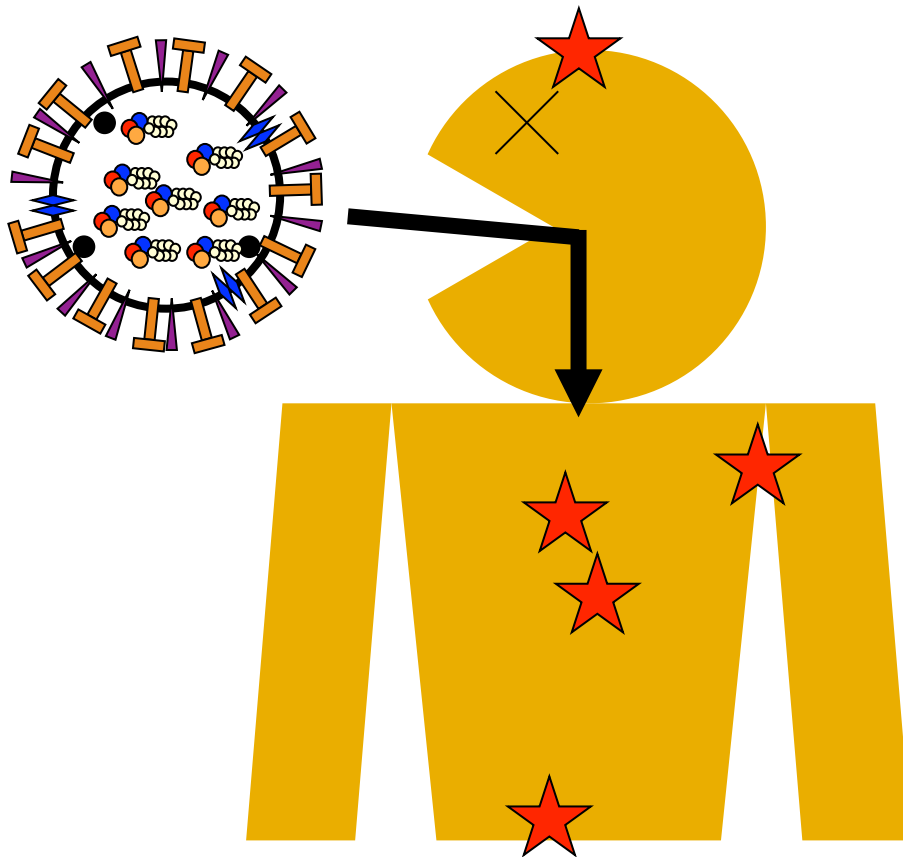


タンパク質A – タンパク質B 複合体の 試料調製と結晶化

横浜市立大学
神奈川科学技術アカデミー
吉田 尚史

インフルエンザ



季節性インフルエンザ

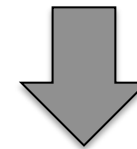
(world wide per year)

