

2. ABCインポーター

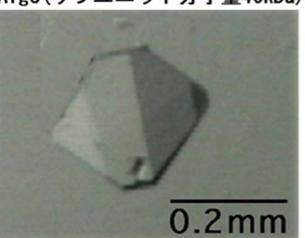
ABCインポーター(ABCタンパク質)の結晶化

AlgS(サブユニット分子量40kDa)

X線回折データの収集	
結晶系	単斜晶系
空間群	$P2_1$
格子定数 a, b, c (Å)	57.4, 92.7, 65.8
β (deg.)	102.3
分子数	2 / 非対称単位
データ測定	X線源
	Cu-K α
測定器	マルチワイヤー (Burker Hi-star)
分解能 (Å)	3.2
測定反射数	35,988
独立反射数	11,498
完全性 (I/I ₀ %)	98.1
R_{sym} 因子 (%)	10.4

結晶化条件

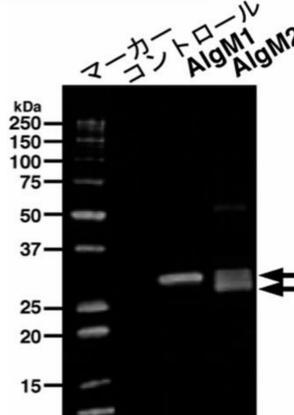
- 1M リン酸アンモニウム
- 0.1M クエン酸ナトリウム (pH5.6)
- 20% グリセロール
- 20°C, 3ヶ月



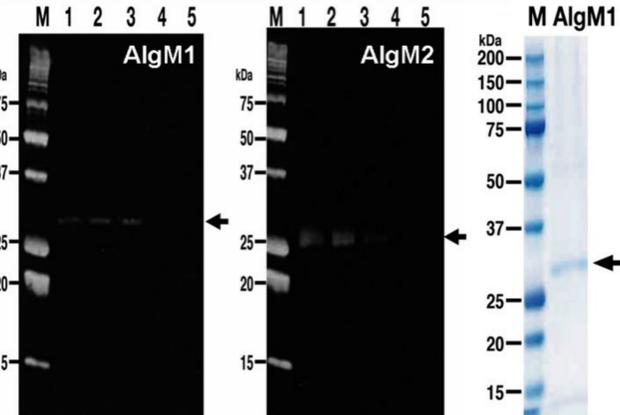
ABCインポーター(膜タンパク質)の発現

バキュロウイルス $algM1\ his_6$ → 昆虫細胞 *expressSf+T*

バキュロウイルス $algM2\ his_6$ → 昆虫細胞 *expressSf+T*



ABCインポーター(膜タンパク質)の精製



AlgM1-AlgM2/AlgS-AlgS複合体発現系の構築

発現ベクター

- pET21b₊AlgS-AlgM1-AlgM2-Hisx6
- pET21b₊AlgS-AlgM1-AlgM2-Hisx6 (AlgS-AlgM1間pETベクター由来配列)
- pET19b₊Hisx10-AlgM1-AlgM2-AlgS
- pET21b₊AlgM1-AlgM2-Hisx6, pCOLADuet-1₊AlgS
- pET19b₊Hisx10-AlgM1-AlgM2, pCOLADuet-1₊AlgS

発現宿主

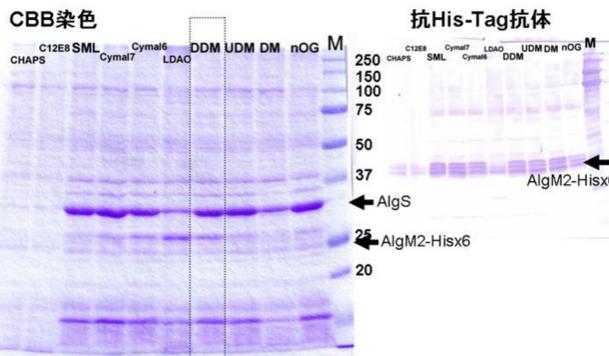
- BL21(DE3), ② BL21(DE3)pLysS
- BL21-Gold(DE3), ④ BL21-Gold(DE3)pLysS
- BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, ⑥ BL21-CodonPlus(DE3)-RP
- C41(DE3), ⑧ C43(DE3)
- Rosetta-gamiB(DE3)
- HMS174(DE3), ⑩ HMS174(DE3)pLysS
- Rosetta-gami2(DE3)

