

(様式 1-1)

提出日：2025 年 5 月 7 日

2024 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、ほかは削除してください。）

超高磁場 NMR

(2) 研究代表者

氏名：武藤梨沙

所属機関名・部局名・職名：東邦大学・理学部・講師

(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ください。）

藍色細菌生物時計発振機構の解析

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：宮ノ入 洋平（研究室名：高磁場 NMR 分光学研究室）

(5) 研究成果の概要

*背景および目的、方法と結果について、公開して差し支えない範囲で記載。

地球上の多くの生物は、地球の自転によって生じる約 24 時間周期の環境変化に適応するため、生物時計を備えている。生物時計は、自律的な 24 時間周期の継続、温度補償性、外部刺激などによる位相のリセットという 3 つの特性を持っており、これらは生物時計を持つ生物で共通している。藍色細菌は、生物時計を有する生物の中でも最も単純な時計分子装置を持つ。その構成因子は、時計タンパク質 KaiA、KaiB、KaiC であり、これらのタンパク質の結合・解離によって時間情報が生み出される。その中でも KaiC は時計の振動子としての中心的な役割を果たし、温度補償性にも関与していると考えられている。そこで本研究では、KaiC による温度補償性の分子機構を明らかにすることを目的とした。

KaiC は約 60 kDa と質量が大きいため、全長タンパク質を NMR 測定するとピークの重なりやブロードニングが問題となり解析が困難である。KaiC は 2 つの相同なドメインから構成されているため、N 末端ドメインタンパク質 (KaiC_N) と C 末端ドメインタンパク質 (KaiC_C) に分け NMR 測定を行うことにした。前年度の測定では、タンパク質濃度が不十分で、明瞭な NMR ピークを観測することができなかった。そのため、まずは発現量の向上を目指して培養条件の最適化を行った。M9 培地に添加する FeCl₃、FeSO₄、グリセロール、グルコースなどの量を変更し、各条件下での発現量の違いを SDS-PAGE により比較した。その結果、FeSO₄ の添加量を増加させることで発現量が向上した。この条件を用いて、¹⁵N 標識 KaiC_N、KaiC_C を準備し、293 K、298 K で NMR 測定を行った。一般に、温度を変えても NMR ピークは大きくシフト変化しないが、顕著なシフト変化が観測された場合、そのピークのアミノ酸残基は温度補償性に関与している可能性があるのではないかと考えた。今回、時計機能を持たないタンパク質をコントロールとして同様の条件下で実験を行い、各ピークの化学シフト変化の割合を算出した。その結果、KaiC_N と KaiC_C ではコントロールタンパク質と比較して大きな化学シフト変化を示すピークが多く観察された。特に KaiC_C では、より多くのピークで顕著なシフト変化が観察された。今後は、大きくピークシフト変化したアミノ酸残基を同定し、それらがどのように温度補償性に関与しているのかを明らかにする。