

Title	超好熱菌由来グルタミン酸脱水素酵素の熱による構造成熟の解析
Author(s)	泉川, 直重
Citation	
Issue Date	2003-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/3013
Rights	
Description	Supervisor:高木 昌宏, 材料科学研究科, 修士

超好熱菌由来グルタミン酸脱水素酵素の熱による構造成熟の解析

高木研究室 泉川 直重

【目的】*Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株由来のグルタミン酸脱水素酵素 (*Tk*-GDH) を組換え体として発現させると、天然とは異なった構造が蓄積し、加熱により天然類似構造を形成することが知られている。この熱による構造転移は熱成熟と呼ばれ、数種類の超好熱菌由来タンパク質で観察されている。しかし、熱成熟の詳細な過程はまだ明らかになっていない。そこで本研究では、熱成熟の過程を分光学的に直接観察し、解析することを目的とした。

【方法】*Tk*-GDH を組換えタンパク質として大腸菌で発現させた。熱の影響を最小にするために、全て 4 で精製した。熱成熟時に見られる二次構造および三次構造の変化を円偏光二色性 (CD) スペクトルで測定した。1 /分の割合で昇温および降温し、その間の熱成熟に伴う構造の変化を CD 222 nm で測定した。共有結合性および見かけの大きさの変化は SDS-PAGE とゲル濾過クロマトグラフィーでそれぞれ確認した。活性は、L-グルタミン酸の脱アミノ化反応時に産生される NAD(P)H の吸収 340 nm の経時変化を測定した。温度ジャンプによる構造変化は次のように測定した。まず 0 M ~ 1 M の塩化ナトリウムを含む、30 ~ 80 に保温した緩衝液を準備した。次に *Tk*-GDH を準備した緩衝液に滴下し、CD 222 nm の経時変化を測定した。

【結果と考察】大量調製した *Tk*-GDH が熱成熟するかを CD で測定した。その結果、熱を加えると α ヘリックス含量が約 3%減少することが分かった。また昇温に伴う熱成熟を CD 222 nm の固定波長で直接測定した結果、50 付近で構造が転移することが分かった。一度熱成熟すると、冷却や再加熱でも元のスペクトルと重ならないことから、この熱成熟は不可逆であることが分かった。熱成熟前後の二つの構造について SDS-PAGE で確認したところ、新しいバンドの出現や泳動距離に変化はなかった。またゲル濾過クロマトグラフィーの結果から、新しいピークは見られず、溶出位置も同じであった。このことから、熱成熟は、共有結合性の変化や見かけの大きさの変化では無いことが分かった。

熱成熟に伴う構造変化が熱変性によるものかを活性測定で調べた。その結果、加熱温度が高いほど高活性を示し、70 で加熱した場合には活性が最大になった。このことから、加熱による CD の変化は熱変性ではなく、構造が天然型へと近づくためだと考えた。

また熱成熟には、*Tk*-GDH のサブユニット間に多く存在するイオンペアが関与していると予想される。そこで塩化ナトリウム濃度が異なる、各温度に保温した緩衝液に *Tk*-GDH を滴下し、CD 222 nm の経時変化を測定した。その結果、イオン強度が高いほど熱成熟の速度定数が小さくなった。このことから、熱成熟には新しいイオンペアの形成が関与していることが示唆された。

Key Word: Hyperthermophilic Protein, Archaea, Glutamate Dehydrogenase, Protein Folding,