

2021 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

(1) 事業名 (下記より該当事業名を選択し、ほかは削除して下さい。)

超高磁場 NMR

(2) 研究代表者

氏名： 森田 勇人

所属機関名・部局名・職名： 城西大学・理学部化学科・教授

(3) 研究課題名 (申請時に記載したものと同一課題名を記入して下さい。)

半好熱性藍色細菌 *Anabaena variabilis* で発現する RRM モチーフを持つ RNA 結合タンパク質の多様性の生理学的意義に関する構造研究

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名： 杉木 俊彦

(研究室名：機能構造計測学研究室)

(5) 研究成果の概要 (公開)

「研究の方法」大腸菌による RbpA1 の大腸菌大量発現系用プラスミドに塩基配列の置換を行うことで、1)グリシンリッチドメインを cAMP and cGMP dependent protein kinase phosphorylation site (RbpD の C 末端領域の構造) に置換した RbpA1、2)RRM 領域に 2 つのアルファヘリクスをとると考えられる領域の間の領域を RbpD のそれと置換した RbpA 1、3)1)、2)の 2 つの置換を同時に導入した RbpA1 の 3 種類を In-Fusion システム (Takarabio) を用いて作出した。作出した 3 種類の発現系の塩基配列を確認後、大腸菌 Rosetta-gamiB(DE3)pLysS に形質転換を行った。各形質転換体を、安定同位体標識化合物 ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 ^{13}C -グルコース) を含む M9 培地中、 30°C で培養し、 0.5 mM IPTG を添加することで目的タンパク質の大量発現を行った

「研究結果」上記の手法で 3 種類の目的タンパク質の大量発現に成功するとともに、これまでに確立した RbpA1 の精製手法と同様の手法で可溶性タンパク質として精製を終えた (2021 年 12 月)。その後年明けて共通テスト終了後の 2022 年 1 月後半より 2022 年 3 月頭からの研究棟の移転 (理学研究棟並びに機器分析センター) のために、研究室の各研究機材の業者による梱包、本学機器分析センターの高磁場 NMR (700MHz、400MHz)、UV-CD などの廃棄作業が予定より早めに開始となり、それらに伴うデータ保存ならびに 2022 年度新規導入予定の高磁場 NMR 装置 (400MHz、600MHz ; Bruker) の最終機種選定業務により精製したタンパク質を用いた生理学・構造学的解析を行うことが遅延することとなったため、精製したタンパク質 3 種類を凍結乾燥し -80°C で保存することで、新棟への移設完了後 (移設並びに研究装置の立ち上げは、2022 年 5 月初頭の段階でほぼ完了した) に解析を進めることとした。