発現系として選択

AlgM1-AlgM2/AlgS-AlgS複合体の可溶性

CBB染色

抗His-Tag抗体



ABCインポーター複合体の発現と精製

培地 TB + 1% Glc + 2 mM MgSO₄ 1.5 L

↓ 0.4 mM IPTG誘導後、25°C、22 h培養

菌体 10 g

↓ 超音波破碎

総タンパク質 300 mg

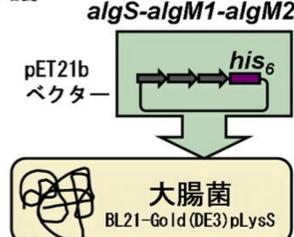
↓ 超遠心とDDMによる可溶性

DDM可溶性膜タンパク質 50 mg

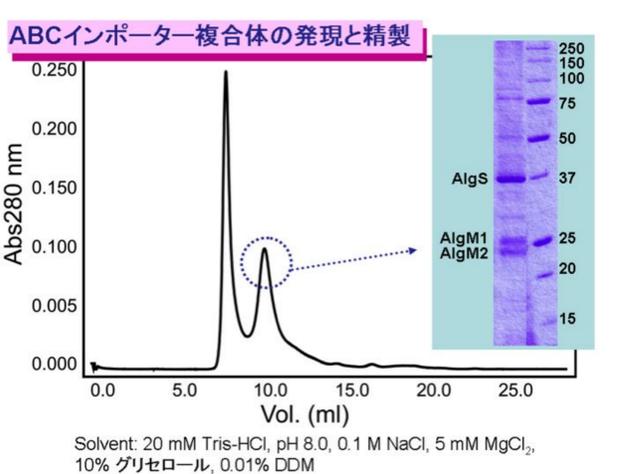
↓ IMAC: Ni-NTA agarose (5 ml)

↓ ゲルろ過: Superdex200 10/300GL (24 ml)

精製AlgM1-AlgM2/AlgS-AlgS複合体 0.5 mg

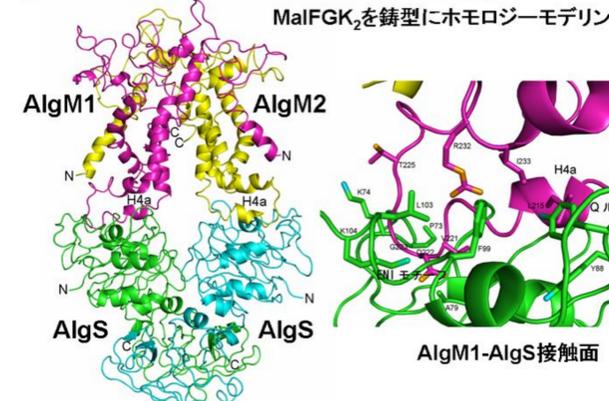


3. 多糖分解酵素



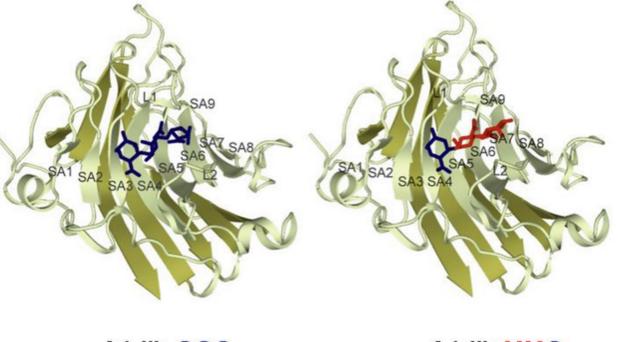
ABCインポーター構造 (in silicoモデル)

MaiFGK₂を鋳型にホモロジーモデリング



アルギン酸リナーゼA1-II' (バイオフィルム分解)

アルギン酸: グルロン酸(G) + マンヌロン酸(M)

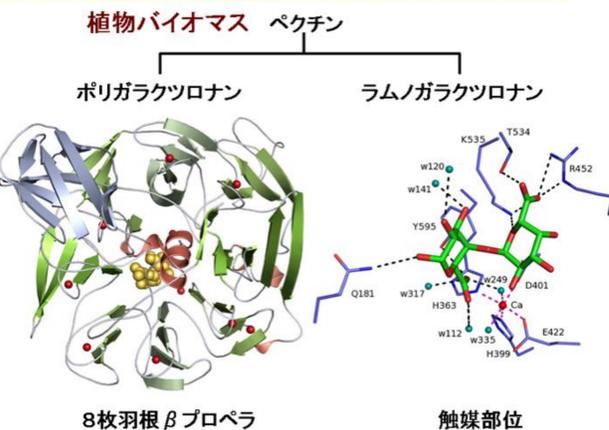


ラムノガラクトソナンリナーゼYesW (エンド型)

