

提出日：平成 29 年 5 月 22 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	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 悌介
	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
	○	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	栗栖源嗣	
<p>枯草菌をはじめとするグラム陽性菌や光合成細菌は、植物などの真核生物とは系統的・構造的に全く異なるホモ 2 量体型の ferredoxin-NAD(P)<sup>+</sup>酸化還元酵素(FNR)を有する。X 線結晶構造解析や反応速度論解析の結果から、これらの生物由来の FNR と ferredoxin(Fd)・NAD(P)H との相互作用においてドメインモーシオンが必須であり、基質阻害などの現象とドメインモーシオンとの関連が強く示唆されている。本年度は、ドメインモーシオンに直接関わる局所構造を同位体で部分ラベルした枯草菌 FNR を準備し、基質結合に伴う局所構造変化を、高磁場 NMR を用いて検出することを目指した。FNR の部分ラベルは、N 末端部と C 末端部を個別にインテイン融合蛋白質として発現し、インテイン切除後のペプチド断片を、ペプチドライゲーション法を用いて結合し、C 末端部のみを <sup>15</sup>N ラベルする方法で行った。約 300 残基からなる N 末端部は、FAD を結合したインテイン融合ホロ蛋白質として発現し、精製されたインテイン融合 FNR は還元剤存在下 37°C で一晩インキュベートすることにより、FNR の N 末端部のみに相当する分子量のバンドを SDS-PAGE で与えることが確認された。枯草菌 FNR の約 30 残基からなる C 末端部の発現は、当該ペプチドの N 末端アミノ酸残基を Cys に置換にするようデザインされた DNA 断片を PCR 法により作成し、インテインとの融合蛋白質として発現させるプラスミドを作成して用いた。このプラスミドで形質転換した大腸菌を M9 培地で培養したところ、破碎液の遠心後上清部に SDS-PAGE において(インテイン + FNR C 末端部)の分子量を与えるタンパク質のバンドが確認され、十分な量の融合蛋白質が発現していることが示唆された。現在、この C 末端部の融合蛋白質の精製を進めており、今後はペプチドライゲーションに必要な条件検討を行って部分ラベルした FNR の取得を目指す。</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