



## Orf1 の位相決定の予備的解析

新倉春香、日弁隆雄、伊藤貴文、濱野吉十  
福井県立大学・生物資源学研究所

キーワード : 酸化還元酵素, 生合成, FAD

### 1. 背景と研究目的

本研究で対象とする新規酵素について、これまでに得られた単結晶は 2.7 Å 分解能程度の反射データを与え、空間群  $C222_1$ 、格子定数  $a = 127, b = 210, c = 117$  (Å) と推定されてきた。本酵素は大腸菌で発現されなかったため、放線菌にて組換え酵素の構築を行った。しかしながら、放線菌でのセレノメチオニン化酵素の作製法は報告が無かったことから、大腸菌のセレノメチオニン化酵素の作製法<sup>1,2</sup>を参考に、セレノメチオニンを用いた放線菌の培養条件検討を行った。これによってセレノメチオニン化酵素の取得に成功し、結晶化を行ったものの、高い分解能を示す結晶の作製には未だに至っていない。さらに重原子による同型置換も様々検討したが、残念ながら最適条件は見つかっていない。そこで S-SAD 法による位相決定を検討することにした。より良い分解能を示すネイティブの結晶を選抜するため、放射光実験施設にて X 線単結晶回折測定を行った。

### 2. 実験内容

酵素の結晶化は、以下のようにして行った (4 M ギ酸ナトリウム、0.3 M DNSB-195、2.5 mg/ml 酵素、10 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5 mM DTT、0.5 mM EDTA)。得られた結晶は、窒素ガス気流下 100 K で凍結した。あいち SR ビームライン BL2S1 において波長 1.8000 Å の X 線を用いて ADSC Q315r CCD で回折強度データを収集した。測定条件として、振動角  $0.5^\circ$ 、照射時間 10 s/frame として、 $\omega = 0^\circ$  から  $360^\circ$ 、さらに  $\kappa$  を  $90^\circ$  傾けた後、 $\omega = 0^\circ$  から  $360^\circ$  についてデータを収集した。得られたデータは XDS を用いて積分とスケーリング処理を行った。

### 3. 結果および考察

今回準備した 4 つの結晶のうち、回折データセットが収集可能だった結晶は 1 個のみであった。その結晶について波長 1.8000 Å で回折データ収集を行った結果、到達分解能は 3.4 Å、本結晶の空間群は  $C222_1$ 、格子定数  $a = 126.4, b = 208.9, c = 116.8$  (Å) であった。得られた回折強度データをスケーリング処理し、S-SAD 法による位相決定を試みた。スケール因子や温度因子の変動は比較的小さかったが、異常散乱シグナルの強度が不十分であり、今回は位相を決定できなかった。位相決定には、結晶の品質を改善し、分解能を改善することが今後必要と思われた。また、一部の結晶で氷や塩の析出が観察されたため、結晶の凍結条件や測定用ループについて継続して検討し、凍結保存時の結晶品質の低下を防ぐ方法の確立を目指す。

### 4. 参考文献

1. *J. Mol. Biol.*, 229, 105 (1993)
2. *Methods Enzymol.*, 276, 523 (1997)