感染者数 >1000万人
死者数 ~25万人

パンデミック

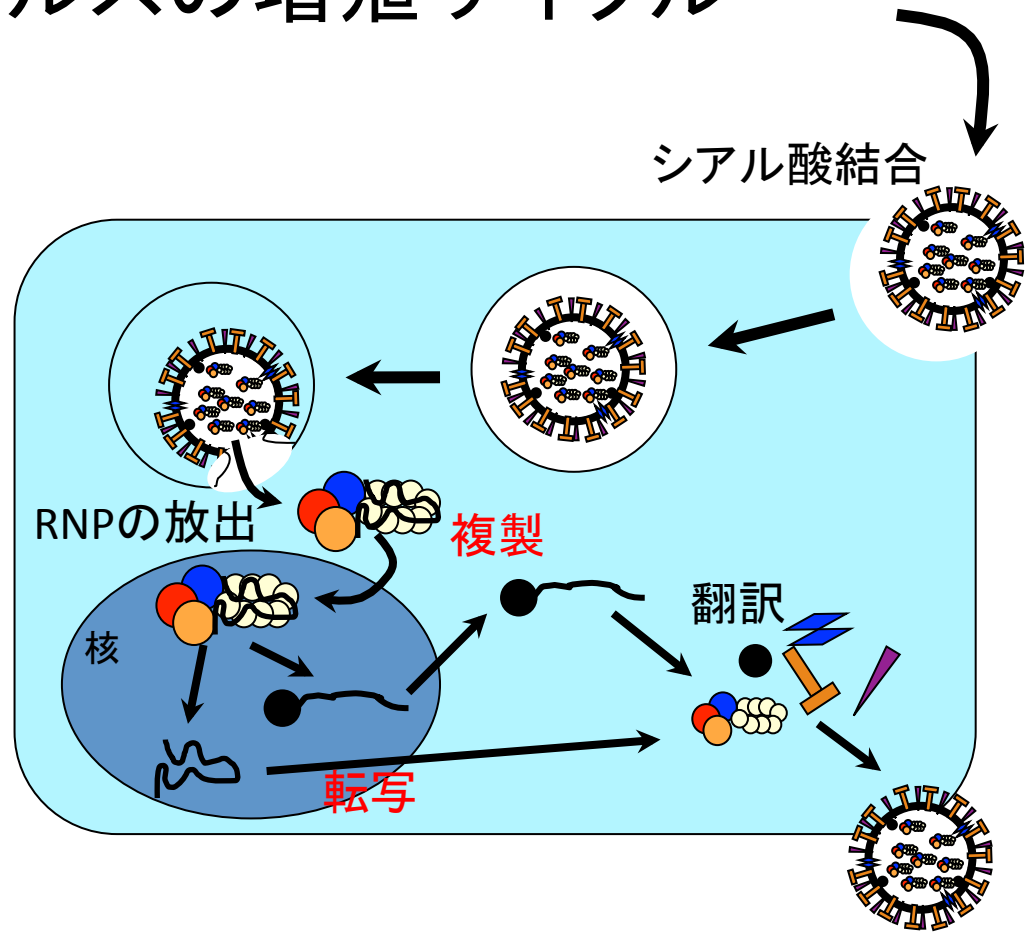
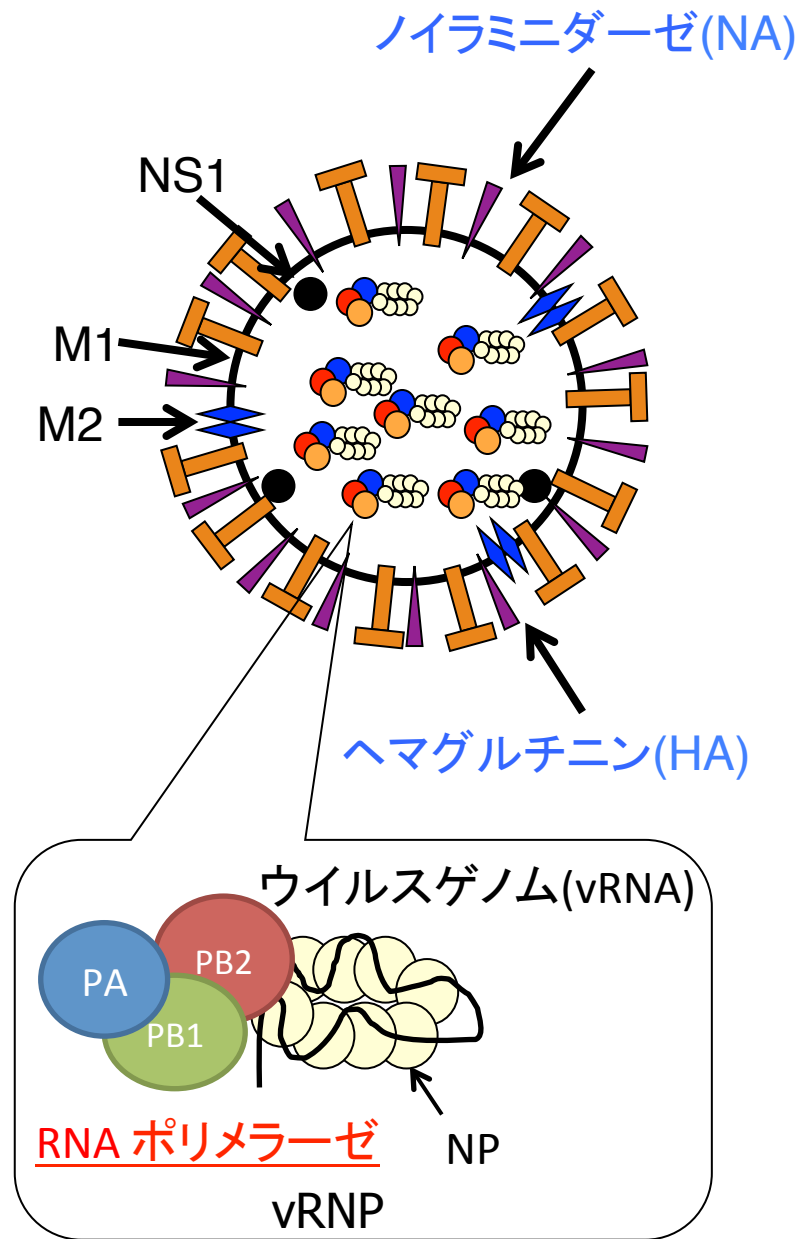
1918年 スペイン風邪 4000万人
1957年 アジア風邪 200万人

