

# X線損傷を利用したタバコ由来同化型亜硝酸還元酵素 Nii3 の反応機構解明

氏名：中野 祥吾

所属機関と学年：広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻 D2

課題番号：2010B1666

利用ビームライン：BL38B1

## [目的及び背景]

タンパク質結晶の X 線回折データを収集する際、長時間結晶に X 線を照射することにより、タンパク質構造が変化することが報告されている(1)。特に金属タンパク質については X 線吸収が大きいため X 線損傷が起りやすく、X 線回折データ収集の過程で構造が顕著に変化することが数多く報告されてきている。一方でこの X 線損傷と共に触媒反応も誘起され、その反応進行は、金属タンパク質の不安定な中間体構造を捉える上で有効であることも、近年示されてきている (2,3)。我々は亜硝酸イオン( $\text{NO}_2^-$ )をアンモニウムイオン( $\text{NH}_4^+$ )へと還元するタバコ由来同化型亜硝酸還元酵素、Nii3 について 1.25Å 分解能で立体構造決定に成功し、この高分解能結晶を用いて現在までに基質複合体に関する構造学的研究を行ってきた。しかし  $\text{NO}_2^-$  の一方の N-O 結合を示す電子密度が、もう一方に比べてかなり弱くなる、或いは活性中心における幾つかの水分子に関する電子密度の形状が大きく歪む、などの X 線損傷と考えられる数多くの現象が Nii3 構造において観察された。そこでこのような現象が X 線照射に起因するものか否かを確かめ、更に X 線曝露による構造変化を追跡するために、Nii3-wildtype (Nii3-WT) と Nii3 の各種基質複合体(Nii3- $\text{NO}_2^-$ 、Nii3-NO、Nii3- $\text{NH}_2\text{OH}$ )に関する X 線回折データの収集、顕微分光光度計による X 線照射の評価を行った。これらの実験結果について、Nii3 の基質複合体が X 線回折データ収集中に、どのような変化を受けるのかを、立体構造と分光法の両面から考察した。

## [実験・解析方法]

Nii3-WT、及び Nii3 の各種基質複合体の結晶を作成した。なお測定に用いた結晶のサイズは  $400 \times 400 \times 100 \mu\text{m}$  であった。これらの結晶を用いて X 線回折実験を行った。

ここで X 線照射による Nii3 結晶への影響を確かめるため、これら結晶 (Nii3-WT、Nii3- $\text{NO}_2^-$ 、Nii3-NO 及び Nii3- $\text{NH}_2\text{OH}$ ) の可視光領域における顕微分光測定を X 線照射に対する時系列で行った。ここで分光測定は“X 線照射前 (0.0MGy)”、“X 線回折像の確認後 (0.0~0.08MGy)”、“一回目の X 線回折データセット収集後 (0.08~1.6MGy)”、“二回目の X 線回折データセット収集後 (1.6~3.2MGy)”、“二回目の X 線回折データセット収集後 (1.6~3.2MGy) に室温に戻して anneal したもの”の 5 点について行い、それらのスペクトルを Fig.1 にそれぞれ示した。なお、吸収線量の見積もりにはプログラム“RADDOSE (5)”を用いた。

## [結果と考察]

各種 Nii3 結晶(Nii3-WT、Nii3- $\text{NO}_2^-$ 、Nii3-NO、Nii3- $\text{NH}_2\text{OH}$ )の可視光領域での顕微分光測定の結果と考察

最初に Nii3 の顕微分光測定の結果を Fig.1 に示す。これらは Nii3 に関する 4 つの結晶(Nii3-WT、Nii3- $\text{NO}_2^-$ 、Nii3-NO 及び Nii3- $\text{NH}_2\text{OH}$ ) の X 線照射量によるスペクトル変化である。この図より、今回測定した全ての Nii3 結晶に関するスペクトルは、X 線照射後と X 線照射前で大きく変化することが明らかとなった (Fig.1)。特にシロヘムの  $\alpha$  帯に相当する 567nm のピークが、X 線照射後には 553nm に blue-shift していることが明確に示された。更に、X 線照射前のスペクトルを X 線照射後のスペクトルから差し引いた差スペクトルを波長に対してプロットしたところ、溶液中の実験 (4) として示されていた“シロ

