

提出日：平成 29 年 5 月 19 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	イオン輸送体の単粒子構造解析	
研究代表者	氏名	西澤 知宏
	所属機関名・部局名	東京大学 大学院理学系研究科
	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	岩崎 憲治	
<p>本研究では脂質膜中ではたらくイオン輸送体を対象とし、クライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析を行うことで、原子モデルの構築可能な $3\text{-}5\text{\AA}$ の高分解能で明らかにし、その構造をもとにイオン輸送の分子機構を解明することを目的とする。真核生物由来のカチオンチャンネルを対象として、GFP を用いた FSEC 法による遺伝子スクリーニングなどの結果、界面活性剤で可溶化した状態での安定性が高いチャンネル分子を特定し、昆虫細胞による発現系を用いて発現したタンパク質を Ni-NTA による金属アフィニティクロマトグラフィー、ゲルろ過などによって精製し、構造解析を行うために十分な精製度のタンパク質を得ることに成功した。この精製したチャンネルタンパク質を用いて負染色法による電子顕微鏡観察から 4 量体形成を保ったまま精製できていることを確認できたため、直接検出器を備えた低温電子顕微鏡による観察を行った。初めは可溶化する際に用いた界面活性剤に入ったミセルの状態の試料を観察に用いたが、凍結観察試料の氷の厚みが高いために、CTF 補正において高分解能の情報が失われてしまうという問題などのため、単粒子解析を行うことは難しかった。そこで、amphipol と呼ばれる両親媒性の分子や、nanodisc と呼ばれる脂質二重膜状の環境に精製タンパク質を再構成することで、余計な界面活性剤を取り除くことで薄い氷の観察試料を作製するための条件検討を行った。さらに濾紙によるブロッキングの強度、時間の検討を行うと同時にグリッドの種類の検討を行うことで、チャンネル分子が均一に分散した観察試料を作製することに成功した。300kV 加速電圧のクライオ電子顕微鏡 TitanKrios と直接検出器 FalconIII を用いたデータ収集を行い、単粒子解析ソフト Relion によって解析を行ったところ、βシートなど二次構造思われる特徴が確認できる程度の二次元平均化像を得ることに成功した。しかしながら特定の向きの粒子が多かったために三次元再構成を行うことはできなかった。今後はこれらの問題を解決しつつ、データ収集を行うことで高分解能の三次元構造を得ることを目指す。</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 29 年 5 月 19 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