2009年 新型インフルエンザ 2万人



H5N1 トリインフルエンザウイルス

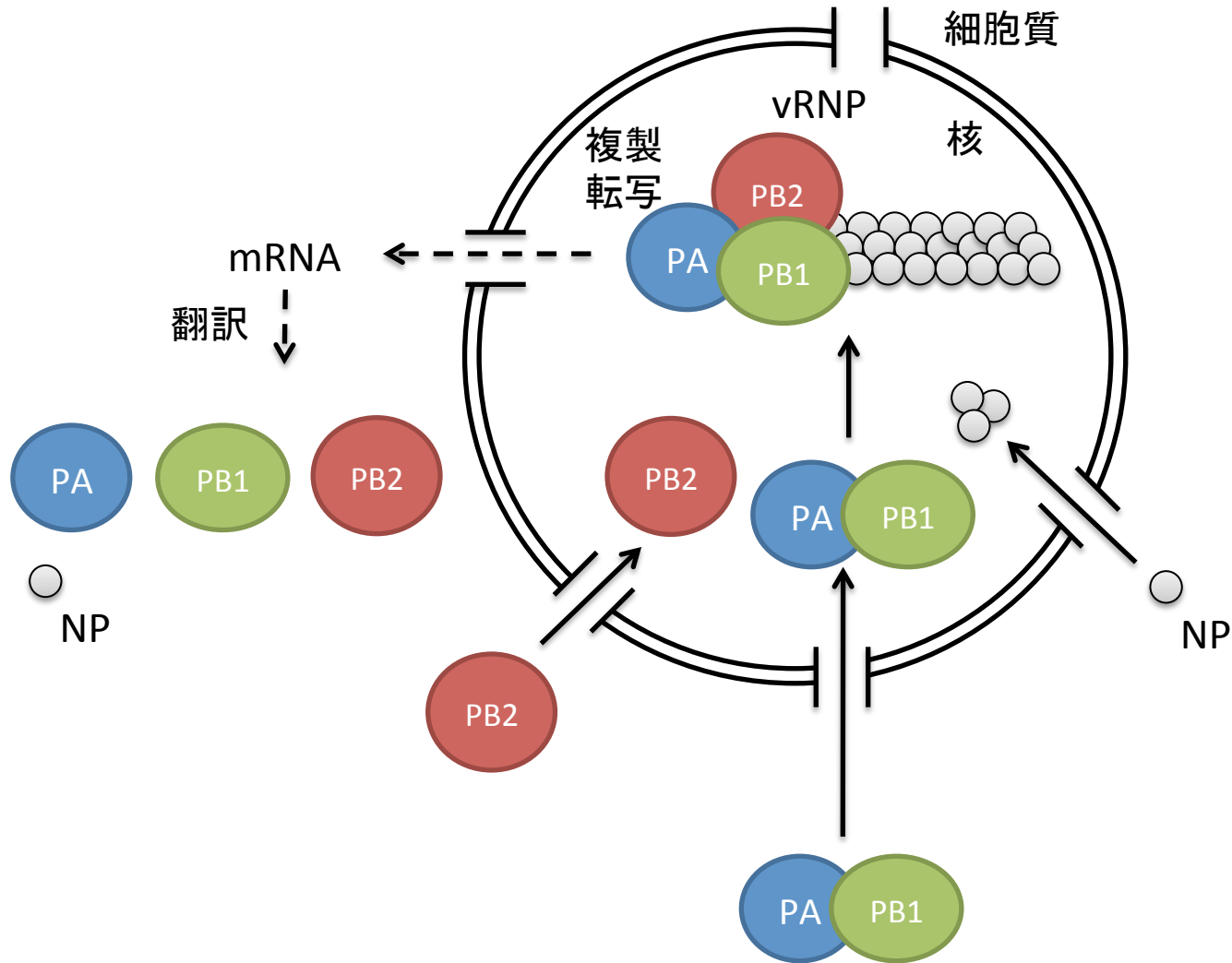
インフルエンザウイルスの増殖サイクル



ウイルスの侵入、増殖

- ① 細胞膜を通過 : ヘマグルチニン(HA)
: ノイラミニダーゼ(NA)
- ② 核膜を通過 : PA, PB1, PB2, NPの核移行

vRNPの核移行サイクル



タンパク質Aの発現と精製



発現

plasmid : pET28
E.coli : BL21(DE3)
codonplus RILP



37°C culture
OD₆₀₀=0.6 , +0.5mM IPTG
