

提出日：2019年 8 月 7 日

平成 30 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   | 藍色細菌 <i>Synechococcus elongatus</i> sp. PCC7942 由来新規 sHSP, Orf7.5 の二次構造解析 |                   |
| 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          |
|   | 職名  | 教授                |
| 事業名<br>(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>藍色細菌は 20 億年以上前に地球上に現れ、現在でも地球上に幅広く存在しており、熱ショック蛋白質 (HSP) をはじめとする、様々な環境ストレス応答機構を内在していると考えられる。近年、藍色細菌 <i>Synechococcus elongatus</i> sp. PCC7942 から、熱ショックで誘導され、これまでに知られている HSP の中で最小の分子量 (7,455) を持つ Orf7.5 が同定された。Orf7.5 は、非天然状態のタンパク質の凝集活性 (シャペロン活性) を持ち、orf7.5 を欠損した藍色細菌は高い温度感受性を示す。一方これまでに同定された一連の低分子量 HSP (sHSP) に多く見られるクリスタリンドメイン (イムノグロブリンフォールド) を持たず、Orf7.5 は新規の sHSP である可能性が示唆されている。本研究では、Orf7.5 のシャペロン活性発現に関わる立体構造要因を多次元 NMR 分光法で明らかにすることを試みた。</p> <p>本年度は、Orf7.5 単独での発現系並びに GST ならびにコールドショックベクターを用いた ProS2 との融合タンパク質としての発現系構築を行った。前者 2 つの系では、検討を行ったすべての発現条件 (宿主大腸菌の種類、発現温度) で封入体として発現した。また、ProS2 との融合蛋白質としての発現系では、発現タンパク質の大半が可溶化したが、分子量が予想される分子量より約 10k 大きく、その原因は不明なままであったため、最も発現量が多かった Orf7.5 単独での発現系において、封入体からまき戻し反応により生理活性を保持した状態の Orf7.5 を高い効率で回収する系を構築した。具多的には、低濃度の界面活性剤 (1% SDS 等) で洗浄を行った封入体を 8M 尿素により可溶化し、6 時間おきに尿素濃度を段階的に希釈することで (6 段 ; 8M→6M→4M→2M→1M→0.5M→0M)、封入体の約 4 割を可溶性タンパク質として回収することに成功した。さらに、この回収率は大腸菌の培養スケールに強く依存することも明らかになり NMR 測定試料を得るためには (培養スケール ; 2L) 可溶化→巻き戻し反応を 3 回は繰り返す必要があることが分かった。この結果は、M9 培地で培養した場合も同じであった。その結果、測定試料調製に時間を要し、H30 年度内に行う予定であった、Orf7.5 の立体構造解析のための測定条件決定 (測定試料中の Orf7.5 の濃度、pH、温度) を行うことができなかつた。本計画は、H31 年度も継続して実施することで採択を得ていることから、H31 年度に改めて測定条件の決定、Orf7.5 の高次構造解析を行う予定である。</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：令和元年 5 月 17 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