

Unfolding and refolding of three CutA1 proteins from *P. horikoshii*, *T. thermophilus*, and *O. sativa*, with unusually high denaturation temperatures.

異常に高い変性温度をもった *P. horikoshii*, *T. thermophilus*, *O. sativa* 由来

CutA1 タンパク質の変性と再生に関する研究

M. Sawano<sup>1</sup>, M. Takehira<sup>1</sup>, K. Ogasahara<sup>2</sup>, S. Katoh<sup>3</sup>, E. Katoh<sup>3</sup>, S. Yokoyama<sup>1,4,5</sup> and K. Yutani<sup>1</sup>, 澤野雅英<sup>1</sup>, 竹平美千代<sup>1</sup>, 小笠原京子<sup>2</sup>, 加藤静恵<sup>3</sup>, 加藤悦子<sup>3</sup>, 横山茂之<sup>1,4,5</sup> 油谷克英<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Riken Harima Inst., <sup>2</sup>Osaka Univ. <sup>3</sup>Nat. Inst. Agrobi. Sci. <sup>4</sup>Riken GSC, <sup>5</sup>Univ. Tokyo)

(<sup>1</sup>理研播磨研, <sup>2</sup>阪大蛋白研, <sup>3</sup>農業生物資源研, <sup>4</sup>理研GSC, <sup>5</sup>東大院理)

e-mail: sawano@spring8.or.jp

私達は、最近、超好熱菌、*Pyrococcus horikoshii*由来のCutA1 タンパク質(*PhCutA1*)が異常に高い温度(約 150 °C)で変性することを見いだした。そこで、本研究ではこのタンパク質の非常に高い熱安定性の機構を明らかにするため、至適生育温度が異なる*P. horikoshii*、*T. thermophilus* (*TrCutA1*)、*O. sativa* (*OsCutA1*)由来のCutA1 タンパク質における変性と再生の特性を比較検討した。分析用超遠心による測定の結果、溶液中で*PhCutA1* と *TrCutA1* は三量体であり、おそらく *OsCutA1* も三量体だと思われる。単量体の分子量はそれぞれ 11.6K-12.5Kの範囲であった。DSC 分析の結果、pH 7.0 における変性温度は 148.5 °C (*PhCutA1*)、113.9 °C (*TrCutA1*)、98.9 °C (*OsCutA1*) であった。*OsCutA1* は常温で生育する植物由来であっても異常に高い変性温度をもっていることを示していた。

完全に変性させた *PhCutA1*(pH 3.0, 80 °C で 1 時間加熱処理) は、pH 8 で、色々な濃度の GuHCl 中で(37 °C)、完全に再生(refolding)させることが、220 nm の CD 値の変化から確認できた。28 日後の *PhCutA1* の再生曲線から再生における GuHCl の中点は 5.8M (pH 8) であった。それに対して、pH 8 では 8M GuHCl 中で 120 分、30 分後でも変性しなかったため、変性曲線を、得ることができなかった。これらのことは、*PhCutA1* は変性と再生の midpoint 温度は著しく異なり、ヒステリシス効果を持つことを示す。ヒステリシスは *TrCutA1* と *OsCutA1* においても観察された。変性と再生の midpoint は、*TrCutA1* では 5.4M と 3.4M、*OsCutA1* では 3.8M と 2.2M であった。この他、種々の条件で測定した 3 種の CutA1 タンパク質の物理化学的特性の変化とそれぞれの立体構造を基に、*PhCutA1* の異常に高い熱安定性のメカニズムを議論する。

