実験番号：2022N6006（2 シフト）

BL2S1

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 pH5.5 での結晶のデータ収集を行う。

2. 実験内容

LOX 試料を pH5.5 で結晶を作成し、キャピラリーに封入し、あいち SR サイトへ輸送した。しかしながら酢酸緩衝液で調整した pH5.5 結晶は図 1 右にあるように、ひび割れが多く、データ収集は困難であった。複数個の結晶の回折実験を行い、その中でも pH4.5 結晶ではこれまで同様の空間群、格子定数で回折データを得ることができた。

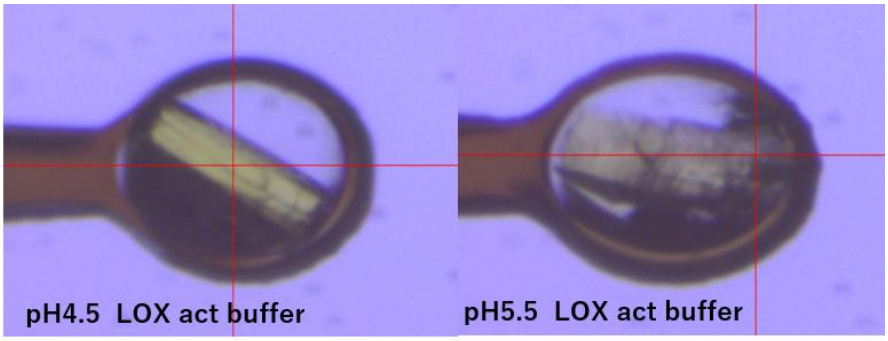

図 1　LOX結晶　pH4.5(左）,pH5.5（右）

露出条件は、波長 0.76Å，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。

3. 結果および考察

#1 LOX pH4.5 crystal, 133.904 133.904 93.386　90.000　90.000　90.000　I4

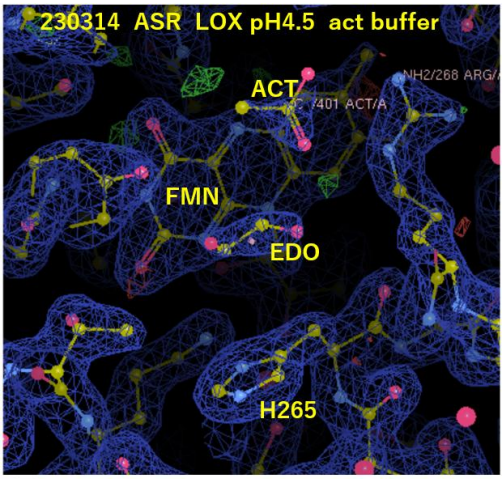

図 2　LOX　pH4.5　2Fo-Fc map

CCP4/molrep, rigid, refmac による精密化を行い、R/Rfree = 16.49/20.49 (2.0Å)の構造を得た。

図 2 に FMN 前の酢酸(ACT)、エチレングリコール(EDO)、H265 の位置と電子密度を示した。pH4.5 の前回(N6003)と同様、H265 は下を向いており、酵素構造そのものは、ほとんど変化がなかった。パッキングも I4 であり、以前から解析されているものと同じであった。このことが R 値を劇的に改善させ適切な解析ができたと考えている。

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)