

提出日：平成 29 年 5 月 1 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	NMR を用いた蛋白質分子中のねじれ型アミド構造の検出		
	氏名	神田大輔	
	所属機関名・部局名	九州大学・生体防御医学研究所	
	職名	教授	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)		共同研究員	
	○	超高磁場NMR 共同利用研究課題	
		クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題	
		客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名			
<p>オリゴ糖転移酵素 (oligosaccharyltransferase, OST) は蛋白質のアスパラギン残基の側鎖のアミド基にオリゴ糖鎖を転移する反応を触媒する。アミド基の窒素原子は求核反応性に乏しいことが知られている。酵素と基質ペプチド複合体の低分解能結晶構造に基づいて、オリゴ糖転移酵素がカルボキシアミド基 O=C-N 結合をねじることでアミド窒素の求核性を増やすモデルが提唱されている。本研究ではオリゴ糖転移酵素-基質ペプチド複合体の 2 次元 ^1H-^{15}N (TROSY)-HSQC スペクトルを測定することでアミド窒素およびアミド水素の化学シフト値の高磁場シフトを検出し、アミド基のねじれを実証することを目標とした。</p> <p>古細菌のオリゴ糖転移酵素の基質結合部位に ^2H, ^{15}N 安定同位体標識した基質ペプチドをジスルフィド結合で架橋係留した複合体を測定試料として調製する。[U-^2H, ^{15}N]-基質ペプチドの HSQC スペクトルは 8 つの主鎖ピークと 1 組の Asn 側鎖カルボキシアミド基 NH_2 のピークを示すが、オリゴ糖転移酵素と分子間ジスルフィド結合を形成させて HSQC スペクトルを測定するとクロスピークの数が増えた。このことは基質ペプチドがオリゴ糖転移酵素に係留された時に、2 つの状態を取ることを意味している。今のところ、2 つの構造状態とはオリゴ糖転移酵素の open\leftrightarrowclose コンホメーション変化に対応したペプチドの結合状態\leftrightarrow非結合状態であると考えている。ねじれ状態を変化させるために、溶液に EDTA を加えることと、ペプチド配列のコンセンサス配列 Asn-X-Ser/Thr の X 位にプロリンの導入を行った。しかし、両者ともに複合体状態のスペクトルに変化はなかったことから、ジスルフィド結合安定化複合体を用いた今回の実験ではカルボキシアミド基のねじれ構造は検出できていないと考えられた。したがって、超高磁場 950MHz で測定しても当初の目的が果たせないことが予想されたため、今年度は阪大蛋白研での測定は行わなかった。</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 29 年 5 月 19 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