

提出日：2019年5月19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	Ferredoxin-NADP ⁺ 酸化還元酵素の基質結合に伴う構造変化の 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)⁺酸化還元酵素(FNR)を有する。X 線結晶構造解析の結果、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ョンが必要であると推定された。また速度論研究においても、ドメインモーションとの関連が示唆される、高基質濃度時に見られる反応速度の低下（基質阻害）が確認された。そこで 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目指し、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、野生型 FNR の精製法に準じた各種カラムクロマトグラフィーにより精製できた。還元剤存在下 37°C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 に置換したアミノ酸配列をコードする DNA 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を試みた。融合蛋白質の精製を簡便にするために、インテイン部に含まれるタグの他に、His タグをインテインの N 末端に付加した融合蛋白質の発現も試みた。作成した発現プラスミドで形質転換した大腸菌を培養し、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 において該当蛋白質と推定されるバンドが確認されたが、インテイン切断後のペプチド断片が SDS-PAGE において確認できず、部分ラベル試料の調製には至らなかった。</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：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