2P009

乳酸酸化酵素変異体の X 線結晶構造解析—活性部位の FMN に及ぼす影響—

○梅名 泰史¹、頼田 和子²、松岡 毅³、阿部 真琴¹、喜田 昭子¹、福井 清²、森本 幸生¹ (¹京大原子炉、²徳島大酵素研、³旭化成ファーマ)

乳酸酸化酵素 (LOX) は 1 分子の FMN が分子量 45KDa のポリペプチド鎖と非共有結合したフラビン蛋白質で、乳酸からピルビン酸への酸化反応を触媒する。我々はフラビン蛋白質の構造機能相関の解明を目指しているが、今回ヒドロキシ酸の酸化を司るフラビン酵素ファミリーに属する本酵素を取り上げ、活性中心の FMN 近傍に存在する R181 の役割についてそのメチオニン変異体 (R181M-LOX) の 1.8 Å 分解能の X 線結晶構造を元に考察した。R181M-LOX は同族酵素の flavocytochrome b2 の FMN 結合ドメインや glycolate oxidase (GLO) と同様に α ・ β 繰り返し構造による典型的な TIM バレル構造をとり、FMN は平行 β 構造でつくられた内側のバレルの片方の箍 (端) のあたりで R268, H265, Y146, Y40, D184, R181 などのアミノ酸残基によって囲まれている。野生型 LOX では、FMN のイソアロキサジン環に平行に位置する R268 によって R181 とのシッフ塩基を形成していると考えられるが、M181 変異体では、そのような塩基対は見いだせなかった。さらに R268 のグアニジニウム基とイソアロキサジン環のキシレン部位との距離は約 0.5 Å 短いと考えられた。我々は既に R181M-LOX の酵素活性が低下していることを報告しており、本酵素による基質の乳酸の還元半反応は R181 および R268 によるイソアロキサジン環との電子授受により制御されると考えられる。

Y.Umena, K.Yorita, T.Matsuoka, M.Abe, A.Kita, K.Fukui and Y.Morimoto : Structure analysis of Lactate oxidase R181M mutant - Effects to the FMN active site -

2P011

高度好熱菌由来 4-oxalocrotonate tautomerase の結晶構造

○木田 宗志¹、喜田 昭子¹、三木 邦夫^{1,2} (¹京大・院理・化学、²理研・播磨)

4-oxalocrotonate tautomerase (4-OT) は、2-oxo-4-hexenedioate から中間体 2-hydroxy-2,4-hexadienedioate を経て 2-oxo-3-hexenedioate に至る異性化反応を触媒する酵素である。*Pseudomonas putida* mt-2 の芳香環分解過程において発見され、その反応には N 末端のプロリン残基が求核性の一般塩基触媒として働くと考えられている。4-OT の単量体のアミノ酸残基数は 62 で、六量体を形成して機能する。本研究では、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 4-OT (tt4-OT) の結晶構造を 1.65 Å 分解能で決定した。本酵素は、*Pseudomonas putida* mt-2 由来 4-OT (pp4-OT) と 39% の相同性がある。しかし、触媒残基と考えられているプロリン残基が存在せず、N 末端はバリン残基となっているため、その触媒機構に興味を持たれる。tt4-OT の結晶は、硫酸マグネシウムを主な沈殿剤として用いることで得られた。回折実験は SPring-8 BL45XU で行い、構造決定は pp4-OT をモデルとした分子置換法で行った。結晶構造から pp4-OT と同様の基質ポケットが tt4-OT にも存在し、発現時に除去されなかったと考えられる開始メチオニン残基が、N 末端バリン残基に結合して基質ポケット内に存在していた。現在、阻害剤複合体の結晶構造を決定するための実験を進めている。

H.Kida, A.Kita and K.Miki : Crystal structure of 4-oxalocrotonate tautomerase from *Thermus thermophilus* HB8

