

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：藤枝 伸宇

所属機関名・部局名・職名：大阪公立大学・大学院農学研究科・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。)

新規な銅タンパク質の構造研究

(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)

***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。**

二核銅チロシナーゼはメラニンの生合成に関与する鍵酵素で、フェノールの酸化とドーパの酸化反応を触媒する。二核銅中心はそれぞれ3つのヒスチジンが配位しており、反強磁性的に相互作用している。チロシナーゼ阻害剤はメラニン合成を阻害して、美白を促進するため、これまで化粧品の開発に応用されてきた。それにともない、チロシナーゼの反応機構を解明するための研究も数多く行われてきた。モデル錯体を用いた化学的研究により律速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。我々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、L-チロシン、L-ドーパとの複合体、酸素との複合体の結晶構造をそれぞれ決定した。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、銅の分子内位置遷移が誘起されることを明らかにした。さらに、結合した酸素の向きが大きく変化することで、活性を発揮している可能性を見出した。また、現在までL-フルオロチロシンとの複合体結晶構造解析に取り組んできたが、L-フルオロチロシンがL-チロシンに比べわずかながら分子サイズが大きく、基質結合部位に結合しないことが分かっていた。昨年度、L-フルオロチロシンとの基質結合部位を少し広げた変異体との複合体結晶構造解析に取り組んだ。しかし、解析の結果、最終的に明確にL-フルオロチロシンに由来すると断定できる電子密度が得られなかった。この変異体から形成させた結晶が野生型と比べ非常に不安定であったことから、本年度も、浸漬条件などの再検討を行い、L-フルオロチロシンとの複合体の結晶構造解析に取り組んだ。まず、クライオ溶液への結晶の浸漬を徐々に濃度を上げていくことでダメージを軽減した。クライオ溶液のL-フルオロチロシンの濃度を5, 10, 20 mMと増加させ、再度、同様の実験を行ったところ、やはり、電子密度を得ることはできなかった。今後、さらなる活性中心の変異体を用いて複合体の結晶構造解析を目指す。