

利用課題名：Lysylendopeptidase (LEP) の酵素活性発現機構の解明
Neutron diffraction study of Lysylendopeptidase (LEP)

1) 大西裕季 2) 正木武治 2) 田中伊知朗 2) 新村信雄 2)

Yuki OHNISHI, Takeharu MASAKI, Ichiro TANAKA, Nobuo NIIMURA

1) (株) 化研 2) 茨城大学

(要約2～3行) Lysylendopeptidase (LEP) は、高い酵素活性とアルカリ性までの広い pH 活性域をもつリジン残基特異的セリンプロテアーゼである。LEP の高い酵素活性を解明するため、このタンパク質の大型結晶化を行って中性子回折実験を行った。

キーワード : LEP、リジン残基特異的、セリンプロテアーゼ、水素・水和構造、大型結晶育成

1. 目的

Lysylendopeptidase (LEP) は、高い酵素活性とアルカリ性までの広い pH 活性域をもつリジン残基特異的セリンプロテアーゼである。LEP の高い酵素活性は、プロトンの挙動が大きな役割を担っていると考えられる。中性子回折実験を行い、タンパク質の水素・水和構造を解析して機能発現の仕組みを解明する。

2. 方法

茨城大学農学部（正木教授）より約 10mg 精製した Lysylendopeptidase (LEP) を用いて結晶化を行った。結晶が得られた条件から、大まかな結晶化相図を見積もり、それに基づいて大型結晶化を試みたところ、中性子回折実験に適用可能と思われるサイズの結晶（2x1x0.7 mm 程度）が得られた。昨年度のトライアルユースにては、今回得られた半分程度の体積の結晶を用いてテスト実験を行っており、回折像が得られることがわかっている。これらの情報を基にフルデータ測定を行う。

3. 研究成果

中性子露光とデータ取り込みを含めて 0.3° につき 2 時間で測定を行い、1 軸として 0.0 - 85.8° までのデータを収集した。回折像から今回のデータの分解能はおおよそ 2.0 Å 程度であることがわかった。現在、同条件で得られた結晶を用いた X 線回折実験の構造を初期モデルに中性子構造解析を進めている。

4. 結論・考察

結晶化相図を基に大型結晶化を行った結晶が、中性子回折実験に適応できることがわかった。分解能を上げるためにはさらに大型の結晶が必要であり、またこのタンパク質の詳細な機能解析には pH 変化や阻害剤などが結合した状態での水素水和構造が重要となってくるので、今後それらを含めて検討していく予定である。

5. 引用(参照)文献等

K.Ahmed, S.Chohnan, H.Ohashi, T.Hirata, T.Masaki, F.Sakiyama *J. Biosci. Bioeng*, **95** 27-34 (2003).

Nobuo Niimura, Shigeki Arai, Kazuo Kurihara, Toshiyuki Chatake, Ichiro Tanaka, and Robert Bau, *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 285-300 (2006).