15°C O/N culture

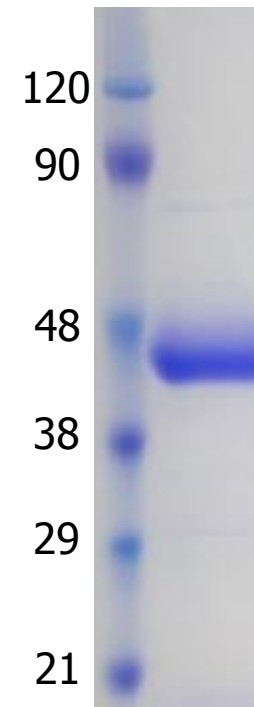
精製

1st Ni-NTA カラム
↓ TEV プロテアーゼ
2nd Ni-NTA カラム



ゲルろ過クロマトグラフィー

タンパク質A



タンパク質Bの発現と精製



T : Total Lysate
S : Supernatant
FT : Flowthrough
W : Wash
E : ELution

発現条件

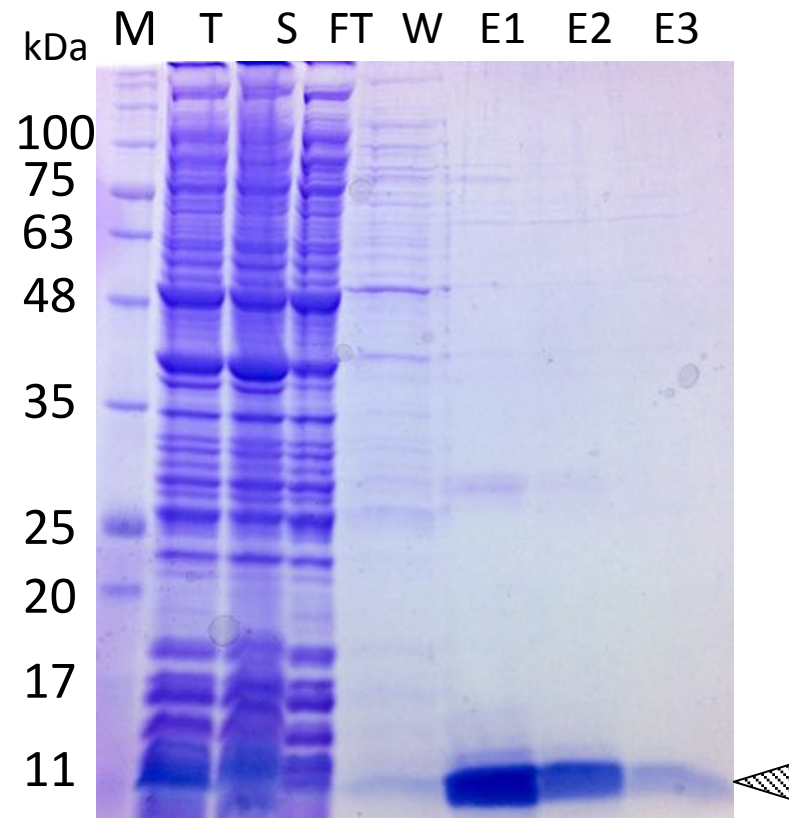
E.coli : BL21 (DE3) codon plus RILP
ベクター : pGEX 6P - 1

