

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	固体 NMR による 細菌性膜貫通型シグナル伝達蛋白質 pHtrII のナノディスク上での構造解析		
研究代表者	氏名	小澤 潔	
	所属機関名・部局名	大阪大学・基礎工学研究科	
	職名	助教	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)	<input type="radio"/>	共同研究員	
	<input type="radio"/>	超高磁場NMR 共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名	藤原敏道		
<p>安定化が難しい膜蛋白質の大量発現系の構築、そして天然状態に近い形での固体核磁気共鳴装置（NMR）による構造解析を可能にするために、その条件検討を行った。モデル蛋白質として光走性シグナル伝達蛋白質（pHtrII）を用い、これをナノディスク膜（不溶性蛋白質を膜骨格蛋白質である MSP1 のベルトによって囲み、天然に近いリン脂質二重膜構造をとるナノ構造体）上に再構成した。その際、前年度に確立した大腸菌無細胞蛋白質合成系による安価で効率的な安定同位体標識法を応用し、重水素化されたアミノ酸を用いた pHtrII の直接重水素標識を行った。この技術の確立により、pHtrII の <math>^2\text{H},^{15}\text{N}</math> 安定同位体標識、<math>^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}</math> 試料等も同様に自由に NMR 測定可能な量を調製することが可能になった。その後、ナノディスク膜上に再構成した試料を用いて、NMR による直接シグナル観測を試みた結果、pHtrII は、pH7.0 ではほぼすべて、可溶性の凝集体となっており、ゲルろ過カラムではボイドボリュームに溶出する一方、pH6.5 では、少なくとも 1 ヶ月程度は 4°C から室温状態で安定に溶液状態で分散していることが判明した。さらにその溶液 二次元 <math>^{15}\text{N}</math>-NMR シグナルの構造情報から、pHtrII が、ナノディスク膜上で、きちんとしたフォールドを保持して存在していることがわかった。同様な手法を用いて、さらに pHtrII の <math>^{13}\text{C},^{15}\text{N}</math> 安定同位体標識試料を調製した後、ナノディスク膜上に再構成した試料による固体 NMR による構造解析への詳細な条件検討を進めることができた。</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