

新規な二機能性アミノ酸酸化酵素の構造解析 Crystallography of a novel bifunctional amino acid oxidase/oxygenase

林到炫, 金山尚均, 荒川孝俊, 伏信進矢*

東京大学大学院農学生命科学研究科、〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Do-hyun Im, Naohito Kanayama, Takatoshi Arakawa and Shinya Fushinobu*

Department of Biotechnology, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

1 はじめに

アミノ酸の酸化酵素は、種々の発色法とカップリングさせることにより、基質特異的なアミノ酸の定量ができるため、病気の診断キット等の様々な用途に利用されている。また、アミノ酸を含む様々なキラル化合物の合成への利用も期待できる。アミノ酸の酸化酵素には、大きく分けて、アミノ酸オキシダーゼとアミノ酸モノオキシゲナーゼがあり、どちらも主にフラビン含有酵素である。アミノ酸オキシダーゼは基質を還元してイミノ酸にした後にアミノ基が加水分解されることにより（脱アミノ化）、 α -ケト酸とアンモニアを生成する。一方、アミノ酸モノオキシゲナーゼは二原子酸素の片方の酸素原子を基質に付加して脱炭酸の後にアミド化合物を生成する。

岩手大学の磯部らにより *Pseudomonas* sp. AIU813 から発見された新規酵素 L-アミノ酸オキシダーゼ/モノオキシゲナーゼ(L-AAO/MOG)[1]は、基質リジンの 92%をオキシゲナーゼ反応、8%をオキシダーゼ反応で酸化する二機能酵素である。リジンが最もよい基質であり、アルギニンおよびオルニチンも基質となる。また、pCMB 処理によりオキシダーゼ活性は約5倍に上昇しオキシゲナーゼ活性はほぼ消失する。さらに変異体の解析により、L-AAO/MOG の C254I 変異体は同様にオキシダーゼになることが明らかになっている。本研究では、立体構造解析により、このユニークな活性スイッチ機構を明らかにすることを本研究の目的とする。

2 実験

L-AAO/MOG の結晶化を行い、KEK-PF の構造生物学ビームラインを利用して回折測定実験を行った。また、様々な基質との複合体結晶のデータ測定も行った。

3 結果および考察

L-AAO/MOG の基質フリー状態の結晶構造を Se-SAD 法を用いて分解能 1.9 Å で決定した。L-AAO/MOG は、FAD 結合ドメイン、ヘリカルドメイン、基質結合ドメイン、の3つのドメインからなる。L-AAO/MOG の活性中心には補酵素 FAD が存在し、

Trp418、Phe473、Trp516 の芳香環の側鎖により aromatic cage とよばれる基質結合ポケットが形成されていた（図1）。Trp516 の裏側に Cy254 が存在し、この残基の pCMB による修飾および Ile への変異により基質結合ポケットの構造が変化し、オキシダーゼへの変換が起こると推測された。

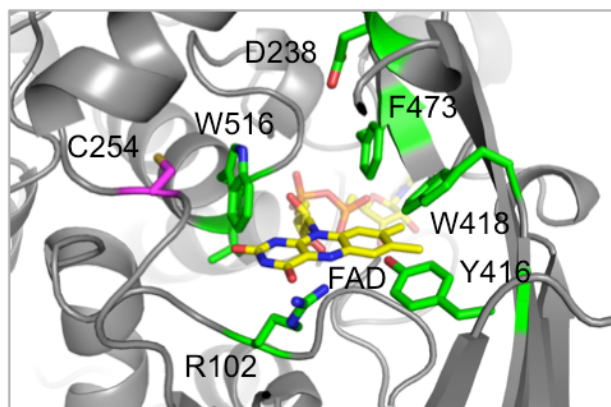


図1 : L-AAO/MOG の基質結合部位

4 まとめ

現時点で、基質フリー構造の他にも、リジン、アルギニン、オルニチンとの複合体構造を得ている。さらに、活性を変化させる変異体も得ており、これらの変異体との基質複合体の構造決定も進める予定である。

謝辞

実験をサポートして下さった KEK および PF のみなさん、共同研究者の若木高善先生、富山県大および ERATO/JST の松井大亮博士、浅野泰久先生、岩手大の磯部公安先生に感謝いたします。

参考文献

[1] Isobe et al. *J. Biosci. Bioeng.* **114**, 257 (2012)

成果

1 Matsui et al., *FEBS Open Bio* **4**, 220 (2014)

* asfushi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp