

## 2-オキソ酸：フェレドキシン酸化還元酵素の構造解析 Crystallography of 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductase

Yan Zhen, 伏信進矢\*, 荒川孝俊, 若木高善

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

Yan Zhen, Shinya Fushinobu\*, Takatoshi Arakawa and Takayoshi Wakagi

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

### 1 はじめに

ピルビン酸からアセチル CoA を生ずる反応は解糖から TCA サイクルへ繋がる重要なステップであり、一般的な生物では分子量数百万の複数のコンポーネントからなる巨大なピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体がこの触媒を担う。一方古細菌や一部の細菌ではフェレドキシンを電子受容体とする分子量 10 万程度の比較的単純な酵素である 2-オキソ酸：フェレドキシン酸化還元酵素(OFOR)がこの反応を担う。

本研究では超好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来の OFOR の立体構造解析を目指した。我々はこれまで、本菌で主に発現している OFOR である StOFOR1 を中心に研究を行ってきた[1, 2]。結晶化も再現性が悪いものの成功しており、2.5 Å 分解能の回折データを得ている。さらに、本菌のゲノム中の OFOR ホモログ(StOFOR2)の発現系も構築した。本研究では、StOFOR1 と StOFOR2 の結晶構造を決定し、変異体解析と合わせて、OFOR の反応機構の詳細を明らかにすることを目的とした。

### 2 実験

StOFOR1 と StOFOR2 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。

### 3 結果および考察

StOFOR2 の結晶は構造解析に適しており、再現よく結晶化した。本研究の対象とした *S. tokodaii* 由来の OFOR と、唯一の構造既知の OFOR である *Desulfovibrio africanus* 由来 OFOR の相同性は低く部分的に 20% 台の配列同一性しか持たないために、分子置換法が適用できなかった。そこで、StOFOR2 の SeMet 置換体の結晶化も試したが、同様の条件で得られることが分かった。結果的に、Se-SAD 法により位相決定し、分解能 2.1 Å で StOFOR2 の立体構造決定に成功した。また、ホモログである StOFOR1 の構造も、以前測定していた 2.5 Å 分解能のデータを用いて分子置換で決定することに成功した。

### 4 まとめ

StOFOR2 と StOFOR1 の結晶構造を決定することに成功した。補酵素であるチアミンニリン酸 (TPP)、FAD、鉄硫黄クラスターの電子密度もはっきりと観測され、活性中心から電子受容体である Fd への電子移動の経路が特定された。さらに、これらの酵素には鉄硫黄クラスター付近にポケットが存在し、モデリングにより、Fd の結合状態を推定することができた。

### 謝辞

実験をサポートして下さった KEK および PF のみなさんに感謝いたします。本成果は、文部科学省創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業の支援により得られました。

### 参考文献

- [1] Zhang et al., *J. Biochem.* **120**, 587 (1996)
- [2] Yan et al., *BBA* **1844**, 736 (2014)

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