

- 629 金属結合能を増強したヒトメタロチオネイン-2の創製
 ○佐々木真理子、外山光俊、*平山令明、山下光雄、室岡義勝
 (阪大院・工・応生工、*東海大・開発工)

【目的】金属は、タンパク質の構造や多くの酵素の活性に重要である。本研究では、金属含有量の高いヒトメタロチオネイン-2(hMT-2)を用い、タンパク質工学的手法によりこのタンパクに新たな金属結合部位を付加することにより、金属結合能を増強した hMT-2 を作成することを目的とした。

【方法及び結果】ホモロジーモデリングにより、新たな金属結合部位を作り出せるのではないかと推測されるアミノ酸残基を探索した。タンパク質工学的手法により、このアミノ酸残基を置換し、Cd 及び Zn と結合した変異 hMT-2 を精製した。pH 滴定により金属の解離度を、UV 吸収を指標とした hMT-2 と金属の比及び原子吸光法により金属結合数を求めた。この結果、変異 hMT-2 では、pH 安定性が向上し、金属結合数も増加したことが確認できた。

Construction of human metallothionein-2 with the increased metal-binding ability

○Mariko Sasaki, Mitsutoshi Toyama, *Noriaki Hirayama, Mitsuo Yamashita, Yoshikatsu Murooka (Dept. of Biotechnol., Osaka Univ. and *Dept. of Biological Science and Technology, Tokai Univ.)

【Key words】metallothionein, heavy metal, site-directed mutagenesis, homology modeling

- 630 超好熱菌由来タンパク質の耐熱性に対するイオンペアの役割
 ○白木 賢太郎¹, 錦織 伸吾¹, 藤原 伸介¹, 高木 昌宏², 今中 忠行³
 (¹阪大院・工・応生, ²北陸先端・材料, ³京大院・工・合成生化, CREST今中プロジェクト)

【目的】超好熱始源菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 由来 O⁶-methylguanin-DNA methyltransferase (MGMT) は α -ヘリックス上にイオンペアが非常に多い。これらのイオンペアが、MGMTの耐熱化や安定化に寄与しているかを調べるため、イオンペア欠損変異体の熱力学的解析を広い温度範囲で行うことを目的とした。

【結果と考察】変異導入は、ヘリックス間やヘリックス内だけでなく、ドメイン間や内部、外部など異なった特徴をもった部位にし、六種類の変異体MGMTを調製した。変異体の ΔG を 10°C から 70°C で求めた。E93A は全ての温度範囲で 4 kJ/mol 程度低下し、他は 1 kJ/mol 程度低下した。さらに、タンパク質表面に位置するヘリックス内イオンペアそのものの安定性を二重変異サイクル法によって算出したが、10°C から 70°C で 1 kJ/mol 程度の寄与しかなかった。E93 は、ヘリックスを結ぶだけでなく、内部にあり、ネットワークを形成し、ドメイン間を結ぶ、という特徴があった。内部にあるイオンペアでも安定性と耐熱性に寄与しないものもあったことから、イオンペアの耐熱性への寄与は、露出表面積だけでなく、位置が大切なのではなかろうか。

Electrostatic Role of Ion-pairs for Thermal Stability of a Hyperthermophilic Protein.

Kentaro Shiraki¹, Shingo Nishikori¹, Shinsuke Fujiwara¹, Masahiro Takagi², and Tadayuki Imanaka³. ¹Dept. Biotechnol., Osaka-Univ., ²School of Material Sci., JAIST, ³Dept. Synth. Chem. & Biol. Chem., Kyoto-Univ., JST-CREST.

【Key Words】Protein Folding, Thermal Stability, Thermodynamics, Ion-pair, Archaea