



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(3)。常温結晶場において基質ソーキングすることにより、これらの構造変化が起こることから、あいち SR-BL2S1 ビームラインにおいて、常温での基質複合体の構造解析を行った。

2. 実験内容

LOX 試料を pH4.5, pH5.5 での結晶を作成し、基質フリーの状態での常温測定を行った。用意した結晶は 8 個でそのうち 4 個の結晶の測定を行った。露出条件は、波長 0.76 Å, 振動角 0.25 度, 0.25 秒露光で 1160 フレーム測定である。そのうち 2 セットは回折斑点が貧弱で構造因子処理ができなかったが、pH4.5 および pH5.5 のデータセットを得ることができた。

3. 結果および考察

#1 LOX pH4.5 crystal, 134.31, 134.31, 93.84, I4

XDS での処理を行ったが、1160 フレーム中 800 フレームのデータ処理を行って精密化を行った。CCP4/molrep, rigid, refmac, Phenix/find water+ refine を行って R/Rfree = 22.91/25.13 (1.6 Å)の構造を得た (Fig.1)。

#3 LOX pH5.5 crystal, 133.93, 133.93, 93.26, I4

XDS では処理ができず mosflm を使って 700 フレームのデータを得て精密化を行った。

CCP4/molrep, rigid, refmac, Phenix/find water+ refine を行って R/Rfree = 19.57/22.57 (2.0 Å)(Fig.2)

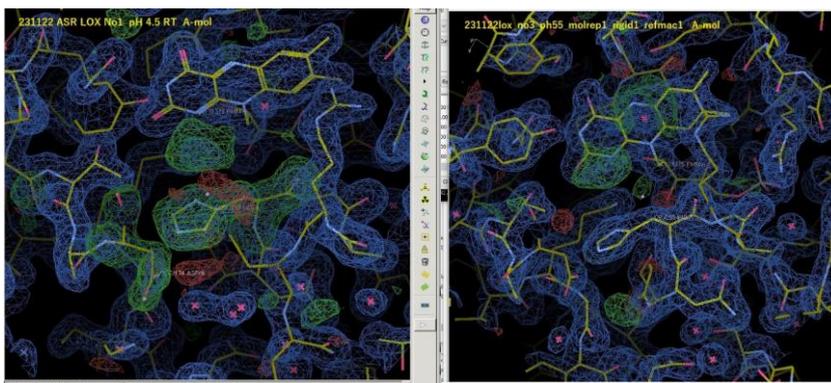


Fig.1 #1 pH4.5 His265

Fig.2 #3 pH5.3 His265

質が結合するまでスタンバイ状態にあることが明らかとなった。

Fig1,2 に#1,#3 の電子密度を示している。それぞれ LOX の A 分子のみを示した。Fig.1 の His256, D174 部分は緑のオミットマップで表示している。図中央付近の His 残基は、上方にある FMN から遠く (図中下方方向) へ向いていることがわかる。FMN 前に乳酸が結合すると、この His265 は上方を向くことになるが(3)、基質フリー状態では、His265 は下方に位置し、乳酸基

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)