

提出日：平成 29 年 5 月 18 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	セルロース合成酵素複合体の会合体構造解析		
研究代表者	氏名	今井友也	
	所属機関名・部局名	京都大学・生存圏研究所	
	職名	准教授	
事業名 (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	岩崎憲治		
<p>セルロース合成酵素は膜貫通タンパク質である触媒サブユニット CesA を中心とするタンパク質複合体である。バクテリアのセルロース合成酵素の場合、その機能上の最小構成単位は CesA と CesB という二つのタンパク質からなる CesAB 複合体である。このうち、CesB 単独について我々の行った予備的な構造解析の結果から四量体構造が示唆されているが、この四量体構造は X 線結晶構造解析から求められた CesAB 複合体の構造モデルとは一致しない。そこで我々は何らかの理由で既報の X 線結晶構造解析では会合体形成が乱されている可能性を考え、CesAB 複合体の構造解析をクライオ電子顕微鏡法で行うことを目指した。</p> <p>現状の問題点は、CesAB の解離により CesAB 複合体を準備できないことである。そこでタンパク質発現に用いる大腸菌発現系の最適化を行っている。AB の 2 タンパク質をコードする DNA をオペロンとしてそのまま発現プラスミド DNA に挿入して発現ベクターを構築しているが、本ベクターではリボソーム結合部位 (Shine-Dalgarno 配列・SD 配列) として、発現ベクターの配列ではなく発現する酢酸菌 <i>cesA</i> 遺伝子上流の配列を使用している点が特徴の一つである。そこで発現ベクターの最適化の一環として、この SD 配列の長さなどを変えた発現プラスミド DNA を複数作製し、そのタンパク質発現レベルと酵素活性の変化を確認した。さらに N 末欠損や C 末欠損の CesA 変異体を CesB の共発現系を作成し、これらの発現と変異による酵素活性変化を調査した。</p> <p>平成 28 年度は、以上のスクリーニング実験を行い、酵素活性が消失しないこととある程度以上の発現レベルが得られることを判断基準としていくつかの発現コンストラクトを選抜した。以上から、選抜した発現プラスミド DNA を用いて CesAB の大量発現と精製実験を行う準備を整えた。</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