

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

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 (PGH₂) から睡眠誘発に関与するプロスタグランジン D₂ (PGD₂) 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、PGH₂ 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を用いて NMR 測定用試料を得た。

培養法は M9 最少培地下で、栄養源に ¹⁵NH₄Cl、¹³C-Glucose を用いることによりタンパク質の ¹⁵N ラベル及び ¹³C、¹⁵N ダブルラベルを行なった。

精製法は、菌破碎後 pH7.8 の条件下で PEI により除核酸を行ない、60% 硫酸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。

¹⁵N ラベル及び ¹³C、¹⁵N 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 シートを含むことが明らかとなった。また、¹⁵N-¹H 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