

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	HicA toxin の生体内における阻害機構および構造の解明		
研究代表者	氏名	山口 良弘	
	所属機関名・部局名	大阪市立大学・複合先端研究機構	
	職名	特任准教授（テニユア）	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)	<input type="radio"/>	共同研究員	
	<input type="radio"/>	国際共同研究課題	
	<input type="radio"/>	超高磁場NMR 共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名	児嶋 長次郎 准教授		
<p>近年、ほぼすべての原核生物において、アポトーシス様細胞死を引き起こす toxin-antitoxin (TA) system が発見された。一般的に toxin および antitoxin 遺伝子はオペロンを形成し、toxin は宿主自身に対して毒性を示す。通常、toxin は antitoxin と複合体を形成し、その毒性は中和されている。個々の TA system および toxin の解析、原核生物の生理機能、病原性及び進化の理解に必須である。しかし、その毒性の強さから toxin タンパク質を高発現させ精製することは困難であり、これまでその構造は不明なものが多い。HicA-HicB は、大腸菌に存在する TA system の 1 つで、<i>hicA</i> は <i>hicB</i> の上流に位置し、<i>hicB</i> とオペロンを形成する。HicA toxin (58 残基) は RNA の分解を引き起こし、単独で細胞生育を阻害する。興味深いことに、HicA toxin は生育を阻害するが細胞死は引き起こさないため、菌体内で HicA toxin タンパク質のみを発現できることが判明した。そこで、in-cell NMR により菌体内での HicA toxin および HicA-target 複合体の構造を明らかにすることを目的とする。</p> <p>HicA toxin の過剰発現を行った結果、HicA タンパク質は不溶性画分に局在していた。そこで、誘導後の培養剤の濃度を検討したが、検討したすべての濃度で誘導後も HicA は不溶性画分に局在していた。次に誘導後の温度を検討し HicA を可溶性画分に発現しようと試みた。37°C、室温および 16°C で発現させたが、何の条件においても HicA を可溶性画分に発現させることはできなかった。誘導剤の濃度および誘導後の培養温度も組み合わせて行ったが、可溶性タンパク質として HicA タンパク質を得ることはできなかった。そこで、次に HicA-HicB toxin-antitoxin 複合体を大腸菌内で発現させた。その結果、HicA-HicB 複合体は一部は可溶性タンパク質として存在していたもののその大部分は不溶性画分に局在した。そこで、HicA と同様に誘導条件を検討したがこれまで可溶性タンパク質として得られていない。現在、可溶性タグ、および発現ベクターについて検討中である。また、in-cell NMR に最適な高密度でも溶菌しない大腸菌の創出を試みている。in-cell NMR 解析中での大腸菌の生存数を調べた結果、4 時間後で 20%の菌が死滅していた。現在、より解析中に溶菌しにくい大腸菌のスクリーニングを T4 phage lysozyme を用いて行っている。</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