培養条件

37°C, 3h
↓ final 0.5mM IPTG
37°C, 3h

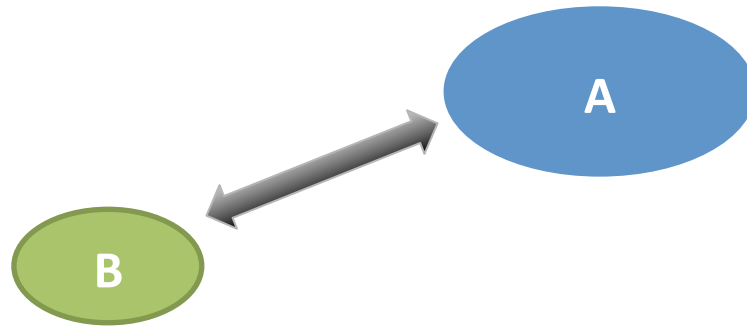
精製条件

GST カラム
↓
SP カラム
↓
ゲルろ過クロマトグラフィー



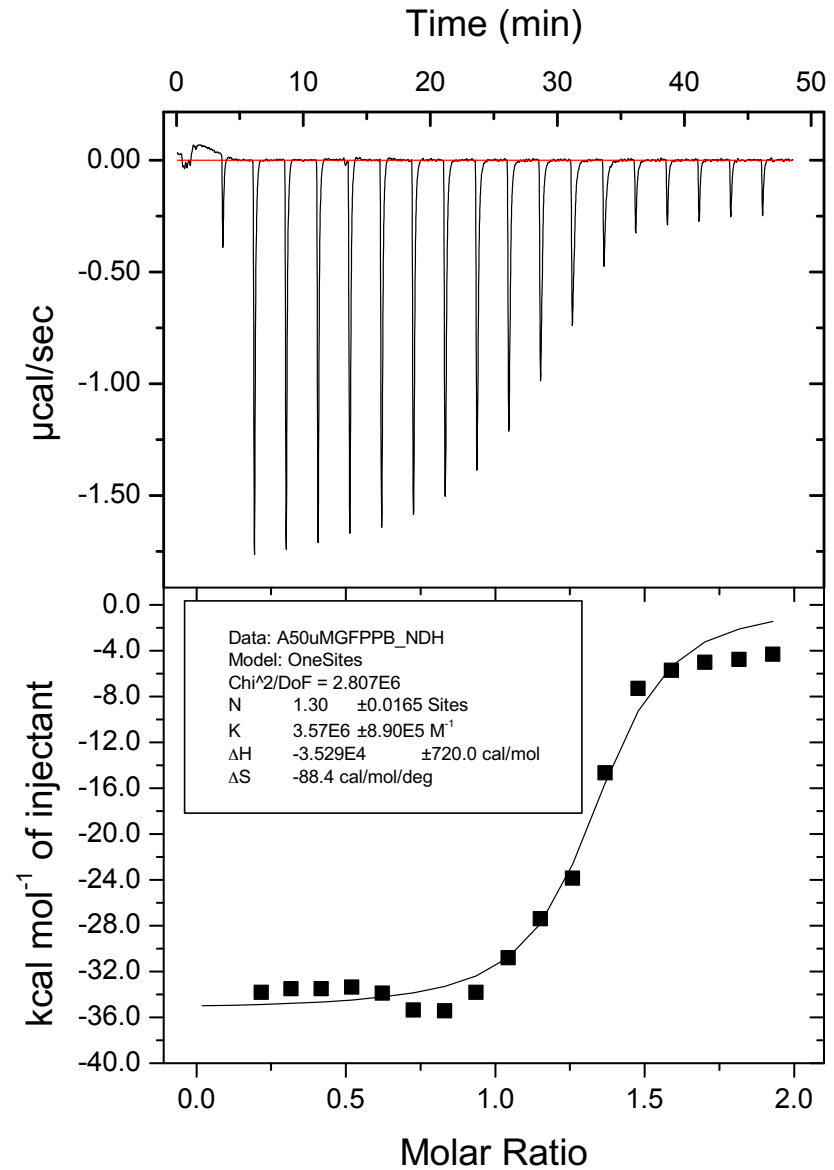
相互作用解析

ITC (等温滴定型カロリメータ)



K_d (解離定数)	
182 - 243	: 263 nM
182 - 217	: 280 nM

タンパク質Bとタンパク質Aが結合
→ 共結晶化



共発現系による試料調製



発現条件

