

提出日：平成 30 年 5 月 17 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	toxin の生体内における阻害機構および構造の解明		
研究代表者	氏名	山口 良弘	
	所属機関名・部局名	大阪市立大学・複合先端研究機構	
	職名	特任准教授（テニュアトラック）	
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	藤原 敏道	教授	
<p>近年、ほぼすべての原核生物において、アポトーシス様細胞死を引き起こす toxin-antitoxin (TA) system が発見された。一般的に toxin および antitoxin 遺伝子はオペロンを形成し、toxin は宿主自身に対して毒性を示す。通常、toxin は antitoxin と複合体を形成し、その毒性は中和されている。個々の TA system および toxin の解析、原核生物の生理機能、病原性及び進化の理解に必須である。しかし、その毒性の強さから toxin タンパク質を高発現させ精製することは困難であり、これまでその構造は不明なものが多い。</p> <p>今回我々は、toxin タンパク質の機能および構造を in-cell NMR を用いて解析することを目的として実験を行った。まずはじめに、toxin タンパク質高発現の検討を行った。その結果、今回試した toxin タンパク質の中では MazF-bs が最も適していることが明らかとなった。</p> <p>In-cell NMR の解析は高濃度に濃縮した大腸菌懸濁液を使用する必要がある。しかし、In-cell NMR 解析中に菌体内のタンパク質由来のシグナルとは別の強いシグナルが検出されることが知られており、これは大腸菌内からタンパク質が漏出するためと考えられる。そこで、高濃度に濃縮された条件下でも溶菌せず、膜を強固に保つことができる大腸菌のスクリーニングを行うことを最終的な目標として実験を行った。大腸菌の溶菌酵素である T4 phage lysozyme を用いて解析した結果、割合としては低いながらも in-cell NMR 条件下では大腸菌の細胞質タンパク質が漏出している可能性が示された。</p> <p>今回、HicA toxin を含めた toxin を in-cell NMR によって解析するための条件検討を行った。その結果、HicA および MqsR は発現量が低いまたは可溶性タンパク質として発現することができなかった。一方、TopAI および SymE は可溶化タグである PrS の付加により可溶化タンパク質として発現させることができたが NMR を用いた構造解析には不適なタンパク質であった。発現量および可溶性で最も適していたのは MazF-bs であったが、これは Bacillus 由来のタンパク質であり、大腸菌の体内で生理機能を直接観察するという本来の目的からは外れてしまう。今後他の toxin で in-cell NMR に適したものを探索する必要がある。In-cell NMR 条件下では大腸菌の溶菌が起こっていることが示唆されていたが、今回の実験結果からもこの可能性が支持された。今後さらに条件を検討することで in-cell NMR に適した大腸菌を作成することは十分に可能であろう。</p>			