

提出日：平成 28 年 5 月 20 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	組み換え蛋白質を用いた難溶蛋白質凝集体可溶化の方法開発		
研究代表者	氏名	櫻井一正	
	所属機関名・部局名	近畿大学・先端技術総合研究所	
	職名	准教授	
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	蛋白質構造生物学部門 後藤祐児教授		
<p>近年、天然の蛋白質がミスフォールディングして生体内でアミロイド線維などの不溶性凝集体を形成し、アルツハイマー病、透析アミロイドーシスなど、さまざまなアミロイドーシスの原因となることが知られている。これら不溶性の凝集体を阻害することがこれらの疾病の予防や治療につながると考えられる。</p> <p>アミロイド線維形成は、溶液状態の物質の相転移や過飽和状態からの析出と本質的には同じ現象だと捉えられる。これらの分野のモデルをアミロイド線維研究にも適用することで、一度形成した不溶性凝集体も適切な溶媒条件に変えれば可溶化できることが最近の研究から次第に判りつつある。しかし、生体内では任意に溶媒条件を変えられず、その他の方法で可溶化を目指さなければならない。我々はある蛋白質を用いることで、これらの凝集体を可溶化する方法を考案した。ある蛋白質とは、一つはモノボディという、特定のターゲットに強く結合する性質を付与された人工蛋白質である。今年度は $\beta 2m$-モノボディ複合体の構造解析を行い、線維形成阻害機構の理解を目指した。もうひとつはアンフォルジンという、アクチンなどの巨大な重合蛋白質を可溶化する能力を持つ酵母由来の蛋白質である。この蛋白質を利用した難溶蛋白質凝集体の可溶化法の確立が最終目標であるが、そのための試料確保のため、大腸菌によるアンフォルジンの発現系の確立を目指すこととした。</p> <p>モノボディに関する研究では、まず ^{15}N 標識モノボディを発現し、非標識 $\beta 2m$ を滴下して NMR 化学シフト摂動を観察した。同様の実験を ^{15}N 標識 $\beta 2m$ と非標識モノボディの組み合わせでも行い、それぞれの蛋白質で相互作用部位を同定した後、HADDOCK というドッキングシミュレーションを行い、いくつかの複合体構造の候補を得ることができた。</p> <p>アンフォルジンの研究に関しては、封入体で十分量発現することが分かった。得られた封入体を尿素溶液で溶解後、いくつかの折り畳み促進物質存在下で希釈法による脱尿素処理でリフォールディングを行った。結果、D-乳酸デヒドロゲナーゼ活性が観察され、正しい構造を持つアンフォルジンを得られたことが分かった。今後はより高い折り畳み効率を実現したうえで物理化学的実験に供していきたいと考えている。</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