

(様式 1-2)

提出日：2020 年 4 月 22 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		中性子および X 線自由電子レーザーによる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	
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	
	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	
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、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。反応過程での On-Cu/Off-Cu の割合は pH に依存し、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) 結晶構造解析により、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 μm 程度の微結晶を大量に必要とする。このため、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た手法により 3-5 μm 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は基質混合および非混合条件下で SFX 測定を行ったところ、両者とも分解能 2.0Å 程度のデータが得られた。現在解析を進めているが、基質混合条件では、反応中間体と考えられる電子密度が確認できた。 中性子結晶構造解析用の結晶化条件についても見直しを行い、8 mm³ を超える大型結晶の作成に成功した。得られた結晶の一部については基質ソーキングにより反応中間体を作成した。基質未添加および添加した結晶について、それぞれについて中性子回折測定を行ったところ、それぞれ 1.72 Å および 1.65 Å 分解能の反射が得られた。これらの結晶については X 線回折測定も実施しており、積分処理が終了後、同時精密化を始める予定である。			