

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  | 構造機能計測学研究室            |                   |  |
| 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（テニュアトラック）   |  |
| 事業名<br>(該当の事業名の右欄に○)   | <input type="radio"/> | 共同研究員             |  |
|  | <input type="radio"/> | 超高磁場NMR 共同利用研究課題  |  |
|  | <input type="radio"/> | クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題 |  |
|  | <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>昨年度から引き続き目的タンパク質である HicA toxin の可溶性タンパク質として大量発現させる条件検討を行った。これまで試していなかった Protein S タグを N 末端に付加させた PrS-HicA を構築し大腸菌内で高発現させた。その結果、約 50% の HicA タンパク質が可溶性タンパク質として発現された。さらに、温度、誘導する際の菌密度、誘導剤の濃度などの誘導条件を検討した結果、HicA タンパク質をほぼ 100% 可溶性タンパク質として発現させることに成功した。次に HicA タンパク質の精製を行った。その結果、菌体内で HicA は分解されていることが示唆された。誘導時間の短縮や培養温度により HicA の分解を阻害することができないか試みたが、これまで期待される結果は得られてはいない。</p> <p>HicA toxin の構造解析の研究と同時に、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た。初めに in-cell NMR 解析中での大腸菌の生存数を調べた結果、4 時間後で約 20% の菌が死滅することが明らかとなった。in-cell NMR で問題になるのは解析中に菌が溶菌してしまい、細胞質タンパク質が菌体外に漏れでてしまうことである。漏れ出たタンパク質は菌体内に存在するタンパク質よりも強いシグナルとして検出される。そこで、トランスポゾンを用いて大腸菌の遺伝子欠損ライブラリーを作成し、作成した菌を用いて溶菌しにくく in cell-NMR に最適な大腸菌のスクリーニングを行った。T4 フェージ溶菌酵素 を遺伝子ライブラリー内で発現させることで、通常の生育環境では問題なく生育するが細胞膜の透過性が上昇すると T4 フェージ溶菌酵素 がペリプラズム空間に漏れ出てしまい菌を完全な溶菌に導く。このようなスクリーニング系を構築し、溶菌しにくい大腸菌の創出を試みた。しかし、これまで野生型株に比べて顕著に溶菌しにくくタンパク質の発現量は変わらないような大腸菌は得られていない。</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