoyori

Nobuo Niimura

<sup>1)</sup>茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター

$\Delta\alpha 5-7$  変異体 CueO の中性子回折実験を行った結果、複数のブラッグ反射が観測され ( $d_{\min}=2.8\text{\AA}$ )、現在の結晶化条件で得られた結晶が、中性子精密構造解析を行うために十分品質の良いものであることが分かった。また精密構造解析を行うためには、現在の結晶サイズの 4~5 倍程度の大きな結晶を作製する必要があることが分かった。  
キーワード： $\Delta\alpha 5-7$  変異体 CueO

### 1. 目的

酸素還元酵素マルチ銅オキシダーゼ CueO は、燃料電池のカソード極の電極触媒のモデル蛋白質である。中でも  $\Delta\alpha 5-7$  CueO は、取り出せる電流密度が比較的大きく反応機構解明には重要な蛋白質である。この酵素の酸素 4 電子還元反応には酸性アミノ酸からのプロトンの授受を伴うので、酸素還元反応機構を解明するためには中性子回折実験が有効な手段となり得る。

中性子回折実験のための大型結晶育成を試みた結果、 $\Delta\alpha 5-7$  変異体 CueO の結晶サイズ ( $0.3\text{mm}^3$ ) が得られた。得られた結晶を用いて定常炉中性子回折実験を行い回折強度から、今後精密構造解析に必要な結晶サイズおよび品質（どこまでの分解能データが得られるか。）を評価することを目的とした。

### 2. 方法

測定はスティル法で行い、24 時間露光を  $\phi=0^\circ$ 、 $90^\circ$  それぞれ 1 フレーム実施した。また反射数が多い  $\phi=0^\circ$  は露光時間を増やし 49.5 時間回折実験を行った。得られたフレームから指数付けを行い部分反射積分強度の計算を行った。フル反射強度は、得られた部分反射強度の 3 倍であると仮定し、最外殻 ( $3\text{\AA}\sim 3.5\text{\AA}$ ) の平均強度を計算した。また面間隔は、空間群 (C2) が X 線回折実験により既知であるため、指数から計算した。

X 線回折実験により得られた全温度因子を仮定し、中性子回折実験により得られた最外殻の平均強度から、ウィルソンの式を用いてある面間隔における平均強度を算出することが可能である。中性子精密構造解析において水素の位置を精度良く決定するためには分解能  $2\text{\AA}$  必要であると言われる。面間隔が  $2\text{\AA}$  と最外殻 ( $3\text{\AA}\sim 3.5\text{\AA}$ ) における平均強度の比が、今後の精密構造解析に必要な結晶サイズの目安を与えることになる。

### 3. 研究成果

中性子回折実験により得られたデータを用いて指数の割り当てを行った結果、格子定数および空間群は X 線回折実験で得られたものと一致することが分かった。また分解能は、 $d_{\min}=2.8\text{\AA}$  であることが分かった。

### 4. 結論・考察

JRR-3 の BIX-3 を用いた中性子回折実験により得られたフレームから指数付けを行い、最外殻  $3.0\sim 3.5\text{\AA}$  の平均反射強度を計算し、その値から中性子精密構造解析を行うために必要な結晶サイズを算出した。仮に  $2.0\text{\AA}$  の分解能を得るためには、結晶品質が今回と全く同一なものが作製できたと仮定した場合、現在の結晶サイズの 4~5 倍 ( $1.2\text{mm}^3\sim 1.5\text{mm}^3$ ) のサイズが必要であることが判明した。中性子精密構造解析を行うための十分なマシンタイムを得ることはできなかったが、今後精密構造解析を行うための十分な指針を得ることができた。

### 5. 引用(参照)文献等

Structure and Function of the Engineered Multicopper Oxidase CueO from *Escherichia coli*-Deletion of the Methionine-Rich Helical Region Covering the Substrate-Binding Site, Kataoka *et.al. J.Mol.Biol.* (2007) **373**, 141-152