

提出日：平成 30 年 5 月 18 日

平成 29 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	超高分解能 X 線および中性子線結晶構造を基盤とした銅含有アミン酸化酵素の反応解析		
研究代表者	氏名	村川武志	
	所属機関名・部局名	大阪医科大学 医学部 生化学教室	
	職名	助教	
事業名 (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	鈴木守		
<p>銅含有アミン酸化酵素は、微生物から哺乳動物に至る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。TPQ はその前駆体 Tyr 残基から銅イオン存在下で自己触媒的に生成する。申請者らはこれまで土壌細菌由来銅/トパキノン (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、通常型である銅に配位しない Off-Cu 型の他に、銅配位型である On-Cu 型をもつこと、そして 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。On-Cu/Off-Cu の 2 つのコンフォメーションの割合が pH により変動し、複数の <math>pK_a</math> を持つことから、コンフォメーション変化が複数の解離基のプロトン化状態に制御されていることは明らかである。本研究では AGAO の超高分解能 X 線および中性子結晶構造解析を行い、得られたデータより解離基のプロトン化状態を明らかにすることを目的とする。</p> <p>結晶化条件などの徹底的な見直しを行った結果、酸化型酵素 (基質フリー型) について <math>8 \text{ mm}^3</math> を超える大型結晶の作成に成功した。得られた結晶は蛋白質研究所内の低温窒素ガス吹き付け装置にて凍結し、中性子及び X 線回折測定を行ったところ、それぞれ <math>1.72 \text{ \AA}</math> および <math>1.14 \text{ \AA}</math> 分解能の反射が得られた。これまでタンパク質の中性子結晶構造解析は 30 種類程度行われているが、分子量が 1,000-2,000 程度の小型のものが大半であり、AGAO (サブユニット分子サイズ 72 kDa のホモダイマー) はこれを大幅に上回る。またセミキノン反応中間体については、酸化型酵素に対して基質をソーキングすることにより調製した。こちらは分解能 <math>1.6 \text{ \AA}</math> 程度の中性子回折のデータセットが得られ、現在積分を行っている。また本結晶については 20108 年五月下旬に PF において X 線回折測定を予定している。</p>			

※本様式は、“拠点事業成果報告”として、拠点ホームページにて公開させていただく予定です。

※必ず A4 用紙 1 枚におさめて下さい。 ※提出期限：平成 30 年 5 月 18 日 (金) ※提出の際は PDF 変換して下さい。

※提出先：大阪大学蛋白質研究所拠点プロジェクト班 E-mail: tanpakuken-kyoten@office.osaka-u.ac.jp