

提出日：平成 30 年 5 月 1 日

平成 29 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	昆虫の農薬代謝酵素の構造解析		
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>本研究において、農薬代謝酵素であるグルタチオン転移酵素 (GST) 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。これまで申請者は、カイコより7種 GST 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。さらに、4 種の GST の X 線結晶構造解析に成功している。新たにカイコ unclassified GST2 (bmGSTu2) に焦点をあてて、X 線結晶構造を実施した。平成 29 年度の研究成果の概要は以下の通りである。</p> <p>(apo-bmGSTu2 の結晶化)</p> <p>bmGSTu2 の組換えタンパク質を作製し電気泳動的に均一に精製した。濃度を 10mg/mL に調製したのち、apo-bmGSTu2 ならびにグルタチオン- bmGSTu2 の結晶作製を試みた。その結果、0.1 M Tris-HCl pH8.0 containing 0.6 M sodium acetate and 25% PEG4000 の条件下において apo-bmGSTu2 結晶を得ることに成功した。グルタチオン- bmGSTu2 の結晶については、引き続き作製中である。平成 30 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>(bmGSTu2 の X 線結晶構造解析)</p> <p>得られた結晶をもとに、Hg 原子を浸透させた重原子同形置換法により結晶構造解析を行なった。SPring8 にて回折データを取得後、分解能 1.68 Å、R-work (18.65%) そして R-free (22.10%) の条件まで精密化を進めることができた。bmGSTu2 構造中の Pro13、Phe107、Ile118、Phe119 そして Phe211 の各アミノ酸残基が活性発現に重要であることが分かった。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 bmGSTu2 活性に重要であることが示された。</p>			

※本様式は、“拠点事業成果報告”として、拠点ホームページにて公開させていただく予定です。

※必ず A4 用紙 1 枚におさめて下さい。 ※提出期限：平成 30 年 5 月 18 日 (金) ※提出の際は PDF 変換して下さい。

※提出先：大阪大学蛋白質研究所拠点プロジェクト班 E-mail: tanpakuken-kyoten@office.osaka-u.ac.jp