



# Function of a thermophilic archaeal chaperonin is enhanced by electrostatic interactions with its targets

超好熱性アーキアの分子シャペロニンの機能は  
標的分子との静電相互作用で増強される

(JBB, Vol. 124, No. 3, 283–288, 2017)

Le Gao<sup>1,a</sup>・秀瀬 涼太<sup>1,b</sup>・藤原 伸介<sup>1,\*</sup>

生化学に携わっている者にとって、タンパク質の精製は避けて通れない。組換えタンパク質の精製はヒスチジンタグと金属アフィニティーカラムの登場で、随分と効率化された。残る厄介な問題は不溶化をいかにして防ぐかである。この問題を解決するため、分子シャペロニンを活用する方法を試みたので紹介したい。

分子シャペロニンは、リング状の構造を有し、変性途上にある標的分子をカルボキシ末端の領域で捕らえて再生する。一般的にこの領域にはグリシン・グリシン・メチオニン (GGM) の連続配列があり、マイルドに疎水性のGGM配列は変性途上のタンパク質分子を、疎水性相互作用でリング状構造の底に引っ張り込む。超好熱菌には複数の分子シャペロニンを持つものが多く、低温で誘導されるものもあるが<sup>1)</sup>、高温で誘導されるものは、この領域にアスパラギン酸やグルタミン酸など負に荷電したアミノ酸が多い<sup>2)</sup>。生育至適温度が90°Cを超える菌種では、シャペロニンは1種類しかなく、この領域は例外なく負に荷電したアミノ酸で占められている<sup>3)</sup>。つまり、高温で変性するタンパク質を分子シャペロニンが捕捉するには、疎水性相互作用に加えて静電相互作用が必要なことを示唆する。実際、超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* において、高温誘導型の分子シャペロニン CpkB が捕捉したタンパク質を調べると、正電荷を帯びた分子が多かった<sup>4)</sup>。分子シャペロニンは、そのカルボキシ末端の配列の違いで捕捉する標的を区別していることになる。これらの点を考慮すると、標的タンパク質の分子表面に、正電荷を帯びたペプチドタグを人為的に付与し、CpkB と共存させれば、タグ付加分子は優先的に捕捉され、安定化されると思われた。そこで複数のタグ配列を設計し、green fluorescent protein (GFP) をモデル標的タンパク質にしてに安定化効果を検証したところ、GGRRGR の配列を有するタグS1が、もっとも効果が顕著だった(図1)。一方、負電荷を有する酸性アミ

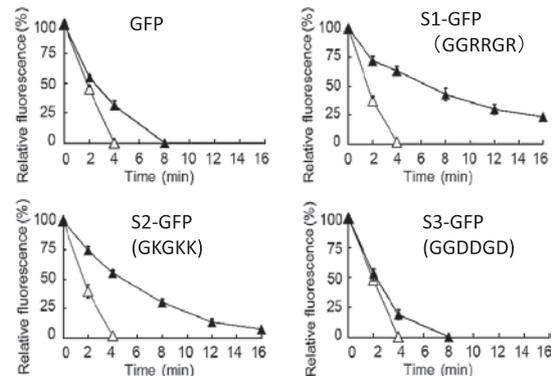


図1. 塩基性タグの付与効果. GFPのアミノ末端に図中の配列のペプチドタグを付与し、CpkBを加えた条件(▲)と加えない条件(△)で75°Cにて熱処理を行い、残存活性を評価した。

ノ酸からなるタグS3では、効果はみられなかった。

GFP以外にも分子量の異なる複数の酵素タンパク質に対してタグS1を付加し、CpkBを共存させて変性条件下での安定性を調べたところ、いずれの酵素も安定化された。次に、大腸菌でタグS1を付加した目的タンパク質を発現し、その細胞破砕液にCpkBを加えて熱処理を施した。すると、タグS1を有する目的タンパク質は優先的に可溶性画分に残り、他の混在タンパク質分子は、不溶化して除かれた。この処理はきわめて簡便であり、タンパク質精製の際に不純物除去の手法になると思われる。

- 1) Fujiwara, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 7306 (2008).
- 2) Gao, L. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **197**, 2642 (2015).
- 3) Gao, L. and Fujiwara, S.: *Prokaryotic Chaperonins, Multiple Copies and Multitude Functions* (Kumar, C. M. S. and Mande, S. C. Eds.), p. 113, Springer Nature Singapore (2017).
- 4) 藤原伸介, 高 楽: *生物工学*, **90**, 701 (2012).

\* 著者紹介 関西学院大学理工学部生命科学科 (教授) E-mail: fujiwara-s@kwansei.ac.jp

<sup>1</sup> 関西学院大学, <sup>a</sup> 現 Division of Biotechnology, School of Life Science and Technology, Changchun University of Science and Technology · Lecture, <sup>b</sup> 現 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 (特命准教授)