

(様式第5号)

実施課題名 イネ由来乳酸脱水素酵素の結晶構造解析

Molecular structure determination of Lactate dehydrogenase from *Oryza sativa* by X-ray crystallography

著者・共著者 氏名 山下健一

English YAMASHITA, Kenichi

著者・共著者 所属 独立行政法人 産業技術総合研究所

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

- ※1 先端創生利用(長期タイプ、長期トライアルユース)課題は、実施課題名の末尾に期を表す(I)、(II)、(III)を追記して下さい。
- ※2 利用情報の開示が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後二年以内に研究成果公開(論文(査読付)の発表又は研究センターの研究成果公報で公表)が必要です。(トライアルユースを除く)

1. 概要 (注：結論を含めて下さい)

イネ由来乳酸脱水素酵素(LDH)のX線回折測定を行った。この酵素の分子構造はまだ報告されておらず、結晶化の方法から、抗凍結液の選択やその他結晶構造解析に供するための様々な条件探索もすべて新規の検討であった。今回の測定では、この酵素のX線回折像を得ることに成功することはできたが、同時に、抗凍結条件のさらなる最適化の必要性を示唆する結果となった。今回得られたX線回折像から、分解能はおよそ3.5 Åであった。また、結晶格子の形状からは、ウサギ由来のLDHとの類似性が示唆された。

(English)

X-ray diffraction measurement of Lactate dehydrogenase from *Oryza sativa* was carried out. The X-ray crystallography and crystallization have not been reported, we therefore also examined the various conditions and handling procedure for mounting the enzyme crystal in addition to X-ray diffraction measurement. The diffraction patterns of this enzyme crystal were successfully obtained, but these results indicated the necessary of additional consideration of conditions for obtaining better diffraction patterns and deciding the spatial structure. The resolution of obtained diffraction patterns were about 3.5 Å.

2. 背景と目的

乳酸脱水素酵素(L-Lactate dehydrogenase (LDH) [EC 1.1.1.27])は生体内において不可欠な酵素であり、様々な重要な働きを担っている。LDHは二量体または四量体で構成されており、ピルビン酸から乳酸及びその逆反応を立体特異的に触媒する。この反応は、嫌氣的ホモ乳酸発酵として知られており、NAD⁺を再生産することにより解糖系の反応を継続させる重要な役割がある。DaviesらはLDHによって生成された乳酸により細胞質を酸性にすることによってエタノールの生成が誘導されることを報告している。この反応の制御が異常を起こすと、アシドーシスを引き起こし死に至る。医学的な意義として、細胞溶解に対する高感度の指標となるマーカーとして知られており、肝臓の損傷をLDHの生成量で決定する。これまで、LDHに関する性質及び構造に対するいくつかの報告がなされており、ヒト、好熱性細菌、ピフィズス菌、マラリア原虫など、様々な種類の生物由来のLDHの構造的な分析がよく行われている。本研究において、イネ(*Oryza sativa* L. subsp. *japonica* cv. *nipponbare*)由来のLDH遺伝子について解析を進めたところ、2種類のアイソザイムの存在が明らかになった。これら二つのLDHの組換え体を作成し、酵素的性質を明らかにしたところ、両酵素は安定性において大きな違いが見られた。本研究では大腸菌を用いてリコンビナント酵素を作製し、性質決定および結晶化の条件検討を、本ビームタイムに先立って行っていた。

イネの葉から2種類のLDH遺伝子をクローニングして大腸菌を用いた組換えLDH AおよびBの発現系を構築し、精製リコンビナント酵素の性質決定を行った。その結果、LDH AとBは一次構造上の相同性は76%であるが、水溶液中での経時的安定性は、LDH Bの方が安定であった。また、 K_m や k_{cat} にも違いが認められたことから、両酵素は高次構造上何らかの相違があると思われた。また、トリプシンによる限定分解の結果から、LDH AとBではトリプシンに対する耐性が異なり、何らかの構造上の違いがあることが示された。

アイソザイム間での経時的安定性の違いをホモロジーモデリングによって明らかにしようと試みたが、顕著な違いは確認できなかった。そのため、経時的安定性の違いを解明するには、X線結晶構造解析を行い、それぞれの立体構造を比較することが必要となり、SAGA-LSにてX線結晶構造解析を行うこととなった。LDH Bの持つ高い安定性は工業的利用に有益であると共に、イネの組織(葉、根、茎など)におけるLDH AおよびLDH Bの発現量を調べることにより、LDHの生物学的な意義を解明できると期待される。

