

提出日：平成 30 年 5 月 18 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	Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> 酸化還元酵素の酵素基質間相互作用の NMR 解析	
研究代表者	氏名	瀬尾 悌介
	所属機関名・部局名	金沢大学・理工研究域
	職名	助教
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	栗栖源嗣	
<p>原核生物である枯草菌や緑色硫黄細菌は、植物などの真核生物とは系統的・構造的に大きく異なるホモ 2 量体型の ferredoxin-NAD(P)<sup>+</sup>酸化還元酵素(FNR)を有する。X 線結晶構造解析及び反応速度論解析の結果から、これらの生物由来の FNR は、基質である ferredoxin(Fd)及び NAD(P)H との酸化還元反応時にドメインモーシオンが必要であり、速度論研究から高基質濃度時に見られる反応速度の低下（基質阻害）とドメインモーシオンとの関連を強く示唆する結果を得ている。FNR への基質結合に伴う構造変化の詳細を高磁場 NMR の測定により明らかにすることを旨とし、局所構造を部分同位体ラベルした枯草菌 FNR の調製を試みた。部分同位体ラベルには、枯草菌 FNR の N 末端部と C 末端部を個別にインテイン融合蛋白質として発現し、インテイン切除後のペプチド断片をペプチドライゲーション法により結合する方法を用いた。2 つのヌクレオチド結合ドメインを含む約 300 残基からなる N 末端部は、FAD を結合したホロ蛋白質として発現し、各種カラムクロマトグラフィーにより部分精製された。還元剤存在下 37℃で一晩インキュベートすることにより、推定分子量に対応するバンドを SDS-PAGE で与えることが確認された。約 30 残基からなる C 末端部の発現は、当該ペプチドの N 末端アミノ酸残基を Cys に置換した DNA 断片を PCR 法により作成し、インテインとの融合蛋白質として発現させるプラスミドを作成した。融合蛋白質の精製を簡便にするために、アフィニティータグをインテイン部に付加した。作成したプラスミドで形質転換した大腸菌を M9 培地で培養し、破碎上清をアフィニティークロマトグラフィーで精製したところ、溶出液中に SDS-PAGE において推定分子質量を与える蛋白質のバンドが確認された。精製した 2 つの融合蛋白質を混合してインテインを活性化しペプチドライゲーションを行うために、還元剤添加と pH 変化による誘導を行ったが、沈殿が生じるのに加えてペプチド断片が切り出されない等の問題が生じ、部分ラベル試料の準備に至らなかった。</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 30 年 5 月 18 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