脱窒菌 *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU1051 由来青色亜硝酸還元酵素の
高分解能X線構造解析

○渡邊泰崇・井上豪・後藤田正晴・五宝学・Deligeer*・片岡邦重*・
山口和也*・鈴木晋一郎*・甲斐 泰（阪大院工、阪大院理*）

亜硝酸還元酵素(NIR)は脱窒系における key enzyme であり、電子供与タンパク質から1電子を受け取り亜硝酸イオンを一酸化窒素に還元する。現在までに、銅含有 NIR では青色と緑色のもの合わせて5種類の NIR の一次構造が知られており、そのうち3種類のX線結晶構造解析が報告されている。しかし、2.0 Å 分解能を越える高分解能での青色 NIR の構造解析はまだ報告されていない。本研究では、*Al. xylosoxidans* GIFU 1051 由来の青色 NIR (A_{xg}-NIR)の2.0 Å 分解能のX線構造解析を行ない、既に報告のある *Al. xylosoxidans* NCIB11015 の青色 NIR (A_{xn}-NIR)の構造と比較した。また高分解能での解析が報告されている他の緑色 NIR の構造と比較して、呈色の違いについて検討した。

塩基配列から推定される A_{xg}-NIR のアミノ酸配列を他の NIR の配列と比較すると、同じ青色 NIR である A_{xn}-NIR とは77%、緑色 NIR である *Ach. cycloclastes* の NIR とは70%という高い相同性がある。3次元立体構造の類似性が予想されたが、呈色の違いを明らかにする目的で結晶学的研究を行った。結晶化はPEG4000を用いたハンギングドロップ蒸気拡散法によって得られた。回折強度データの測定は理学電気製 RAXIS-IIc を用い2.0 Å 分解能までのデータを収集した。構造解析は分子置換法で行い、プログラムは CCP4 の AMORE を用いた。モデル分子には我々が独自に2.0 Å 分解能で精密化した *Ach. cycloclastes* 由来の緑色 NIR の構造を用いた。最終的な *R* 値は18.0%、*R*_{free} 値は22.6%が得られた。このモデルをもう1つの青色 A_{xn}-NIR と比較したところ、Cα 炭素の r.m.s. 変位は0.54 Å と小さく、全体構造は類似したが、Type1 銅の配位構造は同じ青色 A_{xn}-NIR のそれとは異なり、歪んだ四面体型構造をとり、他の緑色 NIR と一致した。ただ、配位しているメチオニン残基のコンホメーションが緑色 NIR と大きく異なり、これが呈色の違いと関係することが示唆された。一方、Type2 銅回りの配位構造では、配位している水分子と銅イオンの距離が約2.5 Å と、これまでの報告されている他の NIR と比較して0.5 Å も長いという異なる結果も得られた。最近、高エネルギー加速器研究機構のシンクロトロン放射光を用いて1.4 Å 分解能の回折強度データが得られた。また同様にシンクロトロン放射光を用いて還元体 NIR の回折強度データの収集も行った。これらのデータを用いて解析を行った後、呈色の違いや反応機構についてさらに検討を加える予定である。