(様式 1-2)

提出日：2020 年 4 月 23 日

2019 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		歯髄創傷治癒を促進するペプチド医薬品の開発	
研究代表者	氏名	高橋 雄介	
	所属機関名・部局名	大阪大学・歯学部附属病院	
	職名	講師	
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		鈴木 守 准教授	
<p>われわれがこれまでに同定した歯髄創傷治癒を促進する分子の一つである Protein S100A7 (以下 S100A7) はジスルフィド結合を 1 カ所持つタンパク質である。そのため通常の大腸菌培養法による精製では正常な立体構造を構築できないためリフォールディングが必要となる。しかし、リフォールディングは一般的に操作が煩雑でタンパク質の収率が低いと言われている。そこでリフォールディングを避けるため、使用する大腸菌株として Origami2 (DE3) Singles Competent Cells (Novagen) を用い、S100A7 の N 末端にチオドレキシン配列を付与することで正常な立体構造を構築することが可能であると考えた。そしてチオドレキシンを付与した S100A7 の精製後に付与されたチオドレキシンを除去するためチオドレキシン配列と S100A7 配列の間に TEV プロテアーゼ認識配列を挿入し TEV プロテアーゼを作用させ S100A7 のみを精製することを試みた。まず、チオドレキシン-TEV プロテアーゼ認識配列-S100A7 を発現するプラスミドを構築し、大腸菌に形質転換を行い培養した。得られた大腸菌をコバルトレジンをを用いたアフィニティー精製後、ゲルろ過クロマトグラフィーにて更に精製を行うことにより一定量のチオドレキシン-TEV プロテアーゼ認識配列-S100A7 の精製に成功した。しかし、そこに TEV プロテアーゼを作用させてもチオドレキシンと S100A7 を切断することができなかった。</p> <p>TEV プロテアーゼが精製したチオドレキシン-S100A7 に作用しなかった原因として天然変性予測プログラムである PONDR にて解析を行い検討した結果、TEV プロテアーゼ認識配列に対して TEV プロテアーゼのアクセスが困難であることが判明ため、今後はリンカーを付与しプラスミドを再構築するか、グアニジン塩酸塩を用いて TEV プロテアーゼ認識配列をアクセス可能にするか検討中である。</p>			