

細菌種由来 GroEL の高次構造解析

なかむら たかみち　くろす やすろう

○ 中村 孝道、 久留主 泰朗

茨城大 農学部 資源生物科学科

【目的】分子シャペロン GroE は、細胞内蛋白質の正常な高次構造形成に中心的に働き、また GroEL は細菌からヒトまで遺伝的保存性が高く細胞機能に重要な役割を担っている。特に、大腸菌 GroEL は ATPase 領域、GroES、基質ポリペプチドとの結合領域、サブユニット会合領域等、様々な機能が解明され現在でも精力的に研究されている。我々は様々な温度域に至適増殖能を示す多数の細菌由来 GroEL のアミノ酸相同性を比較したところ、全体では高い相同性を示すが C 末端領域(Equatorial domain)が他の保存領域(Apical domain と Intermediate domain)と比べ非常に低い相同性を見出した。これまでに我々は、GroEL の四次構造に深く関与する C 末端領域が、Refolding の反応温度に関与していることを明らかにした。本研究では、大腸菌 GroE を主として用い、GroEL 高次構造形成に着目して GroEL の反応温度と C 末端アミノ酸配列(Equatorial domain)の多様性について解析したので報告する。

【方法】本研究には、低温細菌に *Pseudoalteromonas* sp. PS1M3 株、常温細菌に *Escherichia coli* K-12株、高温菌に北海道豊羽鉦山地下熱水中から分離した *Thermus* sp. TB1 株を選択し、各々の細菌から *groES* および *groEL* 遺伝子を単離、両蛋白質の発現精製に用いた。また、GroEL の C 末端領域を置換した様々な融合型 GroEL、部位特異的変異導入した変異型 GroEL を作製した。また、Double-ring を形成しない変異型 GroEL(SR1)をコントロールとして、さらに monomer から heptamer を形成しないと推定される変異型 GroEL(SM1)を作成した。精製 GroE を用いて、Rhodanase を指標とする Refolding 反応解析、SPR(Surface Plasmon Resonance)による GroEL-GroES 結合能解析、さらに HPLC 溶出パターン解析等を各温度にて行った。

【結果と考察】大腸菌 GroEL の Refolding 活性および GroES との結合能は、16℃を境に低温になると低下し、同時に大腸菌の生育温度と密接に関係していることが判明した。さらに、本研究で構築した SM1 は、heptamer の環状構造の維持が不安定なものであることが示唆された。

本研究は、文部科学省科学技術振興調整費「アーキアンパーク計画」により行われたものである。

久留主: krsy@mx.ibaraki.ac.jp