

FAD 誘導体で再構成した D-アミノ酸酸化酵素の研究

Structural studies of D-amino acid oxidase reconstructed with FAD analogue

宮原郁子¹・瀬戸山千秋²・二科安三³・神谷信夫^{1,4}

¹大阪市大院理・²熊大院生命科学分子酵素化学・

³熊大院生命科学構造機能解析学・⁴大阪市大複合先端研

D-アミノ酸酸化酵素(DAO)は、FAD を補酵素とするフラビン酵素であり、D-アミノ酸を酸化して α -イミノ酸にする反応を触媒する。ロゼオフラビン(RoF)(図1)は抗菌作用をもつ色素として発見された天然に存在するフラビンであり、DAO のアポ酵素に補酵素型の RoFAD を添加しても phenylglycine の酸化作用がないことが報告されている¹⁾。

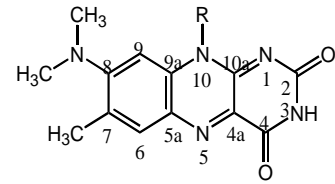


図1. RoF

8-dimethylamino 基が DAO の反応性にどのように影響するかを様々な 8*N*-alkyl アナログを用いて検討した結果、DAO の反応性は置換基がもたらす酸化還元電位の影響に加えて、酵素に結合する際の立体障害が関係している可能性があると考えられた²⁾。

本研究では実際に人工 FAD の結合様式をX線構造解析で確認するとともに、酸化力が弱まった再構成 DAO を用いた基質複合体結晶の作成を検討した。RoF を含む異なる 8*N*-alkyl アナログ 4 種類についての再構成 DAO について基質類似体である安息香酸複合体結晶を得ることができ、すべての結晶で 1.8 Å 分解能の回折データを収集することができた。これらの構造決定は、既に構造が明らかになっている native な DAO(1VE9)の座標を初期モデルとし、分子置換法により位相を決定し、構造解析を行った。いずれの再構成 DAO も native な DAO の安息香酸複合体と全体構造は非常によく似ていた。Arg283 は基質アミノ酸のカルボキシル基と塩橋を作って認識する重要な残基と考えられおり、解析した結晶構造中では安息香酸のカルボキシル基と塩橋を作っている。Arg283 の側鎖は丁度フラビンの N8 に付近に位置するので、人工 FAD の 8*N*-メチル基は衝突を避けるように回転していることが分かった。

¹⁾ Simon Grill, et.al, *J. Bacteriol.*, **190**, 1546–1553 (2008)

²⁾ 引用文献: 芳賀修、佐藤恭介、二科安三 熊本大学医学部保健学科 検査技術科学専攻 2010 年度リサーチトレーニング報告集 (2011)