

(様式 1-2)

提出日：2020 年 4 月 20 日

2019 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

課題名		ダイアジノンならびにイミダクロピリド代謝酵素の基質認識部位解析	
研究代表者	氏名	山本幸治	
	所属機関名・部局名	九州大学大学院農学研究院	
	職名	助教	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)		○	共同研究員
			超高磁場NMR 共同利用研究課題
			クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題
			客員フェロー
蛋白研受入担当教員名		中川敦史教授	
これまでにダイアジノンの解毒に関与する代表的な解毒酵素としてグルタチオン転移酵素 (GST) を扱ってきた。GST は遺伝子ファミリー (class) を形成しており、基質特異性の異なる複数のアイソザイムが存在することが分かってきた。近年、殺虫剤耐性昆虫の増加に伴い、新しい殺虫剤としてイミダクロピリドが開発され広く使用されつつある。哺乳類においてイミダクロピリドの代謝に関与する酵素としてアルデヒド酸化酵素 (AOX) が知られている。申請者は、カイコより AOX ホモログをすでにクローニングし、組換え酵素の発現系の構築に成功している。R1 年度は、当該 GST と AOX と殺虫剤類との共結晶を作製し複合体の構造解析そして部位特異的アミノ酸置換法による必須アミノ酸残基の同定を試みた。 (1) GST のダイアジノン結合部位解析 すでに得られている X 線結晶構造をもとに GST 分子中のアミノ酸残基 Ser16, Asn102, Pro162 そして Ser166 が electron-sharing network を構成していることを予測した。部位特異的アミノ酸置換法により network を構成するアミノ酸残基を Ala に置換した変異体を作製し、酵素反応測定論的解析を実施した。野生型 GST と比較した際、いずれの変異体においても GST 標準基質に対する触媒活性 (kcat/Km) の低下が観察された。また、ダイアジノン分解活性を高速液体クロマトグラフィーにて測定した。その結果、いずれの変異体もダイアジノン分解活性を示さなかった。これらの結果より、GSTu2 分子中の Ser16, Asn102, Pro162 そして Ser166 は GSTu2 ダイアジノン結合において重要であることがわかった。現在、ダイアジノンとの複合体結晶を作製中である。 (2) AOX の X 線立体構造解析 カイコ AOX に関して、すでにクローニングを終了し組換え酵素の発現系ならびに精製系を構築している。R1 年度は AOX の結晶化を進めた。最終濃度 10mg/mL に調製した精製酵素 (20mM Tris-HCl, pH8, 0.2M NaCl) を用いて、sitting-drop vapor diffusion 法により 20 度で結晶化を行なっている。現在までのところ、アポ酵素の結晶作製を試み、結晶取得後は、速やかに SPring-8 の BL44XU にて X 線立体構造の解析を行う予定である。			