ヘムと[4Fe-4S]クラスターの両方がそれぞれ 1 電子ずつ還元されているスペクトル”と非常によく一致していた。以上の結果から、本研究で測定した Nii3 結晶はすべて、X 線回折データ収集中に 2 電子還元されていると考えられる。また、現在までの我々の研究から確認されていた、Nii3 の基質複合体の電子密度の乱れは、X 線照射による還元反応の誘起によってもたらされたものと考えられる。合わせて、“X 線回折像の確認後”のスペクトルから、これら Nii3 結晶は、短時間の X 線照射では完全に還元されないことも確認できた。そこで、“低線量”、及び“高線量”の 2 つの異なる X 線照射で、Nii3-WT、Nii3-NO<sub>2</sub>、Nii3-NO 及び Nii3-NH<sub>2</sub>OH に関する 4 種類の Nii3 について回折データの収集を行った。

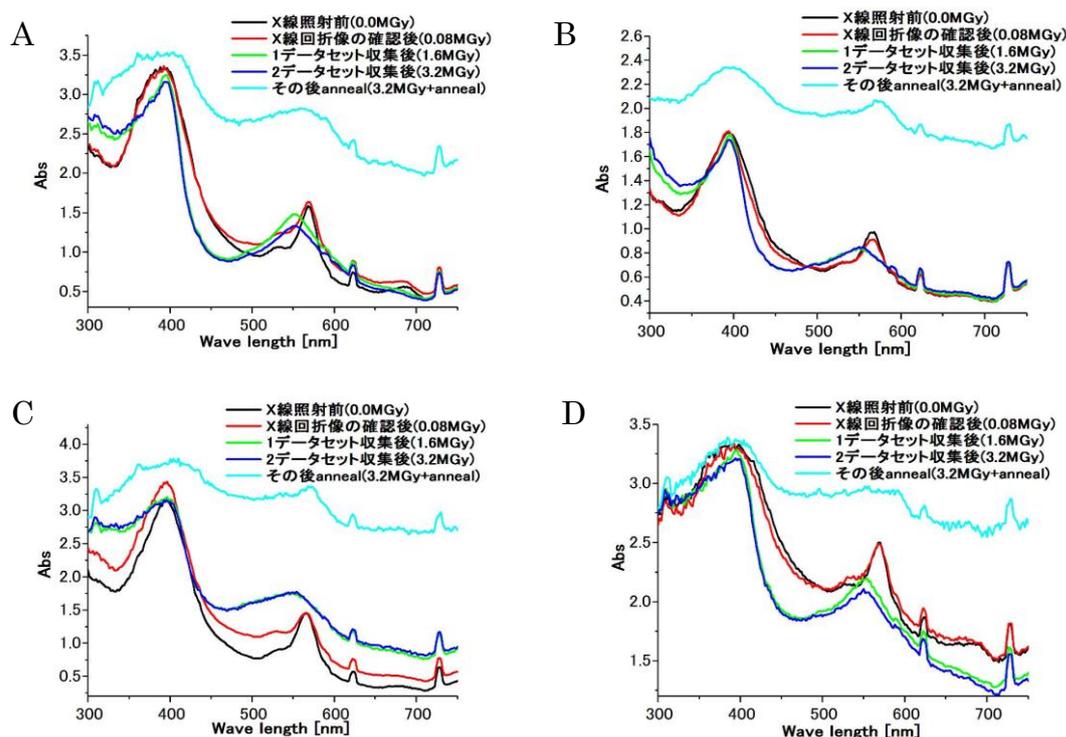


Fig.1, X 線照射による各種 Nii3 結晶の UV-Vis スペクトル変化。Nii3-WT は A、Nii3-NO<sub>2</sub> は B、Nii3-NO は C、そして Nii3-NH<sub>2</sub>OH は D に示す。

