

2022 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：村川武志

所属機関名・部局名・職名：大阪医科薬科大学・医学部・助教

## (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。）

中性子および X 線自由電子レーザーを用いた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

## (4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：鈴木守（研究室名：蛋白質解析先端研究センター 超分子構造解析学研究室）

## (5) 研究成果の概要（公開）

\*背景および目的、方法と結果、について、公開して差し支えない範囲で 1 ページ以内で記載。

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、さらに 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) 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。

SFX を行うには 3-5  $\mu\text{m}$  程度の微結晶を大量に必要とするため、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ることにより 3-5  $\mu\text{m}$  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。得られた微結晶について、嫌気条件下で二液混合 SFX 測定を試みた。二液混合 SFX 測定では、酵素微結晶液と基質液の混合から XFEL 照射までの時間（遅延時間）を変えることにより、反応開始後、数十ミリ秒から数百ミリ秒オーダーでの構造変化を追跡した。これまでに、いずれも分解能 1.80Å 程度の遅延時間に沿ったいくつかの反応中間体の検出に成功した。現在構造解析を進めているが、反応中間体と考えられる電子密度が確認できている。

中性子結晶構造解析用の結晶化条件についても基質ソーキングにより反応中間体を作成し、J-PARC にて中性子回折測定を行い、1.66 Å 分解能のデータセットを得た。