

提出日：2020年 2月 28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	ヤエヤマサソリ由来新規殺虫性ペプチド LaIT2 の構造機能相関研究		
研究代表者	氏名	森田 勇人	
	所属機関名・部局名	城西大学・理学部化学科	
	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	杉木 俊彦 (機能構造計測学研究室)		
<p>背景—ヤエヤマサソリの毒液に含まれるペプチド毒素 LaIT2 は、殺虫・抗菌活性を示すが他のサソリ毒と異なり、哺乳類に対して毒性をほとんど示さない。この毒性の特異性と、抗菌活性と殺虫活性がどのような構造要因に起因するかについてはいまだ明らかにされていない。また、LaIT2のカルボキシ末端側には3つのS-Sブリッジが存在することがわかっており、LaIT2のカルボキシ末端側は、強固な高次構造を取っていることが予測される。</p> <p>本研究ではこのような機能的、構造的特徴を有するLaIT2の立体構造を安定動態標識法を併用した多次元NMR分光法により解明し、抗菌活性、殺虫活性をもたらす構造要因の特定ならびに、活性発現の分子機構解明を目指した。</p> <p>研究手法—LaIT2 は、2 種類の発現ベクター (pET32a、pCold ProS2 ベクター) で発現した融合タンパク質のプロテアーゼ処理により (pET32a : Enterokinase、pCold ProS2 : Factor Xa) ゲルろ過法を用いて単離精製した。得られたペプチドは、アミノ酸配列から予測される分子量を持っていたので (SDS-PAGE で確認)、¹⁵N標識体を作成後、¹H-¹⁵N HSQC スペクトルの測定を行い、高次構造の形成を評価した。</p> <p>研究成果—LaIT2 については、ProS2 との融合タンパク質がほぼ100%可溶化することが分かったが、Factor Xa で処理したところ、目的サイズのタンパク質の収率が予想の1/3 程度であるだけでなく、精製後¹H-¹⁵N HSQC スペクトルが変性状態を予想させるスペクトルであった。そこで、発現段階ではほとんど封入体である、GST との癒合タンパク質 (pET-32a系) の可溶化を検討した。封入体を、0.3% Tween-20 を含む緩衝液で洗浄後、Enterokinase 切断用緩衝液に懸濁し、24 時間4°Cで静置することで、1/2 以上のタンパク質が可溶化に成功した。得られた可溶化画分をEnterokinase で処理したところ、22°C、8 時間の処理で、ほぼ収率100%で目的サイズのタンパク質が得られた。現在、この条件で¹⁵N 標識 LaIT2 の発現精製を進めることで、¹H-¹⁵N HSQC、¹H-¹⁵N NOESY-HSQC、¹H-¹⁵N TOCSY-HSQC スペクトルの測定準備を進めるとともに、プロテアーゼ処理後の末端形状の確認 (TOF-MS) ならびに、殺虫活性測定 (ヨトウガをつかったLD50 計測) を共同研究先の京都大学と進めている。</p>			