



乳酸酸化酵素・基質複合体の常温結晶構造解析

森本 幸生¹, 伊中 浩治², 梅名 泰史³

1 京都大学, 2 丸和栄養食品, 3 名古屋大学

キーワード：乳酸酸化酵素, 常温蛋白質構造解析, 活性部位 pH 依存性, 結晶内構造変化

1. 背景と研究目的

乳酸酸化酵素(LOX)は分子内に FMN を持ち、乳酸をピルビン酸へ変換する酸化還元酵素である。これまで、この酵素反応機構を構造学的に解明を行ってきた。その中では、基質フリー体(1)、乳酸複合体、ピルビン酸複合体の構造解析を完了してきたが (2)、そこでは活性部位周辺の His, Lys, Tyr などのアミノ酸の変位が見られた。pH4.5 での凍結結晶では His265 が FMN に対して下向きになっているが、酵素反応がわずかに上昇する pH5.5 結晶では上を向いている可能性が出てきた。そのため pH4.5 および pH5.5 での結晶のデータ収集を行う。

2. 実験内容

LOX 試料を pH4.5 で結晶を作成しあいち SR サイトへ持ち込みビームライン横でキャプラリーに封入し回折実験に用いた。露出条件は、波長 0.76 Å, 振動角 0.25 度, 0.25 秒露光で 1800 フレーム測定である。XDS での処理を行って構造因子データを得た。

得られた回折データは LOX-pH4.5, pH5.5, pH5.5(VD)の 3 種であった。

このうち VD は蒸気拡散法によって作成した結晶である。

3. 結果および考察

#1 LOX pH4.5 crystal, 132.899 132.899 91.877 90.000 90.000 90.000 I4

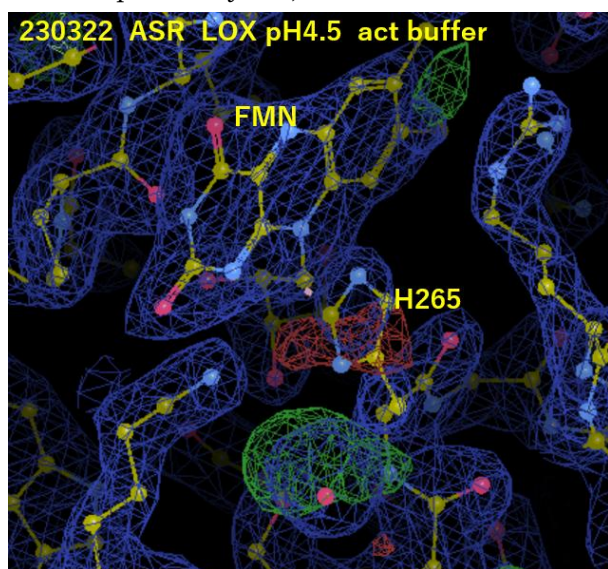


図1 LOX pH4.5 2Fo-Fc map

CCP4/molrep, rigid, refmac による精密化を行い、R/Rfree = 24.64/29.91 (2.2 Å)の構造を得た。

図1に FMN 前 H265 の位置と電子密度を示した。

H265 は上を向けてモデリングしているが、その部分は赤色のマイナスフーリエマップとなっており、逆に下方には緑色の差フーリエマップがある。従ってこれまで同様、H265 は下向きの配置が適切であると判断できた。一方、pH5.5 結晶は、回折データの統計値が悪く、結晶の質が良くないことがわかった。pH5.5 の結晶調製では酢酸ではなくクエン酸緩衝液を用いれば結晶が改善される可能性があるので、次回以降は試みたい。

4. 参考文献

1. Y.Umena, et.al., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **350**, 249-256 (2006)
2. S.J.Li, et.al., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **358**, 1002-1007 (2007)
3. N.Furubayashi, et.al., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **568**, 131-135 (2021)