

システイントリプトフィルキノン依存性酸化酵素、L-リシン  $\epsilon$  酸化酵素の  
構造学的研究Structural study of L-lysine- $\epsilon$ -oxidase, a cysteine tryptophylquinone-dependent  
oxidase岡崎誠司<sup>1,2,\*</sup>, 中野祥吾<sup>1,2</sup>, 浅野泰久<sup>1,2</sup><sup>1</sup>富山県立大学生物工学研究センター, 〒939-0398 富山県射水市黒河 5180<sup>2</sup>JST-ERATO 浅野酵素活性分子プロジェクト, 〒939-0398 富山県射水市黒河 5180

## 1 はじめに

海洋細菌 *Marinomonas mediterranea* 由来の L-リシン  $\epsilon$  酸化酵素 (LodA, E.C. 1.4.3.20) は、L-リシンの  $\epsilon$  位の酸化的脱アミノ化反応を触媒する L-アミノ酸酸化酵素である。LodA は、補欠分子族として FAD ではなくキノンを有することが示唆されている新規な L-アミノ酸酸化酵素である。しかし、詳細な構造が報告されておらず、構造の解明が期待されている。また LodA はその基質特異性の厳密さより、様々なアミノ酸を含む溶液中における L-リシンの定量に利用できる産業上有用な酵素でもある。本研究では、LodA の X 線結晶構造解析による構造機能相関の解明を目的とした。

## 2 実験

*M. mediterranea* を用いて LodA を発現させ、精製した後、ヨウ素を含んだ結晶化条件で共結晶を得、実験室系の X 線回折装置を用いて 2.3 Å 分解能の回折強度データを 720° 分収集し、ヨウ素の異常散乱シグナルを利用した単波長異常分散法により位相の決定及び構造解析に成功した[1]。1.94 Å 分解能の native 構造のデータ収集は KEK-PF の BL-1A で行った。また、75mM の L-リシンを含んだリザーバー溶液に 3 分間結晶をソーキングすることにより L-リシン複合体の結晶を得ることに成功し、その L-リシン複合体構造の 1.99 Å 分解能のデータ収集は KEK-PF の BL-17A で行った。

## 3 結果および考察

LodA の構造解析の結果、 $\alpha$  ヘリックスと  $\beta$  バレルと逆平行  $\beta$  シートにより構成されている本体から、逆平行  $\beta$  シートを含む 2 つの arm が突き出ているモノマー構造を有することが明らかとなった。また、Trp581 と Cys516 がシステイントリプトフィルキノン(CTQ)というビルトイン型キノン補酵素を形成していることが電子密度より示唆された。また、L-Lys 複合体の電子密度より、L-Lys の  $\epsilon$  位のアミノ基と CTQ のカルボニル基の C6 原子が生成物シッフ塩基中間体を形成していることが示唆された(図 1)。直接基質が CTQ に付加した構造を観察できたことに

より、CTQ が触媒反応において補酵素として機能することが示唆された。さらに、基質の L-Lys の特異的な結合様式が明らかとされ、LodA の L-Lys に対する高い基質特異性の構造学的基盤が明らかとなった。

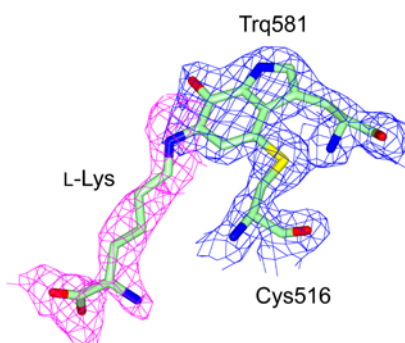


図 1 : L-リシン (マゼンタ色のメッシュで電子密度を示す)と CTQ(青色のメッシュで電子密度を示す)のシッフ塩基中間体。

## 4 まとめ

本研究によって、システイントリプトフィルキノン補酵素を有する酸化酵素の存在が初めて明らかとなった。

## 謝辞

PF のビームラインスタッフの方々には大変お世話になりました。深く感謝いたします。

## 参考文献

- [1] S. Okazaki *et al.*, *J. Biochem* **154**, 233-236 (2013).
- [2] S. Nakano *et al.*, *J. Biol. Chem.* **289**, 10445-10454 (2014).
- [3] K. Yasukawa *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 4428-4431 (2014).

## 成果

本課題(2012U005, 2013G004)により、L-スレオニン脱水酵素[2]や R 選択的  $\alpha$  メチルベンジルアミン酸化酵素[3]の構造学的研究に関する成果も得られたことを追記する。

\* okazaki@pu-toyama.ac.jp