



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)。これらは凍結状態の結晶構造であり常温結晶での構造比較が必須であったため、キャピラリーに封入した LOX 結晶の常温での結晶構造解析を行った。

2. 実験内容

LOX 試料を pH4.5 で結晶を作成し、キャピラリーに封入し、常温測定を行った。用意した結晶は2個で、双方とも回折データを得ることができた。ただし、これまで得ていた結晶系(I4)とは異なり、P42であった。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。通常のデータ処理(XDS)では構造因子が得られず、損傷の大きな測定後半のフレームデータを棄却し、Dials によって処理を行った。

3. 結果および考察

#1 LOX pH4.5 crystal, 133.609 133.609 91.447 90.000 90.000 90.000 P42

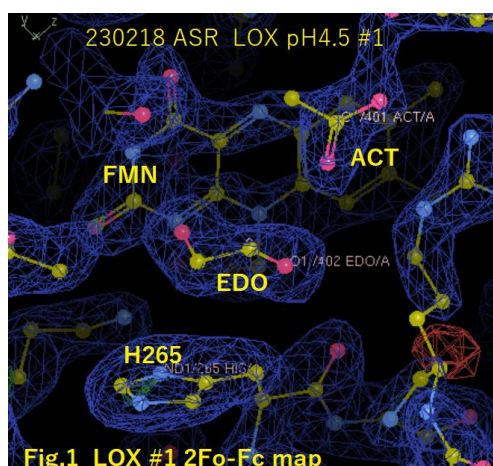
Dials を用いて 800 フレームのデータ処理を行って精密化を行った。CCP4/molrep, rigid, refmac による精密化を行ったが、R/Rfree = 47.62/50.22 (2.0 Å)となり、構造精度は低い。

2 個目の結晶からは有意なデータ処理を行うことができなかった。

#1 の結晶の構造は図 1 のようであり、これまでの凍結結晶の構造のように、H265 は下向きであり、FMN 前に酢酸 (ACT) が基質の代わりに存在する。また沈殿剤であるエチレングリコール (EDO) が、後ほど明らかになった H265 の上方位置に存在していることが明らかとなり、このことは、これまでの凍結状態の構造と変わらない。

ただし、パッキングについては、P42 格子では、分子間の隙間が大きすぎるので、これまでの I4 と同様、非対称単位中にさらに 2 分子存在することが考えられた。このことが精密化の R 値が下がらない原因であると考えられる。

結晶化条件を変えて、これまでの I4 結晶を作成する必要がある。



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)