

提出日：2020年 3月 9日

平成28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	ピロリ菌由来のニッケル結合蛋白質 Hpn におけるニッケル結合様式の解明	
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 (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	児嶋 長次郎 (蛋白構造生物学研究部門)	
<p><b>背景</b>—ピロリ菌 (<i>Helicobacter pylori</i>) は、細胞内でその活性発現にニッケルイオンの存在が必須である Urease を産生することで、アンモニアを分泌し、胃酸を中和することで、強酸性の胃の中での生育を可能としている。Hpn は 60 アミノ酸から構成されるペプチド様蛋白質であり、その 50% がヒスチジン残基で構成されており、これまでに大腸菌で大量発現させた Hpn の MALDI-TOF-MS 解析の結果より、Hpn は、1 分子あたり最大 7 原子の Ni<sup>2+</sup> と化学量論的に結合することがわかった。また、Hpn の精製過程の Ni<sup>2+</sup> 濃度に依存して SDS-PAGE 上で異なる分子量の多量体形成が検出されることが分かった。</p> <p>本研究では、安定同位体標識を行った Hpn の多次元 NMR スペクトルを測定することで、Hpn の Ni<sup>2+</sup> に対する結合様式を解明するとともに、Hpn の多量体形成能と Ni<sup>2+</sup> の代謝制御との相関関係を構造化学的観点から明らかにすることを目指した。</p> <p><b>研究手法</b>—これまでに確立した Hpn の大腸菌による大量発現系を用いて作出した安定同位体標識された Hpn ならびに各ヒスチジン残基への点変異を導入した Hpn の多次元 NMR スペクトル計測を行うことで、Ni<sup>2+</sup> 結合様式を解明することを試みた。</p> <p><b>研究成果</b>—点変異導入を行っていない Hpn を単量体で生成する手法の最適化を培養時や精製時に Ni<sup>2+</sup> を加えることで行ったが、最終のゲルろ過法で分離後 NMR 計測可能濃度(0.2mM) まで濃縮を行うと、多量体形成が無視できない程度に確認されたことから、点変異導入体で複合体形成がほとんど起こらず、7 等量の Ni<sup>2+</sup> が結合する変異体の探索を進めている。また、ゲルろ過法で分離精製後の多量体含有量が低い Hpn を抗原としてマウスによるポリクロナール抗体作製を行い (抗原投与後15週間経過後、追加抗原投与を行い、力価が向上した抗体をさらに6週間後に採取予定)、ピロリ菌内での Hpn 多量体形成様式の解析を進めている。今後、これらの成果をもとに、多量体形成が Ni<sup>2+</sup> の代謝制御に重要な意味を持つかを推定するとともに、多量体形成能の低い点変異導入 Hpn を用いて <sup>61</sup>Ni 結合型における <sup>61</sup>Ni の直接測定または、<sup>195</sup>Pt 結合型における <sup>195</sup>Pt の直接測定を行うことで Hpn における Ni<sup>2+</sup> 結合様式解明を行う予定である。</p>		