

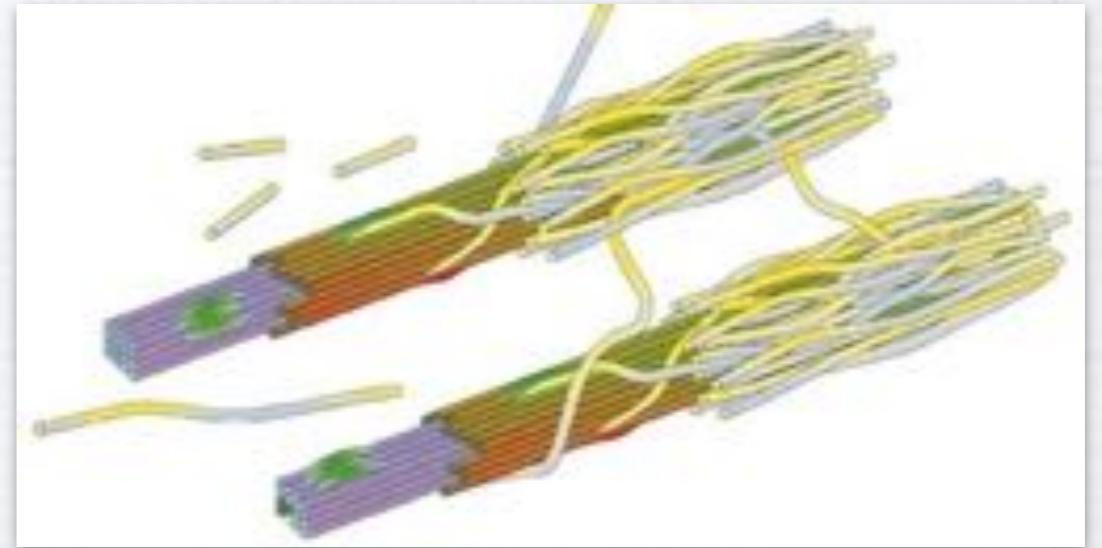
森林化学での蛋白質結晶化

東京大学農学生命科学研究科
生物材料科学専攻 森林化学研究室
石田卓也

主な研究対象



Phanerochaete chrysosporium



植物細胞壁中の多糖ネットワーク

- * 木材を腐朽する糸状菌が菌体外に生産する酵素
 - セルラーゼその他の糖質加水分解酵素
 - ヘミセルロース分解に関わるエステラーゼやその他酸化還元酵素

蛋白質結晶化の流れ

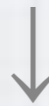
*Pichia pastoris*を用いた発現



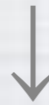
精製



滴定による溶解度の確認



sparse matrixでのスクリーニング



hitした結晶化条件の精密化

*P. pastoris*を用いた発現

- * 分泌生産が可能。
- * 糖鎖付加された蛋白質を生産。
- * 大腸菌よりは遅いけど、糸状菌を用いた発現より簡便。
- * 高い生産性（ファーメンターで数g/L）

精製

(kDa)
250
150
100
75
50
37
25
20

限外濾過 / 硫酸沈澱

- ・ 培地成分の除去
- ・ クロスフロー等の使用

疎水カラム

- ・ TOSOH Toyopearl使用

イオン交換カラム

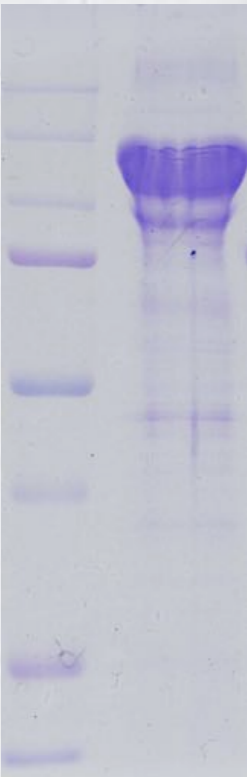
- ・ 疎水カラムの後に脱糖鎖する事が多い

脱N型糖鎖

- ・ 脱糖鎖酵素EndoHを使用
- ・ 必要に応じてMannosidaseやPNGaseを併用

バッファー交換

- ・ 水に置換していた頃も。。。
- ・ 5mM Tris-HCl + 0-100mM NaCl
- ・ 蛋白質濃度は10-20 mg/mLに調整



滴定 → スクリーニング

滴定

- ・ 蛋白溶液に沈澱剤を加え実体顕微鏡で観察
(硫安、PEG3350、MPDなど種類の異なる沈澱剤複数を試す)
- ・ 過飽和になる沈澱剤濃度と完全に沈澱する濃度を確認

sparse matrix

- ・ 上記沈澱剤濃度を参考にしつつ沈澱剤濃度帯が近いmatrixを使用してスクリーニングを仕込む。
- ・ 所持しているsparse matrix
QIAGEN : Nextal JCSG+ kit, MPD suites, PEG suites
HR : CR-1, PEG/Ion, Salt RX, 硫安grid (自作)

結晶化条件精密化

- * まずは自作のリザーバーで再現
 - ・ pHと沈澱剤のグリッドでスクリーニング結果と同等以上の結晶を得る
- * クライオプロテクタントを低濃度で入れてみる。
 - ・ 後々クライオ条件で苦しまないように。。。
- * リガンドを低濃度で入れてみる。
 - ・ 入れた条件でスクリーニングも有り。
- * 溶媒を低濃度で入れてみる。
- * 脱糖鎖条件を変えたサンプルを試してみる。
- * HPLCで精製したものを試してみる。