

（様式 1-1）

提出日：2026 年 06 月 25 日

2025 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

（1）事業名（下記より該当事業名を選択し、ほかは削除してください。）

共同研究員 ・ 超高磁場 NMR ■ ・ クライオ電子顕微鏡 ・ MicroED ・ 客員フェロー

（2）研究代表者

氏名： 森田 勇人

所属機関名・部局名・職名： 城西大学・理学部化学・生命科学科・教授

（3）研究課題名（申請時に記載したものと同一課題名を記入してください。）

トマト LE25 タンパク質の発現が乾燥ストレス耐性を誘導する分子機構

（4）蛋白質研究所受入担当教員

教員名：宮ノ入 洋平 （研究室名：スピン構造生物学研究室）

（5）研究成果の概要

トマト由来の LE25 タンパク質は、塩害などの環境ストレスにさらされた場合にその発現が誘導される Late Embryogenesis Abundant Protein (LEA タンパク質)の 1 つであり、88 アミノ酸残基から構成される。LE25 は、塩害により脱水状態に陥った細胞内で、親水性の保護バリアとして作用することが知られており、LE25 を細胞内で過剰発現させた酵母を用いた実験系の結果から、塩ストレス耐性には LE25 は有効であるが、浸透圧ストレス耐性（ソルビトール添加を行った実験）には有効ではないことが明らかになっている。これは、LE25 の細胞内での発現は、浸透圧ストレスによる脱水の防御としてではなく、塩自体のイオン毒性の中和として作用していることを示しており、本研究では、LE25 の発現誘導により塩害ストレスに対する耐性を獲得することができる分子機構（Na⁺等のイオン毒性の中和機構）を超高磁場 FT-NMR を用いた構造生物学的手法と生理学的手法である LE25 への点変異導入によるストレス耐性強度変化とを組み合わせることを目的とした。

本年度は、LE25 をコードする cDNA を pET-32a(+)の NcoI, XhoI サイトに挿入することで作製したプラミドを大腸菌 RosettaGami2(DE3)に組み込むことで作出した発現系を用いて、Trx-LE25 融合タンパク質の大量発現を行った。作出した融合タンパク質は enterokinase プロテアーゼで処理することで Trx タグを含む N 末配列の除去を行い、常法に従い精製濃縮を行うことで、NMR 等による分析のための試料を作出した。また、LE25 の立体構造を、AlphaFold2 を用いて予測したところ、2 本の α ヘリクス構造を有していることが示されたため、その構造に基づき、塩を構成するイオン類との相互作用が予測される極性アミノ酸残基 1 つずつをアラニン残基に置換した点変異 LE25 の大腸菌大量発現系を PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (TakaraBio) を用いて 27 種作成した、現在、これら点変異 LE25 をコードする配列を酵母用形質転換ベクター pYES2.1-TRP1 に挿入することで、酵母における形質転換 LE25 を発現する酵母の系の作成を進めている。さらに LE25 の立体構造解析にあたっては、LE25 の安定同位体標識は、¹³C グルコース、¹⁵N 塩化アンモニウムを添加した M9 培地を用いることで行い、構造解析のための測定条件の設定を ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを比較することで進めている。