### 低線量、及び高線量の X 線照射により決定した Nii3-WT 構造に対する、X 線照射による構造変化の追跡

次に X 線損傷により、Nii3-WT 構造にどのような変化を生じたかを評価するため、Nii3-WT の結晶について、異なる 2 つの X 線照射により構造をそれぞれ決定した。ここで低線量(0.0-1.6MGy)及び高線量(1.6-3.2MGy)の照射線量で決定した Nii3-WT 構造をそれぞれ Nii3-WT(LD)及び Nii3-WT(HD)とよび、これらの活性中心の構造を Fig.2A, B にそれぞれ示す。また測定した際の結晶学的パラメータは Table.1 に示す。まず、Fig.2A-B から、X 線照射の増加に伴い、矢印部位の水分子、Wat955 の電子密度が強く現れることが確認された。さらに、シロヘム周辺の水分子については、X 線照射の増加に伴い、水分子の分布が大きく変化することが観測された。一方で、基質の還元为中心的な役割を果たす 3 つのアミノ酸残基 (Arg109、Arg179、Lys224) については、X 線照射による影響は観測



原子(O1)が Lys224 の側鎖と水素結合を形成している側の N-O 結合) に関する電子密度が弱くなることが明らかとなった。さらに、X線吸収線量の増加に伴い、WatB (Fig.3)の  $2F_o - F_c$  map が大きく変形することが明らかとなった。ここで WatB の  $F_o - F_c$  map は、WatB がマルチサイトを持つことを示していた (data not shown)。Fig.1 の結果より Nii3-NO<sub>2</sub> 複合体構造も X線照射により 2 電子還元されると考えられる。以上の結果より、WatB は NO<sub>2</sub> が活性中心に結合したときには、マルチサイトを持たず、Nii3-WT で確認されていた位置のみに存在すると予測される。しかし X線損傷により 2 電子還元されると、WatB はマルチサイトを持つようになり、さらに基質の NO<sub>2</sub> は R179、K224 に近い N-O1 結合から先に切断されることが予測できる。事実、Nii3-NO 複合体の構造 (Fig.3C) では N-O1 結合が切断されている結果が得られており、この推測が正しいことを裏付けている。

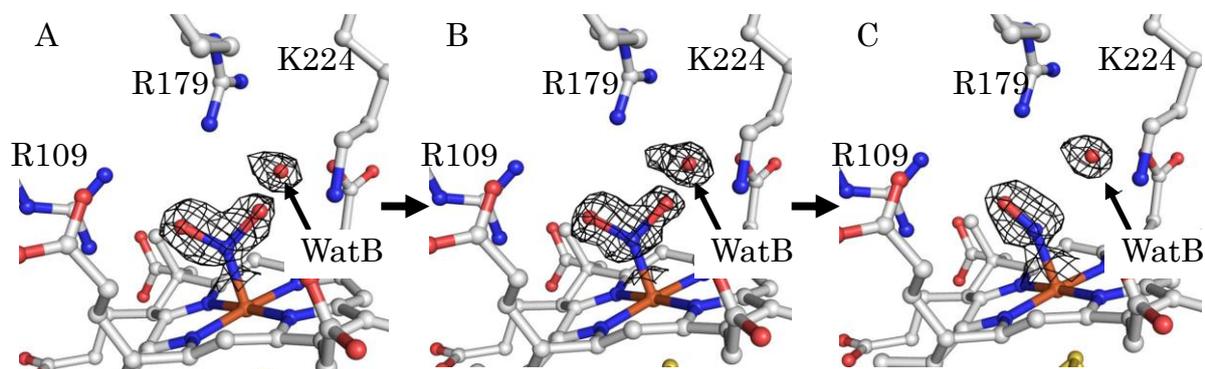


Fig.3 A-B),低線量(0.0~1.6MGy)と高線量(1.6~3.2MGy)の X線照射にて構造決定を行った Nii3-NO<sub>2</sub> 複合体の活性中心構造。WatB の形状が X線吸収線量の違いにより変化していることが観察された。C), Nii3-NO 複合体の活性中心構造。R179 と K224 に近い N-O1 結合が切断されていることが分かる。