植物バイオマス ペクチン

ポリガラクトソナン

ラムノガラクトソナン

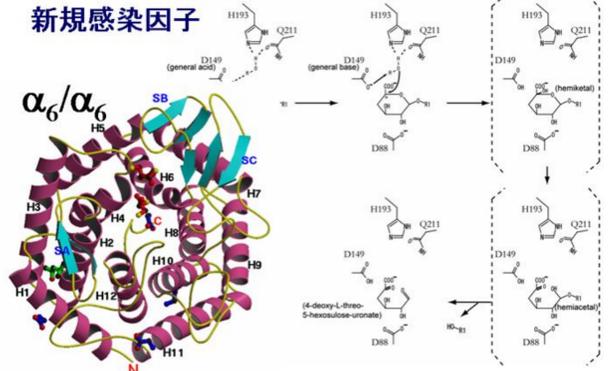


8枚羽根βプロペラ

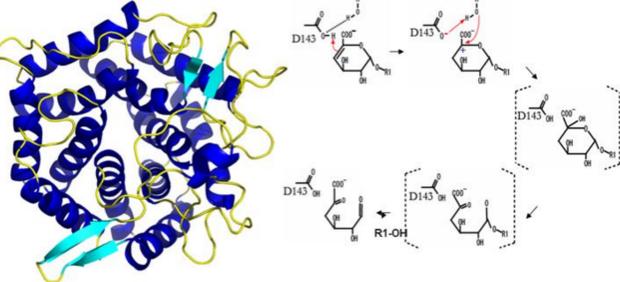
不飽和グルクロニルヒドロラーゼ

新規感染因子

α_6/α_6



不飽和ラムノガラクトソナンヒドロラーゼ YteR



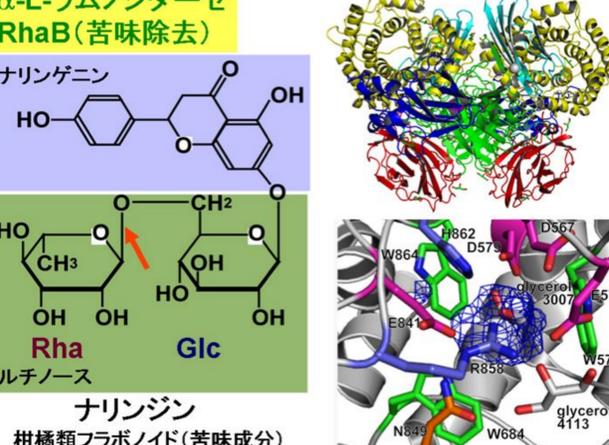
α -L-ラムノダーゼ RhaB (苦味除去)

ナリンゲニン

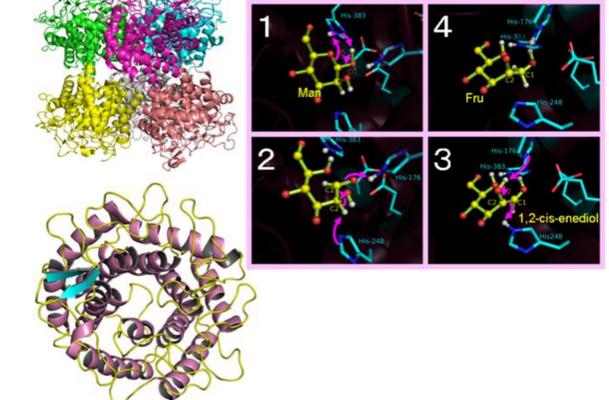
ルチノース

ナリンジン

柑橘類フラボノイド(苦味成分)



サルモネラ菌由来マンノースイソメラーゼ YihS



今後の展望

- (1)細胞表層レセプター
 - アルギン酸結合ドメインの構造解析
 - 細胞表層局在化機構の解析
- (2)ABCインポーター
 - 再構成系の構築: 複合体精製系の確立
 - in silico*モデルに基づく機能解析
- (3)多糖分解酵素
 - 抗原性・作用様式に関する構造解析
 - 食品・環境分野への至適化酵素の設計