

提出日：平成 28 年 5 月 23 日

平成 27 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 <sup>+</sup> 酸化還元酵素の酵素基質間相互作用の NMR 解析	
研究代表者	氏名	瀬尾 倮介
	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
		国際共同研究課題
	○	超高磁場 NMR 共同利用研究課題
		客員フェロー
蛋白研受入担当教員名	武藤理沙	
<p>枯草菌や緑色硫黄細菌は、真核生物とは構造学的・系統的に異なるホモ 2 量体型の ferredoxin-NAD(P)<sup>+</sup>酸化還元酵素(FNR)を有する。結晶構造解析及び反応速度論解析から、これら細菌由来の FNR と NAD(P)H の作用時にはドメインの回転を伴う大きな構造変化が生じ、これが基質阻害現象の原因となることが示唆されている。酵素・基質複合体の構造や基質結合に伴う構造変化の詳細を明らかにするため、<sup>15</sup>N ラベルした枯草菌 FNR(<i>Bs</i>FNR)と緑色硫黄細菌 FNR(<i>Ct</i>FNR)の、野生型(WT)と C 末端部を削除した変異体(<math>\Delta</math>C)を大腸菌で発現させて精製し、基質の有無に伴う NMR スペクトルの変化を超高磁場 NMR で測定した。ホモ 2 量体型 FNR の NMR 測定は初であったため、植物由来 FNR での測定条件を参考に <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルの測定を実施した。主鎖アミド由来のシグナルに関して、基質非存在下 25°C で得られた <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルでは帰属に十分な信号が得られていなかったが、測定温度を上昇させることにより信号強度とピークの分離状態に大幅な改善はみられたものの、まだ帰属に十分なスペクトルの取得にはいたらなかった。枯草菌 FNR のフレキシブルな C 末端部を削除した変異体 <math>\Delta</math>C の測定結果では、WT に比べて信号強度が大きく増加していたことから、ドメイン間の相互作用による影響が蛋白質全体の運動性にも大きく影響していると推察される。基質 NADP<sup>+</sup>存在下では、非存在下に比べて信号強度の大幅な上昇が確認されたことから、基質結合に伴う局所的なコンフォメーション変化がドメイン間の相互作用を含めた酵素全体の運動性に影響を及ぼしていると推察され、構造情報取得に向けて緩衝液系・イオン強度・共存塩等の測定条件を検討する余地があると考えられる。酵素濃度 (100~200 <math>\mu</math>M) に関しては、スペクトルへ大きな影響はなかったことから、今後は緩和時間等も考慮して測定条件を詳細に詰めていくことが必要であると考えられる。また推測通り C 末端部挙動が酵素の機作へ大きく影響していることが確認されたことから、変異体と部分ラベルを併用した試料の測定も検討していく。</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 28 年 5 月 20 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