E.coli : BL21 (DE3) codon plus RILP
ベクター: pET28a

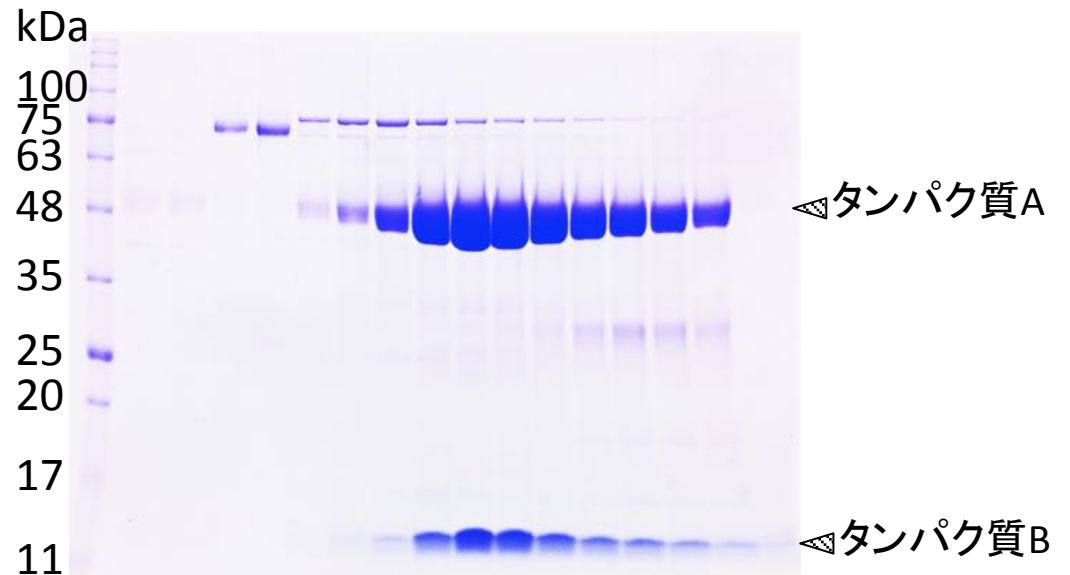
培養条件

37°C, 3h
↓ final 0.5mM IPTG
37°C, 3h

精製条件

Ni-NTA カラム
↓ + TEV プロテアーゼ
Ni-NTA カラム
↓
ゲルろ過クロマトグラフィー

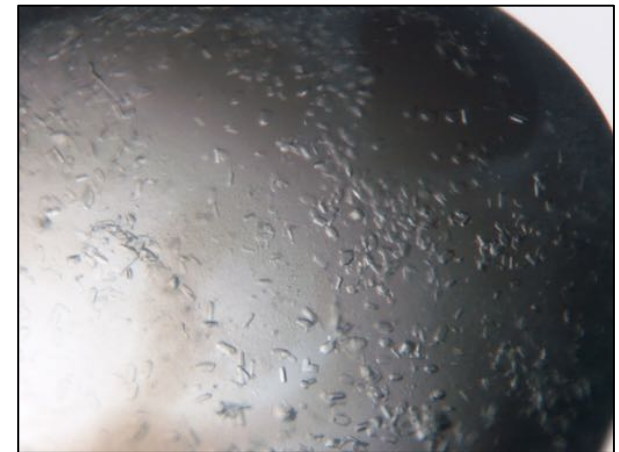
ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製結果



