

***Azotobacter vinelandii* 由来**  
**新規 Gfo/Idh/MocA ファミリー酵素の構造解析**  
**Structural analysis of a novel Gfo/Idh/MocA family**  
**enzyme from *Azotobacter vinelandii*.**

深野 和紘 佐々木 康幸 矢嶋 俊介  
東京農業大学 応用生物科学部 バイオサイエンス学科

Gfo/Idh/MocA ファミリーは、NADP もしくは NAD を利用する酸化還元酵素の一群である。本ファミリーには、グルコース-フルクトースオキシドレダクターゼやイノシトール-2-デヒドロゲナーゼが含まれる。本ファミリーに属する酵素の立体構造の報告は既に多数成されているが、基質と酵素との相互作用が判別出来る構造は報告されていなかった。最近我々は本ファミリーに属する酵素、L-グルコースデヒドロゲナーゼ (LgdA) と L-グルコースとの複合体の構造解析に成功し、相互作用残基を明らかにした。この構造を基にデータベースを検索すると、興味深いことに、LgdA との配列相同性が 20%前後であるものの、基質相互作用残基の多くが保存された機能未知酵素の一群を発見した。その一群の酵素の1つが、今回解析対象とした AVIDH である。AVIDH は、L-グルコースに対してはほとんど活性を示さなかったものの、*myo*-inositol に対して高い活性を示した。一方、LgdA は L-グルコースと *myo*-inositol に対して同等の活性を示す。そこで、AVIDH と LgdA とのそれぞれについて、*myo*-inositol を結合した構造を決定し、基質との相互作用の比較を行った。

AVIDH は pET システムを用いて大腸菌で発現させ Ni カラムにて精製した。AVIDH の apo 体はハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化した。AVIDH の apo 体結晶の回折データ収集は BL-5A において行い、構造決定は Molrep を用いた分子置換法により行った。AVIDH/NAD/*myo*-inositol 複合体結晶は共結晶化によって得た。この複合体結晶は、先の割れた細長い柱状の形をしていたが、BL-17A の細いビームを利用することで解析可能なデータを得ることが出来た。LgdA/NAD/*myo*-inositol 複合体結晶は、apo 結晶をリガンド溶液にソーキングすることで得た。この結晶の回折データ収集は BL-5A において行った。

いずれの複合体においても、*myo*-inositol の電子密度を明瞭に観察できた。その結果、LgdA と AVIDH では *myo*-inositol の結合向きが異なることが分かり、活性部位の入り口の立体障害が基質特異性の違いに重要であることが示唆された。