

(様式 1-2)

提出日：2020 年 5 月 15 日

2019 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  | 新規な銅タンパク質の構造研究 |                            |  |
| 研究代表者  | 氏名             | 藤枝伸宇                       |  |
|  | 所属機関名・部局名      | 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻 |  |
|  | 職名             | 准教授                        |  |
| 事業名<br>(該当の事業名の右欄に○)   | ○              | 共同研究員                      |  |
|  |                | 超高磁場NMR 共同利用研究課題           |  |
|  |                | クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題          |  |
|  |                | 客員フェロー                     |  |
| 蛋白研受入担当教員名   | 栗栖 源嗣          |                            |  |
| <p>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、チロシンとの複合体、酸素との複合体の結晶構造を決定した。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。本年度はこの結果を更に</p> |                |                            |  |

検証するため、2つ目の基質である L-ドーパとの複合体結晶構造解析に取り組んだ。L-チロシンとの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-ドーパを 10 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、データ解析したが、銅結合サイト付近に L-ドーパの電子密度を確認することができなかった。そこで、L-ドーパの濃度を 20 mM に増加させ、再度、実験を行ったところ、ドーパの芳香環に由来すると考えられる電子密度が一部観測された。さらに、浸漬時間を 2 分間、10 分間と増加させ、同様の検討を行った結果、10 分間では L-ドーパに由来する電子密度が全く見られなくなったものの、2 分間の浸漬時間で L-ドーパの電子密度が観測された。アミノ基とカルボキシル基の電子密度に加え、別の電子密度が観測された。現在、詳細な解析を行っているが、ドーパクロムに由来する電子密度ではないかと推測される。このように、本年度ではチロシナーゼの二つ目の基質であるドーパとの複合体結晶構造解析に成功した。