JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	PGD合成酵素のNMRによる立体構造解析
Author(s)	神野，直子
Citation	
Issue Date	1998-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/2436
Rights	
Description	Supervisor:大久保 忠恭，材料科学研究科，修士

JAPAN ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

PGD 合成酵素のNMRによる立体構造解析

神野 直子　(大久保研究室)

1）背景・目的

プロスタグランジンD合成酵素（PGDS）は、プロスタグランジンH_2（PGH_2）から睡眠誘発に関与するプロスタグランジンD_2（PGD_2）への異性化を触媒する。PGDSには3個のCys残基があり、これらをAlaまたはSerに置換した変異体の解析結果から、種を越えて保存されているCys65が反応に必須な残基であり、PGH_2の 9,11-エピジオキシ基に作用すると推測されている。PGDSはアミノ酸配列の相同性から疎水性低分子輸送に関与するリポカリンファミリーに属するが、このファミリー中でPGDSは唯一酵素活性を有している。また、PGDSがレチノイン酸と強く結合することも示されている。PGDSは脳脊髄液に多く分泌されているため、脳内でのレチノイン酸の輸送タンパク質である可能性が示唆されている。この様にPGDSは脳内活動の制御に深く関与しているにもかかわらず、その反応機構は解明されていない。

そこで、本研究ではPGDSの反応機構を解明することを目的として、PGDSの大量発現系の構築を行ないNMRによるPGDSの高次構造解析を行った。

2）実験・解析

すでに遺伝子の単離されている、ラットの*PGDS*遺伝子を組み込んだ大腸菌の大量発現系用いてNMR測定用試料を得た。

培養法はM9最少培地下で、栄養源に$^{15}NH_4Cl$、^{13}C-Glucoseを用いることによりタンパク質の^{15}Nラベル及び^{13}C, ^{15}Nダブルラベルを行なった。

精製法は、菌破砕後PH7.8の条件下でPEIにより除核酸を行ない、60%硫安沈澱により目的タンパク質を沈澱させた。そして、イオン交換カラムにより溶出をおこなった。

^{15}Nラベル及び^{13}C, ^{15}Nダブルラベルしたタンパク質を調整し、各種2次元、及び3次元NMRスペクトル[COSY、NOESY、 TOCSY、3D NOESY -HMQC]の測定及び解析により、シグナルの帰属、連鎖と2次構造の同定を行った。

3）結果・考察

野生型PGDSで試料を得ようと試みたが精製途中で分子間S-S結合の形成を起こしてしまい、会合、沈澱してしまったため、酵素活性に影響を与えないCys89、 Cys 186をAlaに変えた変異体を用いた。

最初、陰イオン交換カラムQ-セファロースで溶出を行なったところ、目的タンパク質がカラムに吸着しなかったため、バッファーのpHをpH3.5に変え、陽イオン交換カラムSP-セファロースにより溶出をを行なったところ、SDS-PAGEで単一バンドになるレベルまで精製できた。

以上培養、精製条件の検討より目的タンパク質10 mg/L以上の大量発現系を構築することができた。

NMRスペクトルの解析によりシグナルの帰属を行ない得られたシグナル帰属をもとに、主鎖プロトン間のNOE情報から、PGDSはβシートを含むことが明らかとなった。また、^{15}N-^{1}H HMQCの結果から約30%の主鎖アミドプロトンのNMRシグナルに顕著な線幅増大が観測され、PGDS中にフレキシブルな領域の存在が示唆された。

図は 平成9年度修士論文研究発表要旨集参照

keywords　**プロスタグランジンD合成酵素、立体構造、NMR、レチノイド**

Copyright © 1998 by Naoko Jinno