

提出日：平成 29 年 4 月 28 日

平成 28 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	昆虫由来薬剤代謝タンパク質の結晶構造解析		
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○)	<input type="radio"/>	共同研究員	
	<input type="radio"/>	超高磁場NMR 共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名	中川敦史教授		
<p>本研究では、代表的な薬剤代謝酵素であるグルタチオン転移酵素 (GST) ならびにアルドケト還元酵素 (AKR) の X 線立体構造を解析し、基質 (農薬) 認識機構を調査することを目的としている。GST は、生体外異物にグルタチオンを抱合し、異物の体外への排出を促進する農薬代謝酵素である。AKR は補酵素 NADPH 存在下で生体外異物を直接還元し、解毒に関与している。これまで申請者は、トビイロウンカより 2 種 GST をカイコより 2 種の AKR をクローニングし、酵素発現系ならびに精製系、そして GST アッセイ系をすでに確立している。これら酵素群中、トビイロウンカ sigma-class GST (nlGSTS) そしてカイコ AKR (AKR2E5) に焦点をあてて、X 線結晶構造解析した。平成 28 年度の研究成果の概要は以下の通りである。</p> <p>(nlGSTS について)</p> <p>グルタチオン-nlGSTS の複合体結晶を作製し、分子置換法による構造決定を終了している。平成 28 年度は、この構造をもとに精密化をすすめた。その結果、グルタチオン-nlGSTS 配列中の Tyr8, Trp39, Lys43, Gln63 そして Ser64 と水素結合を介して相互作用していることが分かった。これらのアミノ酸残基を部位特異的アミノ酸置換法にて、アラニンへ置換した。各変異酵素を大腸菌にて作製して、電気泳動的に均一に精製した。それぞれの精製変異酵素を用いて活性を測定したところ、いずれの変異酵素においても大幅な活性低下が観察された。以上、これらのアミノ酸残基は nlGSTS 活性に重要であることが示された。</p> <p>(AKR2E5 について)</p> <p>AKR2E5 と補酵素 NADPH 複合体の結晶構造解析はすでに終了している。平成 28 年度は、AKR2E5-基質複合体の作製を試みた。各種条件下にて結晶作製を行ったが検索した、複合体結晶は得られなかった。平成 29 年度は条件を細かく設定して、酵素-基質複合体結晶の取得に取り組む。</p> <p>(その他の薬剤代謝タンパク質の結晶化)</p> <p>現在、カイコ由来 unclassified GST2 (bmGSTu2) の結晶化条件を検索中である。結晶が得られ次第、X 線結晶構造を解析する予定である。</p>			