

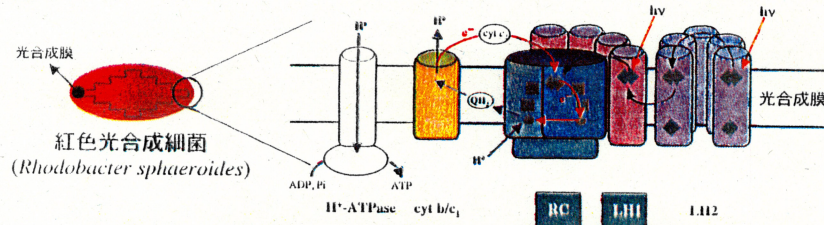
光合成明反応関連機能未知微量膜タンパク質大量発現系の構築とその再構成及び機能解析

要旨

光合成細菌の光合成明反応初期過程における光エネルギーの獲得・利用反応では、光合成色素とポリペプチドが高度に会合し構築された集光性アンテナ・反応中心タンパク質複合体が機能している。

近年、その複合体の機能発現には、PufQ、PufX とよばれる短い膜タンパク質（ポリペプチド）が必要であることが明らかとなってきた。しかし、nativeな系では、それらの膜タンパク質の発現量が著しく少なく、それらの機能—構造は明らかとなっていない。私は、それら膜タンパク質の構造—機能相関に関する知見を得ることを目的として、大腸菌による大量発現系構築を試み成功した。

緒言



光合成明反応は光合成膜に配置された膜タンパク質によって行われる

光合成明反応は

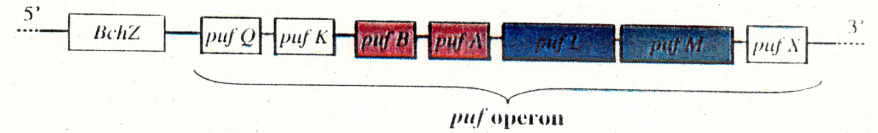
- ・ 光エネルギーの獲得
 - Light Harvesting complex (LH1、LH2)
- ・ 光エネルギーの電気化学ポテンシャルへの変換
 - Reaction Center (RC)、cytochrome *b/c*₁ complex (cyt *b/c*₁)
- ・ 電気化学ポテンシャルを用いたATP合成
 - H⁺-ATPase

で構成されている

RCとLH1の構造遺伝子は *puf operon* とよばれる転写単位に存在している

緒言

R.sphaeroides genomic DNA



- ・ *pufB* は、LH1の構成サブユニット(β サブユニット)をコードする遺伝子
- ・ *pufA* は、LH1の構成サブユニット(α サブユニット)をコードする遺伝子
- ・ *pufL* は、RCの構成サブユニット(Lサブユニット)をコードする遺伝子
- ・ *pufM* は、RCの構成サブユニット(Mサブユニット)をコードする遺伝子

この他に、*puf operon* には、*pufQ*、*pufK*、*pufX*とよばれる機能未知タンパク質の構造遺伝子が存在する

既往の研究から、

- ・ *pufX*は、キノン輸送に關与する膜タンパク質をコードする遺伝子
- ・ *pufQ*は、光合成色素(バクテリオクロフィル)のアセンブリに關与する膜タンパク質をコードする遺伝子

ということが分かっている。
→機能・構造の詳細は分かっている

緒言

PufX



・ PufX について

- 分子量 8,922 Da (82アミノ酸で構成されている)
- 膜貫通部位を持つ

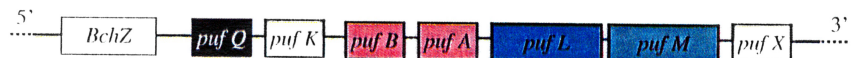
一次構造

NH₂-MADKTIENDIHLNTNPKTNLRLWVAFQMMKKGAGWAGGVVF[□]GTLLLI
G[□]FRVYGRMLPIQENQAPAPNITGALETGIELIKHLV-COOH

□は膜貫通部位

緒言

PufQ



・PufQ について

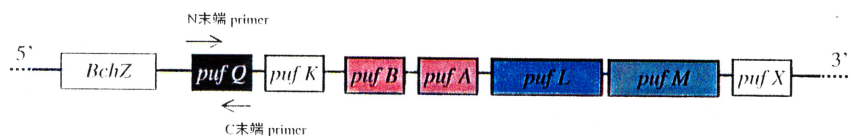
- 分子量 8,656 Da (77アミノ酸で構成されている)
- 膜貫通部位を持つ

