

# サリチル酸水酸化酵素の高分解能結晶構造解析 Crystal structure analysis of salicylate hydroxylase

森本幸生<sup>1,\*</sup>, 上村拓也<sup>1</sup>, 喜田昭子<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大学原子炉実験所, 〒590-0494 大阪府熊取町朝代西 2 丁目

Yukio Morimoto<sup>1,\*</sup>, Takuya Uemura<sup>1</sup> and Akiko Kita<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Reactor Institute, Kyoto University, Kumatori, Osaka, 590-0494, Japan

## 1 はじめに

*Pseudomonas putida* S-1 由来のサリチル酸水酸化酵素 (SALH) は、分子量 45kDa で分子内に FAD を持つ酵素である。基質であるサリチル酸(*o*-ヒドロキシベンゼン塩)を水酸化し解毒してカテコールを産出する一原子酸素添加反応を触媒する。この反応には FAD を介した水酸化機構が提案されているが、類似基質である *p*-ヒドロキシベンゼン塩ではその反応が起らない。一方この *p*-ヒドロキシベンゼン塩を基質とする水酸化酵素(PHBH)はカルボキシル基を残したまま水酸基の付加を行う。本課題申請の SALH は水酸基の付加とカルボキシル基の脱離を伴ってカテコールを産生するが、ここで付加および脱離を同時に行うのか、カルボキシル基の脱炭酸反応を直接行うのか、その酵素反応の詳細は明らかではない。これは FAD および基質結合部位を取り巻く蛋白質構造に PHBH とは異なる特徴があるものと考えられる。この類似酵素にはない反応経路を明らかにするため、ホロ体酵素の構造解析を進める。また FAD はゆるく蛋白質分子内に保持されていると考えられ FAD を保持する構造にも興味を持たれる。

## 2 実験

従来 *P putida* S-1 株から直接酵素分子を単離精製、結晶化を進めていたが、本課題の高分解能解析、また中性子解析につなげるためにも、大腸菌発現系での試料作製を行った。酵素分子を発現するプラスミドを大腸菌に組み込み、大量培養、精製を行った。結晶化には硫酸を沈殿剤として、かつ分子内から外れやすくなる FAD を等量添加し結晶化を行った。酵素反応を考察する上で基質であるサリチル酸の所在も必要であるため、Native および基質複合体の結晶化を進め、それぞれ回折実験に適する結晶を得た。

回折実験は、BL17A を用い、波長 0.98Å、カメラ長 250 あるいは 350mm で測定を行った。16 種類の結晶を用いて回折実験を行い、分解能のチェック、結晶のひび割れなどを考慮し、8 種類のデータセットを得て、次に示す 4 種の結晶から有意なデータを得ることができた。データ収集、スケーリングにはビームライン設置の HKL2000 を用いた。また初期位相の決定には Molrep/CCP4i を用いた。

表 1 データ統計値

Crystals	Resolution	Rmeas	CC
C18-1-2	2.96-2.75	0.190	0.998
C18-5	3.24-2.94	0.232	0.996
C22-1	3.24-2.94	0.295	0.994
C22-4-2	3.24-2.94	0.303	0.995

## 3 結果および考察

上記回折データの中から分解能が比較的高く、かつ FAD およびサリチル酸の電子密度が確認できたものから精密化を進め、以下のような全体構造と FAD、サリチル酸の位置を決定した。

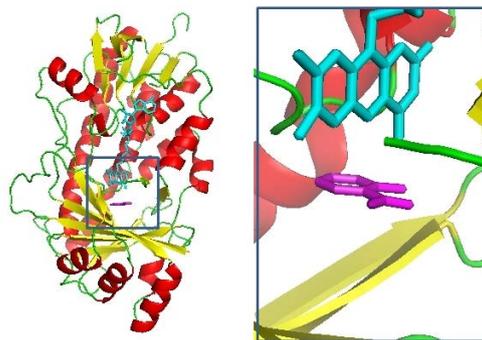


図 1 : 全体構造と FAD、サリチル酸拡大図  
これまでの構造解析では FAD が抜けたアポ体の構造が得られていたが、一部データではイソアロキサン環の電子密度が確認できた。

## 4 まとめ

基質部分の脱炭酸と水酸化付加機能を考察するには周辺アミノ酸の寄与も必要であり、さらに高分解能のデータを得るため結晶化を進めている。

## 謝辞

試料作製にあたり原子力機構安達基泰・黒木良太両博士の協力を得ました。ここに感謝致します。

## 成果

1. サリチル酸水酸化酵素・基質複合体の結晶構造解析、日本蛋白質科学会 徳島 2015

\* morimoto@rri.kyoto-u.ac.jp