

提出日：平成 28 年 5 月 15 日

平成 27 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

課題名	新規な銅タンパク質の構造研究		
研究代表者	氏名	藤枝伸宇	
	所属機関名・部局名	大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻	
	職名	助教	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)	<input type="radio"/>	共同研究員	
	<input type="radio"/>	国際共同研究課題	
	<input type="radio"/>	超高磁場NMR 共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名	栗栖 源嗣		
<p>銅酵素は生体に広く分布し、単核、二核、多核などさまざまな活性中心を形成している。チロシナーゼは磁氣的に強く相互作用した二核銅中心（タイプⅢ銅）を有し、フェノールの水酸化反応やカテコールからキノンへの酸化反応を触媒する。また、様々な生物種の体内でメラニンなどの生合成に関与する鍵酵素として機能することから、生体の防御や免疫代替、特にヒトでは白髪、黒髪を司っており、数多くの研究が行われているが、その反応機構は未だに明らかとなっていない。我々、以前から、麹菌由来のチロシナーゼを用いて、銅の取り込み過程など、成熟化について明らかにしてきた。本研究では、分子論的観点から反応機構を解明するため、酸素結合型および活性制御ドメインを加水分解除去した活性型について結晶構造を決定した。</p> <p>昨年度、野生型における酸素結合型の結晶および、銅結合部位に変異導入した C92A についての酸素結合型の結晶について高分解能（両者ともに分解能 1.4 Å）のデータセット取得に成功したが、最終的なモデル構造において銅結合サイト近傍に酸素の電子密度が低いことが分かった。これは X 線による還元がおり、酸素結合型と酸素非結合型が混ざった状態で観測されていることが示唆された。そこで X 線損傷を減少させるため、16 個の結晶から取得した低損傷のデータをマージし、再度電子密度を観察したところ、二核銅の中心に O-O 間距離が 1.4-1.5 Å で過酸化水素と見られる電子密度が確認できた。また、活性制御ドメインを加水分解除去した活性型については、野生型では活性が高いために結晶化が困難であったが、活性を減少させた変異体 C92A において結晶が得られており、1.5 Å の分解能でデータセット取得に成功した。古くからチロシナーゼ阻害剤として知られ、かつ化粧品添加物として用いられているコウジ酸を結晶に浸漬し、構造を決定したところ、銅中心に結合した形でコウジ酸の電子密度がはっきりと確認された。今後、この結晶構造に加え、銅を浸漬させたホロ型や基質結合型についてもデータセットを取得し、解析することで基質の結合様式（ミカエリス複合体）や反応中間体の状態に対する知見が得られると考えられる。</p>			

※本様式は、“拠点事業成果報告”として、拠点ホームページにて公開させていただく予定です。

※必ず A4 用紙 1 枚におさめて下さい。 ※提出期限：平成 28 年 5 月 20 日（金） ※提出の際は PDF 変換して下さい。

※提出先：大阪大学蛋白質研究所拠点プロジェクト班 E-mail: tanpakuken-kyoten@office.osaka-u.ac.jp