一次構造

NH₂-MSDIIAVNTPV HAARAHGHRA PRAEFV VYFA VILLAGAFPVA
FVSWIVSTIR IRRLLPKRGPF ASAWFDAKAI TPLIFRA-COOH

□は膜貫通部位

実験



PCR

PCRにより *pufQ* 遺伝子を増幅

ベクター

- ・ pET15b : N末端にHisタグが付加する
- ・ pET20b : C末端にHisタグが付加する

制限酵素で消化

ライゲーション反応

発現ベクター

大腸菌(BL21(DE3)pLysS)を用いた大量発現

結果

発現確認

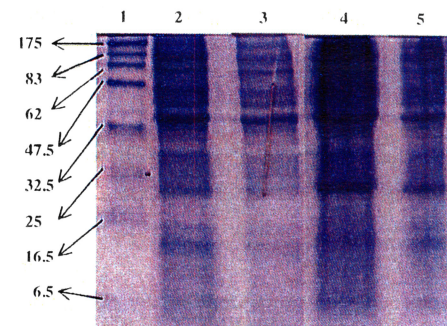


図 発現誘導前後での大腸菌のSDS-PAGE

- 1 : マーカー
- 2 : 発現ベクター(pET20b)、発現誘導前
- 3 : 発現ベクター(pET20b)、発現誘導後
- 4 : 発現ベクター(pET15b)、発現誘導前
- 5 : 発現ベクター(pET15b)、発現誘導後

8.6kDa 近傍に明らかなタンパク質の特異的な発現は観測されなかった

結果

発現確認

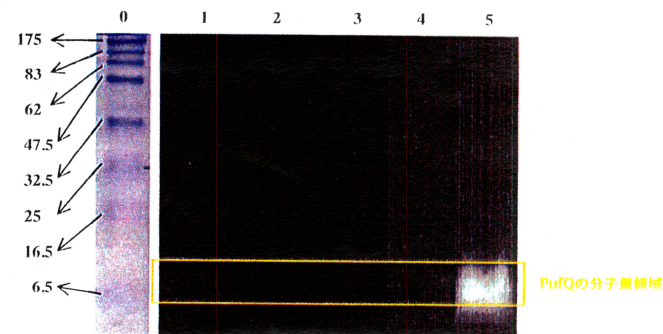


図 発現誘導前後での大腸菌のWesternプロット

- 0 : マーカー (SDS-PAGE)
- 1 : マーカー
- 2 : 発現ベクター(pET20b)、発現誘導前
- 3 : 発現ベクター(pET20b)、発現誘導後
- 4 : 発現ベクター(pET15b)、発現誘導前
- 5 : 発現ベクター(pET15b)、発現誘導後

N末端にHisタグのついたPufQのみが発現

結果

発現確認

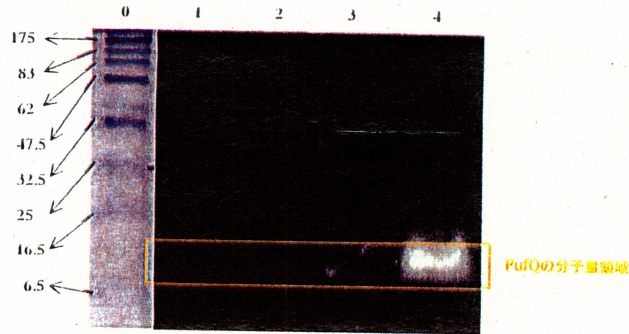


図 発現ベクターによる大腸菌発現の様子 (Western プロット)

- 0 : マーカー (SDS-PAGE)
- 1 : マーカー
- 2 : 発現ベクター(pET20b)、発現誘導後
- 3 : 発現ベクター(pET20b+pelB)、発現誘導後
- 4 : 発現ベクター(pET15b)、発現誘導後

PufQの発現にはN末端の構造が重要である

結果

発現の場所 (発現ベクター : pET15b)

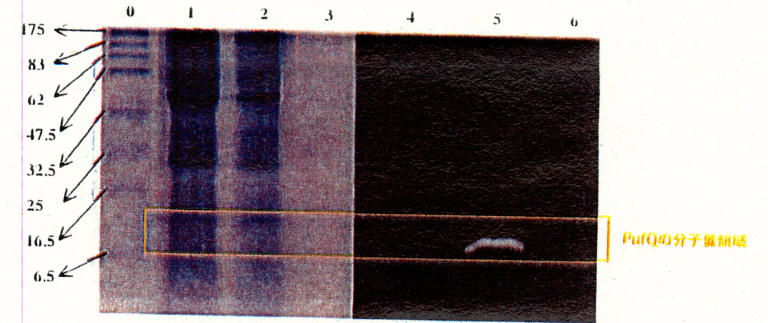
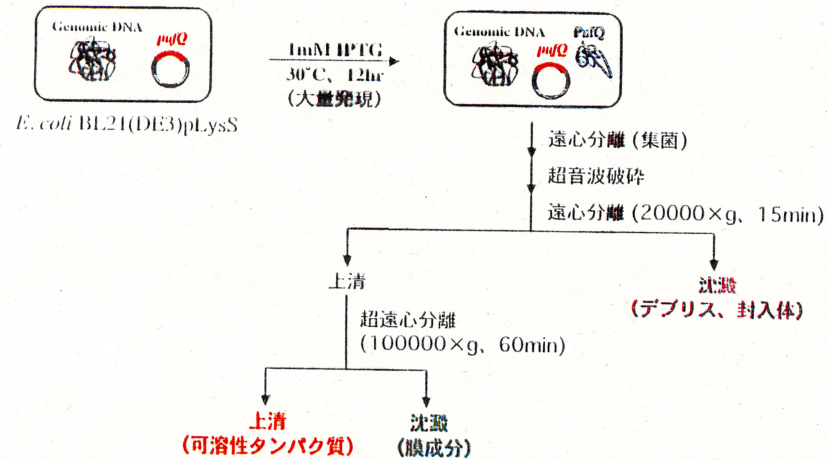