結晶化スクリーニング

結晶化濃度: 15 mg/ml

結晶化期間: 1~2日



結晶化条件

0.1M CHES pH 9.5
20%(w/v) PEG8000

0.2M Potassium Formate
10% PEG 3350

0.1M MES pH5.0
5%(w/v) PEG6000

X線回折実験

結晶化条件

0.2M Potassium Formate

20% PEG 3350



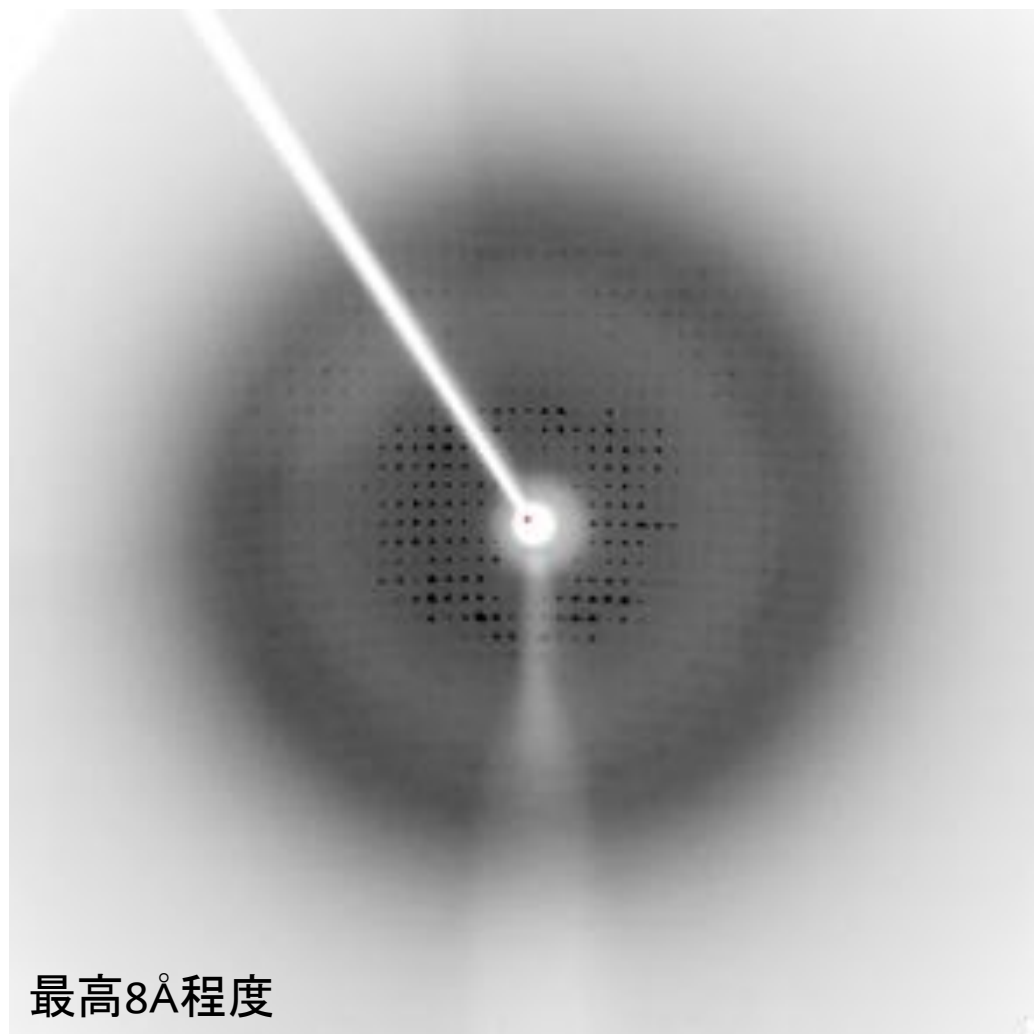
測定条件

検出器 R-axisIV++

露光時間 30 min

カメラ距離 200 mm

振動角 1°



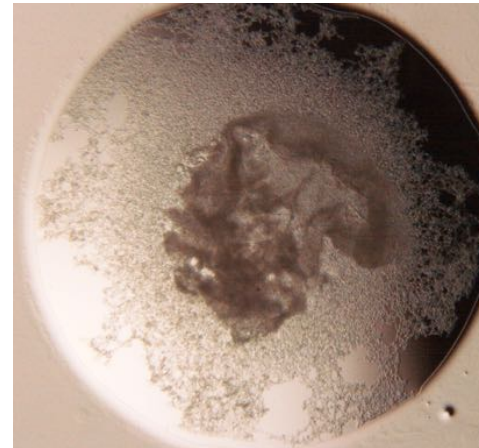
最高8Å程度

結晶化条件の検討

Additive Screen (Hampton Research社)

- 54. 30 % Glucose
