

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：宮原郁子

所属機関名・部局名・職名：大阪公立大学・大学院理学研究科・准教授

(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。)

Fold type I PLP 酵素における酵素反応機構の解明

(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)

研究の背景および目的

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。我々は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それぞれの立体構造から明らかにしている。ヘム生合成経路における初発律速酵素であるアミノレブリン酸合成酵素(ALAS) については、既に活性部位に結晶化剤に使用した酢酸イオンが結合している構造を得ていたため、本年度は酢酸を含まない条件での結晶化を試みた。また、スフィンゴ脂質生合成経路の初発律速酵素であるセリンパルミトイル転移酵素については、既に様々なアミノ酸基質との複合体結晶を得ることが出来ていたが、今回さらに異なる結晶化条件の探索を行った。

方法と結果

*Caulobacter crescentus* 由来アミノレブリン酸合成酵素については、野生型酵素を大量発現すると一部の酵素にヘムが結合し不活性化する。このため、ヘムの結合サイトと考えられるアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体を使用し、蛋白質研究所の結晶化ロボット *mosquite* で種々の結晶化条件の検索を行った。複数の条件で結晶が得られ、それぞれの条件について最適化を行ったところ細長い柱状結晶を再現性よく得ることが出来た。この結晶をエチレングリコールでクライオプロテクタント処理を行った後、放射光施設で回折実験をおこない、1.7Å分解能のデータを得ることが出来た。現在、解析を進めているところだが、活性部位に何も化合物が結合していないアポ型構造であることが分かった。今後、この結晶へ基質をソーキングすることを試みる予定である。また、*Sphingobacterium multivorum* 由来セリンパルミトイル転移酵素については、既に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間隔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、本年度はこちらも結晶化ロボットを用いて活性部位にアナログが存在しないアポ型の構造を得ることが出来た。現在、クライオプロテクタント溶液の最適化を行っているところである。