

(様式 1-2)

提出日：2021 年 5 月 20 日

2020 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		Fold type I PLP 酵素における反応機構の解明	
研究代表者	氏名	宮原郁子	
	所属機関名・部局名	大阪市立大学・大学院理学研究科	
	職名	准教授	
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		栗栖源嗣	
<p>PLP 酵素の Fold type の中で Type I に属する酵素は最も多く、触媒する反応も基質も多種多様である。多機能補酵素である PLP を結合し、同じ fold を持ちながら、それぞれの酵素が異なる基質特異性、反応特異性を如何にして獲得しているかを立体構造から明らかにすることが本研究の目的である。</p> <p><i>Caulobacter crescentus</i> 由来アミノレブリン酸合成酵素アミノレブリン酸合成について、1.0Å分解能に迫る回折能をもつ結晶を得ることに成功した。一方で、この結晶化条件で析出した結晶は、基質結合部位に結晶化条件に含まれる酢酸イオンが結合した構造であったため、基質や基質アナログをソーキングするには適さなかった。そこで、酢酸イオンを含まない結晶化条件の検討と並行して、酢酸イオンを含まないようなバッファーに得られた結晶を浸すことにより、活性部位から酢酸イオンを除去する方法を試みた。結晶化条件から酢酸カルシウムを除き、かつ PEG600 の濃度を高くした溶液中で、作成した結晶が溶解することなく保存出来ることが分かった。保存した結晶の X 線構造解析を行うことにより、活性部位から酢酸イオンが除去されていることが分かった。さらに、保存した結晶へ基質のグリシンをソーキングすると、活性部位にグリシンが結合した構造を得ることが出来た。しかし、もう 1 つの基質であるスクシニル CoA が結合すると想定される場所に PEG600 と考えられる電子密度が現れたこと、基質グリシンの占有率が上がらないことから、PEG600 の濃度をより低くした条件でのソーキングを試みていく予定である。</p> <p><i>Sphingobacterium multivorum</i> 由来セリンパルミトイル転移酵素(SmSPT)については、既にグリシンやアラニンの複合体結晶を作成することにより、ヒト SPT の遺伝変異により発症する遺伝性感覚ニューロパチーの原因とされる異常代謝物の生成機構について立体構造から考察を行っていたが、今回、さらに SPT では反応が進行しないトレオニンや、反応が進行するホモセリンを結合させた構造を取得し、酵素の基質特異性の許容性について明らかにすることが出来た。今後は、もう 1 つの基質であるパルミトイル CoA もしくはそのアナログが酵素に結合した構造の取得を目指す。</p>			