- 55. 30 % Sucrose
- 56. 30 % Xylitol
- 57. 30 % Sorbitol
- 58. 12 % myo-Inositol
- 59. 30 % Trehalose-dihydrate
- 60. 30 % Galactose

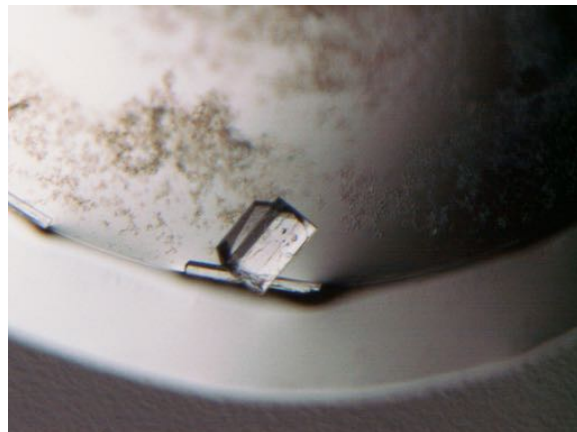
結晶なし



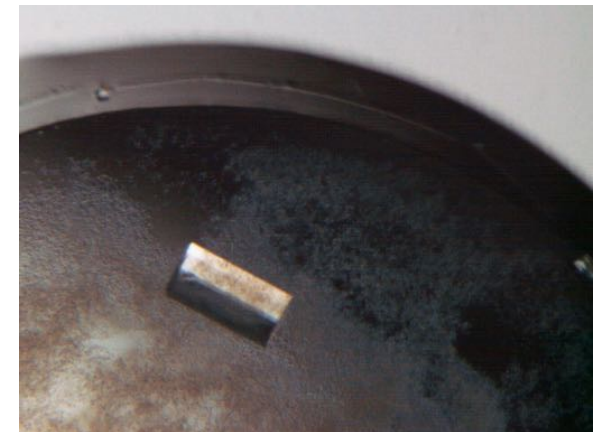
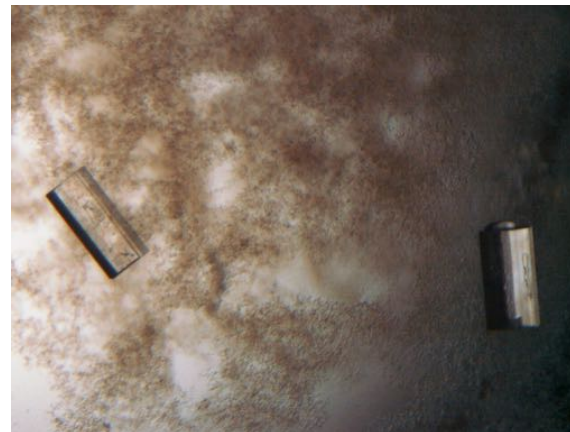
改善なし



30% Sucrose



30% Trehalose-dihydrate



まとめ

- タンパク質A – タンパク質B の共発現系を構築することで、
安定な結晶化試料の調製が可能.
- 糖 (Sucrose、Trehalose) を添加することで、単結晶が析出した.