

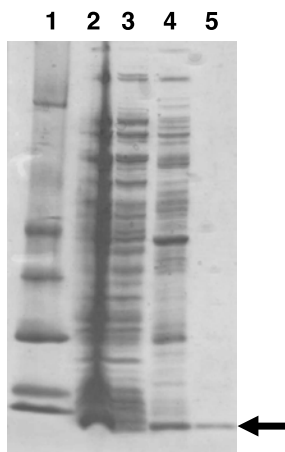
大阪市立大学人工光合成研究拠点 共同利用・共同研究課題成果 研究課題名

2016年度・2017年度：酸化型ルビスコを還元するCYO2蛋白質の結晶化スクリーニング
2018年度：BSD2とルビスコの共結晶化スクリーニング

広島大学大学院理学研究科 島田裕士

大腸菌用発現ベクターpET24aにCYO2/BSD2遺伝子を組み込み、タンパク質発現用大腸菌BL21-CodonPlus (DE3)へ導入した。作成した大腸菌の培養条件・発現誘導剤IPTGの濃度等を最適化し、CYO2/BSD2タンパク質の大量精製を行った(右図)。1,000 mlの大腸菌培養液からそれぞれ2.0 mg/ml (0.22 mM)と2.3 mg/ml (0.25 mM)濃度のタンパク質溶液1 mlを得た。タンパク質結晶化条件としてはタンパク質濃度が十分ではなかったが、2種の結晶化スクリーニングキット(The PGA screen (MD1-50)とMemGold (MD1-39)で結晶化を試みた。また、CYO2タンパク質をAmicon (3k MWCO)で13.2mg/mlまで濃縮後結晶化スクリーニングキット

(MemGold)での結晶化も試みた。1週間後と1月後にそれぞれ結晶観察を行ったところ、ウニ状の結晶が観察された。現在、結晶の析出の再現性を確認している。今後結晶析出の再現性の確認を進め、結晶ができ次第、大阪市立大学所蔵のX線発生装置を利用して解析パターンのチェックを行う予定である。



1: マーカー
2: 大腸菌素抽出液
3: カラム素通り画分
4: 30 mMイミダゾール画分
5: 200 mMイミダゾール画分
矢印: 目的タンパク質

結晶化条件

- CYO2/BSD2 (2.0 mg/mL; UV法では2.7 mg/mL): 送付された状態の試料
 - 使用スクリーニングキット
 - The PGA screen (MD1-50): Box 1/2, 2/2 (sample : buffer = 1 μ L : 1 μ L)
 - MemGold (MD1-39): Box 1/2, 2/2 (sample : buffer = 1 μ L : 1 μ L)
- 濃縮CYO2/BSD2 (13.2 mg/mL)
 - Amicon (3k MWCO)を使用
 - 使用スクリーニングキット
 - MemGold (MD1-39): Box 1/2, 2/2 (sample : buffer = 1 μ L : 1 μ L)

結晶化方法

シッティングドロップ蒸気拡散法, 20 °C, 大気下
仕込んで1週間後に結晶観察



結晶化スクリーニングキットを用いて結晶化を試みた。1週間後と1月後にそれぞれ結晶観察を行ったところ、ウニ状の結晶が観察された。現在、結晶の再現性を確認している。