図 発現誘導後の大腸菌の超音波破碎画分

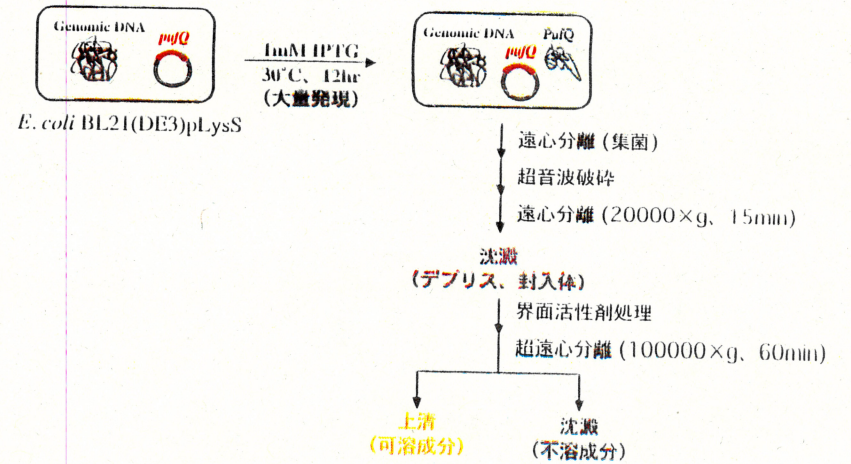
- 0 : マーカー (SDS-PAGE)
- 1 : 細胞膜画分 (SDS-PAGE)
- 2 : デブリス画分 (SDS-PAGE)
- 3 : 可溶性画分 (SDS-PAGE)
- 4 : 細胞膜画分
- 5 : デブリス画分
- 6 : 可溶性画分

PufQはデブリス画分に存在

実験



実験



結果

界面活性剤による可溶化 (発現ベクター: pET15b)

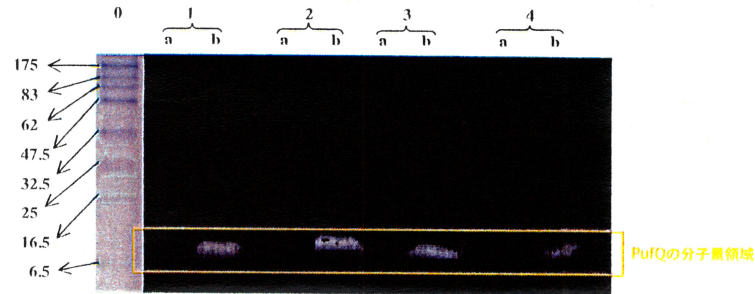


図 デブリス成分の界面活性剤による可溶化 (Western プロット)

- 0: マーカー (SDS-PAGE)
- 1: 3% デオキシコール酸による可溶化処理
- 2: 5% ドデシルジメチルアミン-N-オキサイドによる可溶化処理
- 3: 1.5% トリトンX-100による可溶化処理
- 4: 8% オクタチルグルコシドによる可溶化処理
- (a: 可溶成分, b: 不溶成分)

発現したPufQは主要な界面活性剤には不溶

結果

ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)による可溶化

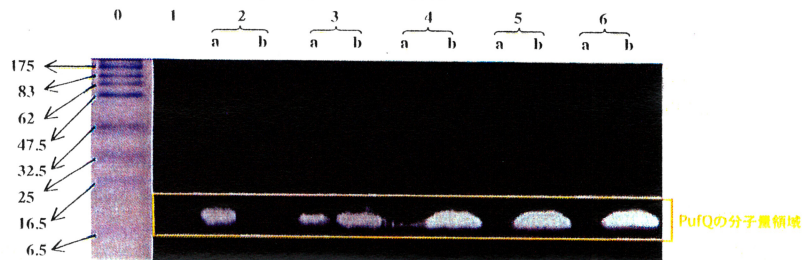


図 デブリス成分のSDSによる可溶化 (Western プロット)

- 0: マーカー (SDS-PAGE)
- 1: マーカー
- 2: 1% SDSによる可溶化処理
- 3: 2% SDSによる可溶化処理
- 4: 3% SDSによる可溶化処理
- 5: 4% SDSによる可溶化処理
- 6: 5% SDSによる可溶化処理
- (a: 不溶成分, b: 可溶成分)

封入体は2%以上のSDSで可溶化が可能である

結論

- PufQ の発現ベクターを構築できた
- PufQ の発現にはN末端の構造が重要
- PufQ は封入体として発現している
- 発現した PufQ の一般的な可溶化は困難
→ 2% SDSで可溶化が可能
- ☆ 今後は PufQ の発現の最適化
 1. 培養温度の最適化
 2. 大量発現と精製
 3. 発現 PufQ の巻戻し