

提出日：2019年 5月 15日

平成 30 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	中性子および X 線自由電子レーザーによる結晶構造解析を基盤とした銅含有アミン酸化酵素の反応解析		
研究代表者	氏名	村川武志	
	所属機関名・部局名	大阪医科大学 医学部 生化学教室	
	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"/>	超高磁場NMR 共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名	鈴木守		
<p>銅含有アミン酸化酵素は、生物界に広く分布し、種々の生理活性アミン類の酸化的脱アミノ反応を触媒する。本酵素はサブユニット分子量約 70,000~95,000 のホモダイマー構造をもち、各サブユニットは、補欠金属の 2 価銅イオンとペプチド・ビルトイン型キノン補酵素、トパキノン (TPQ) を含有している。申請者らはこれまで土壌細菌由来銅/TPQ 含有アミン酸化酵素 (AGAO) の反応機構を解析し、触媒過程において補酵素 TPQ が、銅イオンに配位した On-Cu 型と銅イオンに配位しない Off-Cu 型をもつこと、そして Off-Cu 型では触媒塩基 Asp298 による酸塩基反応、On-Cu 型では銅イオンとの酸化還元反応を行うことを明らかにした。反応過程での On-Cu/Off-Cu の割合は pH に依存し、コンフォメーション変化は複数の解離基のプロトン化状態に制御されると考えられている。本研究は、X 線自由電子レーザーを用いた連続フェムト秒結晶構造解析 (SFX) 結晶構造解析により、Off-Cu から On-Cu へのコンフォメーション変化を直接観察すること、および、広 pH 領域の中性子結晶構造解析より、解離基のプロトン化状態によって引き起こされるコンフォメーション変化の制御機構を解明することを目的とする。</p> <p>SFX を行うには 3-5 <math>\mu\text{m}</math> 程度の微結晶を大量に必要とする。このため、まずは微結晶の大量調整系を試みた。シーディング法とバッチ法を組み合わせた手法により 3-5 <math>\mu\text{m}</math> 程度の微結晶を再現性良く大量に調製することに成功した。得られた微結晶を使用し、グリースマトリックス法を用いて本結晶の SFX 測定を行ったところ分解能 2.2Å 程度のデータが得られた。</p> <p>中性子結晶構造解析用の結晶化条件についても見直しを行い、酸化型酵素 (基質フリー型) について 8 mm<sup>3</sup> を超える大型結晶の作成に成功した。得られた結晶は蛋白質研究所内の低温窒素ガス吹き付け装置にて凍結し、中性子及び X 線回折測定を行ったところ、それぞれ 1.72 Å および 1.14 Å 分解能の反射が得られた。また反応中間体結晶については、酸化型酵素結晶に対して基質をソーキングすることにより調製した。こちらは中性子が分解能 1.6 Å、X 線が分解能 1.1 程度の一タセットが得られ、現在積分を行っている。</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：令和元年 5 月 17 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