The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Reaction mechanism of L-Iactate oxidase based on X-ray structural analysis |
| Author(s) | Umena, Yasufumi |
| Citation | 大阪大学, 2007, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/23006 |
| rights | |
| Note | |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【３】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 梅　名　泰　史（うめ　な　やす　ふみ） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（理　学） |
| 学　位　記　番　号 | 第　２１４９４　号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 19 年 6 月 25 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第４条第１項該当<br>理学研究科高分子科学専攻 |
| 学　位　論　文　名 | Reaction mechanism of L-lactate oxidase based on X-ray structural analysis<br>（X 線結晶構造に基づく L-乳酸酸化酵素の反応メカニズムの研究） |
| 論 文 審 査 委 員 | （主査）<br>教　授　月原　冨武<br>（副査）<br>教　授　奥山　健二　　准教授　鈴木　　守 |

## 論　文　内　容　の　要　旨

L-乳酸酸化酵素（L-lactate oxidase ; LOX）は、L-乳酸（$CH_3$-CH(OH)-COOH）をピルビン酸（$CH_3C(=O)$-COOH）まで酸化する酵素である。LOX は flavin mononucleotide（FMN）を補酵素をとして持ち、分子量約 41 kDa の好気性細菌 *Aerococcus viridans* 由来のフラビン酵素である。LOX は基質特異性が高いため、mandelate や butyrate などの側鎖の大きいヒドロキシ酸には活性が非常に低く、また光学異性体の D-乳酸は拮抗阻害剤として働くことが報告されている。LOX はα-hydroxy acid oxidase ファミリーに属しており、このファミリータンパクの脱水素反応メカニズムは、ヒスチジン残基によって基質のα-プロトンを引き抜く carbanion メカニズムと、FMN によって引き抜く hydride transfer メカニズムの二説が提唱されているが、現在、決着がついていない。

本研究では、立体構造から LOX の基質特異性と D/L の光学異性体の認識を明らかにすることと、酵素と基質の相互作用について検証し、乳酸の脱水素反応メカニズムを解明することを目的として研究を行った。

我々は、X 線結晶構造解析によって LOX の立体構造を 2.1Å分解能で決定した（PDB ID : 2DU2）。また、酵素と基質の相互作用を調べるため、ピルビン酸との複合体の解析を行った。ピルビン酸は反応産物ではあるが、基質と共通の構造的特徴をいくつか持ち、混合液のスペクトル分析の結果、LOX は酸化型のまま酵素反応が起っていないことがわかり、また、結晶が酸化型を示す黄色を呈していたので、LOX-ピルビン酸複合体は「反応前 LOX（酸化型）」と「基質類似物質」の酵素基質（ES）複合体として扱った。その複合体の立体構造も 1.9Å分解能で決定し、ピルビン酸が活性部位に配位していることを確認した。

これらの立体構造から、LOX の活性部位には他のファミリータンパクの構造では見られない狭い疎水性のポケット構造あり、配位したピルビン酸のメチル基がこのポケット内に位置していた。このため、LOX の高い基質特異性は、この疎水性ポケット構造が側鎖の構造を制限するためであることがわかった。またピルビン酸の配置に基づいて、乳酸分子のシミュレーションをしたところ、L-体の乳酸では活性中心の His-265 と FMN に対して、基質の反応部位を近づけることができるが、活性部位の空間が狭いため、D-体ではそのような配置を取ることができなかった。このことから、LOX 特有の狭い活性部位の構造が D/L の認識を行っていることもわかった。

また、このシミュレーションから、活性部位に存在する Tyr-215 残基のフェノール環の構造のため、L-乳酸は

carbanion メカニズムに基づく配置よりも、Hydride transfer メカニズムに基づく配置のほうが、活性中心と良好な位置関係をとることがわかった。このことから、LOX では L-乳酸の脱水素反応が Hydride transfer メカニズムで進行することが、我々の構造から明らかにすることができた。

## 論文審査の結果の要旨

L-乳酸酸化酵素は L-乳酸をピルビン酸にまで酸化する酵素である。この酵素は基質特異性が高く、D-乳酸や butyrate など側鎖の大きなヒドロキシ酸には活性を有しない。また酸化反応メカニズムには carbanion mechanism と hydride transfer mechanism の２説が提唱されている。基質特異性の要因と反応機構を確定するために L-乳酸酸化酵素及び酵素－基質類似物複合体の X 線結晶構造解析を行った。構造解析の結果基質結合部位の構造は L-乳酸にみに適合する形になっていることが明らかになり、この形が基質特異性を決定していることが解った。また、酵素－基質複合体の構造は hydride transfer mechanism が可能なものであり、carbanion mechanism は不可能なものであった。この構造解析の結果反応機構を確定することが出来た。

この研究は L-乳酸酸化酵素を初めとするヒドロキシ酸酸化酵素の反応機構の理解に大きく貢献するものであり，博士（理学）の学位に値するものであると認める。