Table.1 Nii3 の Wild type 及び基質複合体の結晶学的パラメータ

	Nii3-WT(LD*)	Nii3-WT(HD*)	Nii3-NO <sub>2</sub> (LD)	Nii3-NO <sub>2</sub> (HD)	Nii3-NO
Space group	P42 <sub>1</sub> 2	P42 <sub>1</sub> 2	P42 <sub>1</sub> 2	P42 <sub>1</sub> 2	P42 <sub>1</sub> 2
a (Å)	132.68	132.71	134.15	136.14	132.76
c (Å)	77.49	77.51	77.99	78.00	77.50
X-ray Source	SPring-8 BL38B1	SPring-8 BL38B1	Spring-8 BL38B1	SPring-8 BL38B1	PF BL17A
Wavelength (Å)	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Resolution (Å)	1.6	1.6	1.6	1.6	1.40
Completeness(%)	99.4	99.4	99.5	99.5	100
R <sub>merge</sub>	0.071	0.072	0.077	0.078	
X-ray dose (MGy)	0.0-1.6	1.6-3.2	0.0-1.6	1.6-3.2	---
R	0.165	0.165	0.169	0.188	0.163
R <sub>free</sub>	0.190	0.188	0.179	0.195	0.174
R.m.s.d (bond length) (Å)	0.012	0.012	0.008	0.007	0.008
R.m.s.d (bond angle) (degree)	1.356	1.377	1.259	1.273	1.248

\* LD: Low-dose X-ray irradiation, HD: High-dose X-ray irradiation の略

### [まとめと今後の予定]

本研究で得られた顕微分光測定の結果は、Nii3の全ての基質複合体において、シロヘム及び[4Fe-4S]クラスターがX線照射により2電子還元反応が起こることを示していた。また、それらの結晶構造は、このスペクトル変化が活性中心の電荷状態の変化により起こる水分子の分布の変化にうまく対応していることを示していた。以上の結果から、AssNiRやAssSiR等の活性中心にシロヘムと[4Fe-4S]クラスターを持つ酵素の反応機構を解明する上で、X線照射による構造変化は無視できない問題であることが明らかとなった。

今後はこれらの分光データと構造データを統合し、その他の基質複合体についても同様の解析を行い、AssNiRに関する水分子も絡めた詳細な還元反応機構を明らかにすることを検討していく。

[謝辞] 最後に、BL38B1での実験をサポートして頂いた馬場清喜氏と、顕微分光測定を行う際にアドバイスを頂いた清水伸隆氏にこの場をかりて御礼を申し上げます。

### [参考文献]

- 1, Garman EF (2010) Radiation damage in macromolecular crystallography: what is it and why should we care? *Acta Crystallographica Sect. D* 66: 339-351
- 2, Berglund GI *et al.* (2002) The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution *Nature* 417: 463-468.
- 3, Hersleth HP *et al.* (2008) The crystal structure of peroxymyoglobin generated through cryoradiolytic reduction of myoglobin compound III during data collection *Biochem. J.* 412: 257-264
- 4, Setif P. *et al.* (2009) New insights into the catalytic cycle of plant nitrite reductase. electron transfer kinetics and charge storage *Biochemistry* 48: 2828-2838
- 5, Paithankar KS *et al.* (2010) Know your dose: RADDSE *Acta Crystallographica Sect. D* 66: 381-388