

28AB-pm093

ハシリドコロ由来新規ポリケタイド合成酵素の構造および機能に関する研究
○田畑 香織¹, 松尾 彩加¹, 田中 宏幸¹, 森元 聡¹ (九大院薬)

【目的】ナス科植物であるハシリドコロにはアトロピンやスコポラミンといった重要な薬理作用をもつ化合物が含まれている。これらの化合物はオルニチンより合成されることが分かっており、いくつかの反応に関与する酵素は同定されているが、トロピノンを合成するステップに関しては不明である。そこで、ハシリドコロから新規ポリケタイド合成酵素をクローニングし、機能および構造を明らかにすることを目的として研究を行った。

【方法】ハシリドコロから2種の新規遺伝子配列を決定し、得られた遺伝子を大腸菌発現用プラスミドに挿入し大量発現系を構築した。発現させた組換えタンパク質をアフィニティーカラムやイオン交換カラム等を用いて精製し、結晶化のスクリーニングを行った。得られた結晶を用いてX線結晶構造解析を行った。

【結果】ハシリドコロから得られた2種の新規遺伝子が大腸菌で発現させたところ、どちらも可溶性画分に発現することが判明した。アフィニティーカラムおよびイオン交換カラム、ゲルろ過カラムを用いることにより、SDS-PAGEで単一バンドを示すまで精製することが出来た。Hampton Research社のCrystal ScreenやIndexを用いてスクリーニングを行った結果、いくつかの条件で針状やプレート状の結晶が得られ、条件を最適化することにより柱状の結晶を得ることに成功した。放射光施設にてX線データを収集し、アルファルファカルコン合成酵素をモデルとして分子置換法で解析したところ、約2 Åの分解能で構造を決定することに成功した。