

Title	超好熱菌由来タンパク質の温度に依存したフォールディングの分光学的解析
Author(s)	岡野定, 雅弘
Citation	
Issue Date	2003-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/3012
Rights	
Description	Supervisor:高木 昌宏, 材料科学研究科, 修士

超好熱菌由来タンパク質の温度に依存したフォールディングの分光学的解析

岡野定 雅弘 (高木研究室)

【 目的 】 タンパク質は生合成されたのち、フォールディングして機能的立体構造 (ネイティブ構造) を形成する。フォールディングは熱力学的エネルギーの最小値へ自発的に至る過程とされている (Anfinsen のドグマ) 。我々の研究室では超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株由来 DNA 修復酵素 *6*-methylguanine-DNA methyltransferase (*Tk*-MGMT) のフォールディングを研究してきた過程において、低温でトラップされる構造があるという予備的な結果を得ている。この熱成熟と呼ぶ現象は Anfinsen のドグマに従わない例である。本研究ではフォールディングの温度依存性を分光学的に解析することを目的とした。

【 実験 】 *Tk*-MGMT を組換えタンパク質として大腸菌で発現させ精製した。*Tk*-MGMT を 7.2 M グアニジン塩酸塩でアンフォールディングさせたのち、透析によりグアニジン塩酸塩を除いてリフォールディングさせた。4 および 26 、 37 でそれぞれリフォールディングさせた *Tk*-MGMT を 40 ~ 85 で 15 分間加熱し、円偏光二色性 (CD) スペクトルを用いて解析した。さらにリフォールディング速度が速い場合 (希釈) と遅い場合 (段階透析) で構造形成に与える影響を CD スペクトルを用いて比較した。続いて立体構造を明らかにするため、まずネイティブ構造を NMR で測定して構造の解析を試みた。安定同位体 (^{13}C 、 ^{15}N) でラベルした M9 培地での発現系を構築して、 ^{15}N ラベル *Tk*-MGMT のネイティブ構造の $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC (Heteronuclear single quantum coherence) スペクトルを測定した。次に $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル *Tk*-MGMT のネイティブ構造を、TROSY (Transverse relaxation-optimized spectroscopy) 法を用いて、アミド水素とアミド窒素、 α 炭素の化学シフト間の相関が得られる HNCA スペクトルを測定した。

【 結果・考察 】 4 でリフォールディングさせた構造 ($[\theta]_{222\text{nm}} = \text{約 } 11,500$) と 26 でリフォールディングさせた構造 ($[\theta]_{222\text{nm}} = \text{約 } 12,000$) はともに、ネイティブ構造 ($[\theta]_{222\text{nm}} = \text{約 } 14,500$) と異なる $[\theta]_{222\text{nm}}$ 値を示した。一方、37 でリフォールディングさせた構造はネイティブ構造とほぼ一致する $[\theta]_{222\text{nm}}$ 値を示した。希釈によるリフォールディングは、4 と 37 とともに一定構造 ($[\theta]_{222\text{nm}} = \text{約 } 10,000$) にトラップされた。一方、段階透析によるリフォールディングは、4 と 37 とともにネイティブ構造に近い $[\theta]_{222\text{nm}}$ 値 ($[\theta]_{222\text{nm}} = 13,800$) を示した。これらの結果から、*Tk*-MGMT は温度に依存して一定構造にトラップされ、フォールディング速度を遅くさせることでネイティブ構造を形成することが示唆された。立体構造を解析するため、M9 培地 1 L 当り 2 ~ 3 mg の $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル *Tk*-MGMT を取得する条件を決定した。 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC スペクトル (^{15}N の化学シフト 100 ppm ~ 130 ppm、 ^1H の化学シフト 5.6 ppm ~ 10.4 ppm の範囲) に約 174 個のシグナル数が観測され、このうちトリプトファンの側鎖に相当と考えられるシグナルが 4 個検出された。*Tk*-MGMT は残基数が 174 で、側鎖にアスパラギンを 4 個とグルタミンを 2 個、ヒスチジンを 4 個、リシンを 14 個、アルギニンを 11 個、トリプトファンを 3 個もつため NH のシグナル数は少なくとも 227 個になり、いくつかのシグナルの縮重があると考えられた。このシグナルの縮重は ^{13}C 軸を導入する三次元スペクトルの測定で分離できると判断した。TROSY 法で HNCA スペクトルを測定したが、立体構造を決定するために必要なシグナル数を得ることができなかった。この原因として、*Tk*-MGMT が濃度 1 mM 以上で特異的会合体を形成することなどが考えられた。

Keyword : 超好熱菌、*Tk*-MGMT、フォールディング、CD、NMR