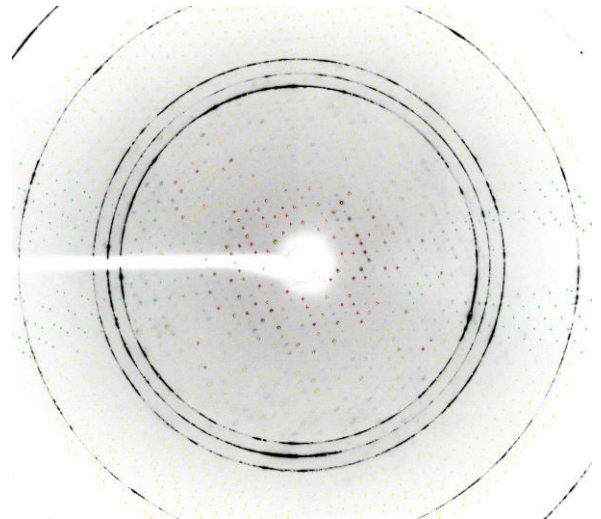
3. 実験内容(試料、実験方法、解析方法の説明)

前記酵素の単結晶は、上記拡散法にて準備した。母液からクライオループで結晶を拾い出し、抗凍結液(母液にポリエチレングリコールを加えて最終濃度20%としたもの)に浸した。再びその結晶を拾い出し、試料台(ゴニオメーター)に設置した。ただちにフラッシュクーラーにて冷却(100K)した。

その後、X線回折のデータを収集した。1フレーム当たりの回転角は1度で、180度分で1データセットとした。露光時間は20秒、X線の波長は1.5Åとした。

4. 実験結果と考察

測定終了後、得られたX線回折像を、iMosflmというソフトウェアで解析し、結晶格子に関するデータに関する検討を行った。その結果、最も可能性の高いと思われる結果として、 $a=61.3\text{\AA}$ 、 $b=79.4\text{\AA}$ 、 $c=82.1\text{\AA}$ 、 $\alpha=114.2^\circ$ 、 $\beta=95.0^\circ$ 、 $\gamma=112.7^\circ$ という、三斜晶としての値を得た。X線回折像の一例と、この解析結果から予測される点を重ねた図を右に示す。予測点と実際の回折点は概ね一致していることが確認できた。また、回折点から、この測定の分解能は、約3.5Åであった。



実際の測定では、クライオループで結晶を拾い出す、または抗凍結液に浸してフラッシュクーラーによる冷却を行う間に、結晶にひびが入ったりすることが多発し、さらには、アイスリングの映り込みを抑えることができないなど、抗凍結液の選択等、測定に至る前の段階の追加検討が必要であることが強く示唆された。また、得られた分解能が約3.5Å程度のものであり、このデータ群から、詳細な立体構造等を解析するには至らなかったものの、結晶格子からは、配列の類似性から構造の類似性を推察していたヒト由来とウサギ由来のLDHのうち、ウサギ由来のそれに近いものと推察している。

5. 今後の課題

酵素の結晶化そのものの条件検討に加え、抗凍結液等の検討を行うことで、回折像の分解能を上げることが必要である。目視での結晶の良し悪しと、X線回折像での良し悪しが必ずしも一致しないこと、フラッシュクーラーを用いた事前検討が施設外ではできないことなど不便な点もあり、研究の進め方そのものも含めた課題を残した。

一方、結果については、三斜晶であることが予測されることとなったため、次回の測定では撮影枚数を増やすほか、今回の測定結果でできるだけ、既知のLDHの立体構造との類似性から、本酵素の立体構造のあぶり出しを進める。

6. 参考文献

(該当なし)

7. 論文発表・特許(注:本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

(該当なし)

8. キーワード（注：試料及び実験方法を特定する用語を2～3）

乳酸脱水素酵素、結晶構造解析、X線回折

9. 研究成果公開について（注：※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消して下さい。また、論文（査読付）発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入して下さい（2012年度実施課題は2014年度末が期限となります。）

① **論文（査読付）発表の報告** （報告時期： **2015年 3月**）

（※追加の実験の実施が必要と考えております。）