

2021 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

（1）事業名（下記より該当事業名を選択し、ほかは削除して下さい。）

共同研究員

（2）研究代表者

氏名：藤枝 伸宇

所属機関名・部局名・職名：大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

（3）研究課題名（申請時に記載したものと同一課題名を記入して下さい。）

新規な銅タンパク質の構造研究

（4）蛋白質研究所受入担当教員

教員名：栗栖 源嗣（研究室名：蛋白質結晶学）

（5）研究成果の概要（公開）

チロシナーゼはメラニンの生合成に関与するユビキタス酵素であり、フェノールの水酸化とそれに続くドーパの酸化反応を触媒する。活性中心にはそれぞれ3つのヒスチジンが配位した反強磁性的に相互作用した二核の銅イオンがある。これまでメラニン合成を阻害する美白化粧品の開発などを目的として、チロシナーゼの反応機構を解明するための研究が数多く行われてきた。モデル錯体を用いた研究により鍵段階は基質が銅と配位結合を形成し、芳香族求電子置換反応で進行するステップと考えられてきたが、未だにその詳細ははっきりしない。当研究室ではこれまでに活性制御ドメインをもつ不活性型チロシナーゼの結晶構造を明らかにしてきた。また、活性制御ドメインを加水分解除去した活性型チロシナーゼ、L-チロシン、L-ドーパとの複合体、酸素との複合体の結晶構造をそれぞれ決定した。この結果に基づき、チロシナーゼのフェノール水酸化反応機構に関して、基質の結合により、銅の分子内遷移が誘起され、これに伴い、結合した酸素の向きが大きく変化することで、活性を発揮するという興味深い現象を捉えることに成功した。また、現在までL-フルオロチロシンとの複合体結晶構造解析に取り組んできたが、L-フルオロチロシンがL-チロシンに比べわずかながら分子サイズが大きく、基質結合部位に結合しないことが分かっていた。そこで、本年度は反応機構を更に検証するため、L-フルオロチロシンとの基質結合部位を少し広げた変異体との複合体結晶構造解析に取り組んだ。L-フルオロチロシンとの野生型複合体結晶と同様に、金属の結合していない活性体チロシナーゼの結晶を、硫酸銅を含む保存液に浸漬した後、L-フルオロチロシンを1 mM 含む保存液に1 分間浸漬した。この結晶のデータ収集を行い、データ解析後に電子密度を確認したが、銅結合サイト付近にL-フルオロチロシンと思われる分子は確認することができなかった。そこで、クライオ溶液のL-フルオロチロシンの濃度を10, 20 mM と増加させ、再度、同様の実験を行ったところ、占有度は低いものの水ではないと考えられる電子密度が観測された。今後、さらなる活性中心の変異体を用いて複合体の結晶構造解析を目指すことでより詳細な反応機構解明が期待できる。