

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：24302

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710215

研究課題名（和文） 新規リアルタイム変性巻き戻りプロテオリシス法によるタンパク質フォールディング研究

研究課題名（英文） Protein folding study by real-time folding-unfolding proteolysis

研究代表者

高野 和文（TAKANO KAZUFUMI）

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：40346185

研究成果の概要（和文）：本研究では、新規に「リアルタイム変性・巻き戻りプロテオリシス法」を提案し、タンパク質の変性・巻き戻り過程の重要部位の同定やそれらの構造物性解析に取り組んだ。その結果、Tk-RNase H2 の遅い変性過程の経路を同定した。Tk-RNase H2 は、2種類の天然構造を有しており（NとN'）、N構造はプロテアーゼに分解され、変性過程において、N' 構造へ移行する。N' 構造はプロテアーゼ耐性で、この構造が非常に遅く変性する。

研究成果の概要（英文）：In this work, we examined the slow unfolding pathway of Tk-RNase H2 by pulse proteolysis using a super-stable protease. Through these experiments, we found that Tk-RNase H2 includes two different forms with N-state and N'-state in the native state. The N-state has the large hydrophobic surface in the C-terminal region. In the early stage of unfolding, the N-state changes to an intermediate state (A-state) which is digested by protease at the C-terminal region. In contrast, the N'-state is a protease resistant form. In the slow unfolding pathway, the A-state shifts to the N'-state which gradually unfolds.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：生体高分子

1. 研究開始当初の背景

超好熱菌由来の安定なタンパク質において、その変性・巻き戻り反応が非常に遅いタンパク質が存在することが、申請者の研究も含め、近年報告されている。その中で、申請者らが見出したタンパク質（Tk-RNase H2）は、唯一、単量体で、熱や変性剤に対して可逆的変性を示し、この遅い反応メカニズムを

明らかにするに適したサンプルである。

一方、申請者は超好熱菌由来の非常に安定なプロテアーゼ（Tk-サチライシン）のフォールディング（成熟化）の研究も精力的に進めてきた。このプロテアーゼは、非常に安定で、高温下、変性剤存在下や SDS 存在下でも構造を保持し、機能を有する。したがって、通常の超好熱菌由来タンパク質が変性する

過酷な条件においても、その活性を發揮する。

2. 研究の目的

以上の研究背景のもと、ふたつの特徴的なタンパク質 (Tk-RNase H2 と Tk-サチライシン) の特性を利用して、本研究では、全く新しい研究課題: 「リアルタイム変性・巻き戻りプロテオリシス法」によるタンパク質の変性・巻き戻り過程の構造解析、および、タンパク質の遅い反応の原因の探求、に取り組む。

3. 研究の方法

変性剤の添加・除去によりゆっくり反応が進行する Tk-RNase H2 の変性・巻き戻りにおいて、種々の時間のサンプルを Tk-サチライシンにより限定分解する。Tk-サチライシンは変性剤存在下でも機能を有し、Tk-RNase H2 の構造を形成していない領域を切断する。分解したサンプルをマスマスペクトル・電気泳動・アミノ酸シーケンシングなどで解析し、切断箇所を同定する。本実験により、Tk-RNase H2 の変性・巻き戻り過程の構造 (構造を形成していない箇所が欠落した反応中間体) をトラップすることができる。さらに、本実験結果を元に、遺伝子組み換えにより、実際にその中間体を作製し、物性・構造解析を行い、未だかつて誰も成し遂げていないタンパク質の変性・巻き戻り過程の構造決定を達成する。

4. 研究成果

Tk-RNase H2 を Tk-サチライシンによって限定分解し、断片を電気泳動により分離し、また分離した断片のマスマスペクトル測定・N末端アミノ酸配列決定を行い、切断箇所を同定した。限定分解には、Tk-RNase H2 と Tk-サチライシンの量、反応時間・温度などを調整し、最適条件を導くことで成し得ることが出来た。

また、同定した断片について、実際に遺伝子操作により、ポリペプチドを合成し、それらの構造物性を測定した。速く分解される部位のポリペプチドは、やはり不安定で、速く変性した。一方、分解されにくい領域のポリペプチドは、それだけでもしっかりした構造を維持し、変性および巻き戻りに関しても非常に遅い特性を維持していた。これらの結果から、Tk-RNase H2 の遅い変性および巻き戻りの原因となる部位の特定をすることが出来た。

さらに、これらの実験を通して、Tk-RNase H2 の遅い変性過程の経路を同定することができた。Tk-RNase H2 は、天然状態において、2種類の構造を有しており (NとN')、N構造はプロテアーゼに分解されやすいが、変性過程において、N'構造へ移行する。N'構造はプロテアーゼに耐性で、この構造が非

常に遅く変性することが明らかとなった。また、N'構造の重要な部位として、C末端の領域であることも同定し、この領域がプロテアーゼ耐性に関与していることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Takano K, Okamoto T, Okada J, Tanaka S-i, Angkawidjaja C, Koga Y, Kanaya S. (2011) Stabilization by fusion to the C-terminus of hyperthermophile *sulfolobus tokodaii* RNase HI: A possibility of protein stabilization tag. *PLoS ONE*, 6, e16226. Doi: 10.1371/journal.pone.0016226
- ② Okada J, Okamoto T, Mukaiyama A, Tadokoro T, You DJ, Chon H, Koga Y, Takano K, Kanaya S. (2010) Evolution and thermodynamics of slow unfolding of hyperstable monomeric proteins. *BMC Evol. Biol.* 10, 207. Doi: 10.1186/1471-2148-10-207

[学会発表] (計3件)

- ① Takano K. Slow Unfolding of Hyperstable Proteins. 37th Lorne Conference on Protein Structure and Function, Lorne (Australia), 2012. 2. 5-9
- ② Takano K. Protein Stabilization Tag. PepTalk 2012, San Diego (USA), 2012. 1. 9-13
- ③ Okada J, Okamoto T, Mukaiyama A, Tadokoro T, You DJ, Chon H, Koga Y, Takano K, Kanaya S. Evolution and Thermodynamics for Slow Unfolding of Hyperstable Proteins. 8th International Congress on Extremophiles, Ponta Delgada (Portugal), 2010. 9. 12-16

[図書] (計2件)

- ① Mukaiyama A, Takano K. (2011) Folding and unfolding of hyperthermophilic proteins; molecular basis of adaptation to hot environment. *Protein Folding* (E. C. Walters, ed.) pp. 443-464, Nova Science, Hauppauge (NY).
- ② Mukaiyama A, Takano K. (2011)

Delineation of the conformational thermostability of hyperthermophilic proteins based on structural and biophysical analyses. Thermostable Proteins: Structural Stability and Design (S. Sen & L. Nilsson, eds.) pp. 1-20, CRC Press, Boca Raton (FL).

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 和文 (TAKANO KAZUFUMI)
京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号：40346185

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：