2P010

P. horikoshii 由来 L-プロリン脱水素酵素の X 線結晶構造解析

○津下 英明¹、川上 竜巳²、櫻庭 春彦²、吾郷 日出夫³、宮野 雅司³、安藝 謙嗣¹、勝沼 信彦^{1,2}、大島 敏久² (¹徳島文理大学・健康科学研究所、²徳島大学・工学部、³理研播磨・構造生物物理)

我々は近年 *Pyrococcus* および *Thermococcus* には 2 種類の L-プロリン脱水素酵素が存在することを見いだした。PDH2 は 4 種類のサブユニットからなるのに対して、PDH1 は 2 種類の α サブユニット 56Kda と β サブユニット 42Kda からなる。 β サブユニットは 1 次構造上、既に構造の明らかなモノマー型のサルコシンオキシダーゼと相同性がある。一方 α サブユニットは全体としての一次構造の類似性はなく 3 次構造は不明であった。我々は PDH 1 の結晶構造を明らかにするために大腸菌で 2 つの ORF の共発現系を作成し、複合体として精製および結晶化を行い、黄色の 6 角錐バイピラミッド型の結晶を得た。この結晶を用いて高エネ研 NW12 で native と重原子データを取得して 2.8 Å 分解能で MIR 法で構造解析した。 β サブユニットは予想されたようにその内部に FAD を結合している。 α サブユニットはその内部に Rossmann fold を持ち予想されなかった ATP がそこに結合していた。また α と β サブユニットの分子境界に FMN が結合している。この FMN を「のり」として用い、また他のタンパク質分子間相互作用によりこのダイマーは緊密に結合している。さらに α サブユニットどうしの分子間 SS 結合で (α β)₄ 八量体を形成している。 α サブユニット内部では C413-C452 が SS 結合を形成しそこに non-heme 鉄が結合していることが明らかになった。プロリンはサルコシンオキシダーゼと同様に FAD イソアロキサジン環近傍に結合すると考えられる。FAD, FMN と鉄のそれぞれの距離は 12 オングストローム程度ありプロリンからの電子の流れに興味を持たれる。この構造は P450 還元酵素にみられる diflavin 酵素と比べてタンパク構造および diflavin の位置関係ともに異なっている点からも注目される。

H.Tsuge, R.Kawakami, H. Sakuraba, H. Ago, M. Miyano, K. Aki, N. Katunuma and T. Ohshima : Novel crystal structure of L-proline dehydrogenase from *P. horikoshii*

2P012

高度好熱菌由来 amino acid transporter の ATP 結合ドメインの結晶構造

○秋山 信彦¹、喜田 昭子¹、三木 邦夫^{1,2} (¹京大・院理・化学、²理研・播磨)

ABC transporter は、2 つの膜に組み込まれた領域と 2 つの ATP 結合領域からなり、ATP のエネルギーに依存して、膜を介した様々な物質輸送を行う。本研究では、*Thermus thermophilus* HB8 由来の、amino acid transporter の ATP 結合ドメインの結晶構造を決定した。本タンパク質は、ABC transporter family に属する *Salmonella typhimurium* 由来の histidine permease の ATP 結合サブユニットである HisP と 51% の相同性がある。また、ATP 結合タンパク質によく保存されている、Walker-A モチーフ、Walker-B モチーフ、Signature モチーフ、D-loop、Q-loop も保存されている。ヌクレオチド非結合の条件で行った結晶化では、PEG200 を主たる沈殿剤として結晶を得ることができた。回折実験は SPring-8 BL45XU で行い、1.4 Å 分解能のデータを収集した。構造解析は、HisP をサーチモデルとする分子置換法によって行った。本タンパク質には、HisP の ATP 結合部位付近の 1 本の β -strand と 1 部のループが欠落している。そのためか、HisP と同様に結晶中での dimer 形成が見られるものの、その様式は異なっている。また、dimer の接触面に ATP 結合ポケットと思われる部位が存在しており、現在、ATP, ADP, AMPNP などのヌクレオチドを結合した構造解析を計画している。

N.Akiyama, A.Kita and K.Miki : Crystal structure of ATP-binding domain of amino acid transporter from *Thermus thermophilus* HB8