1P117

古細菌由来グループ2型シャペロニンにおける bis-ANS 結合部位の同定

○飯塚 怜¹、宮田 裕介¹、中山 洋²、堂前 直²、尾高 雅文¹、養 王田 正文¹ (¹東京農工大・院工、²理研・バイオ解析チーム)

真核細胞の細胞質や古細菌に存在するグループ2型シャペロニンは、大腸菌の GroE に代表されるグループ1型シャペロニンに比べ、反応機構に関する理解が遅れている。特に、グループ2型シャペロニンの基質タンパク質結合部位に関する知見はほとんど得られていない。現在、環境感受性蛍光プローブ bis-ANS の特性を利用して、超好熱性古細菌 *Thermococcus* sp. strain KS-1 (T. KS-1) 由来シャペロニンの基質タンパク質結合部位の探索を進めている。bis-ANS は、タンパク質や生体膜などの疎水の領域に高い親和性で結合し、蛍光を呈する。また bis-ANS は紫外光の照射により、その結合部位と化学架橋するという特性が報告されている。他の分子シャペロンの研究において、bis-ANS の結合部位と変性タンパク質の結合部位がオーバーラップしていることが示されており、グループ2型シャペロニンの bis-ANS 結合部位を同定することで、基質タンパク質結合部位に関する情報が得られるのではないかと考えている。T. KS-1 α シャペロニン Helical protrusion 欠損変異体 (α DelIII, Iizuka et al., 2004) と bis-ANS を混合し、紫外光を照射したところ、bis-ANS の化学架橋が確認された。bis-ANS が架橋した α DelIII は、未架橋体に比べ変性タンパク質凝集抑制活性が低下していた。この結果から、bis-ANS は基質タンパク質結合部位に取り込まれていると予想される。現在、質量分析により bis-ANS 架橋部位の同定を行っている。当日は詳細な結果を報告する予定である。

R. Iizuka, Y. Miyata, H. Nakayama, N. Dohmae, M. Odaka, and M. Yohda : Identification of bis-ANS incorporation site in the archaeal group II chaperonin

1P119

試験管内、翻訳-複製反応の速度論的研究

○北 寛士^{1,4}、細田 一史³、松浦 友亮^{2,5}、塚田 幸治²、ト部 格²、四方 哲也^{1,2,3,4} (¹阪大院・情報科学、²阪大院・工、³阪大院・生命機能、⁴JST・ERATO、⁵JST・PRESTO)

生物反応システムを in vitro で再構成し解析する事は、複雑な反応がからみ合う in vivo では詳細な解析が困難な反応の研究法として有効である。これまでに、試験管やリポソームを反応容器として、遺伝子 (RNA) 増幅反応や翻訳反応といった生物に特徴的な反応が個々に再構成されている。本研究は、より複雑な生物反応システムとして、この二つの反応がカップリングした反応系を試験管内で構築し、速度論的な解析をおこなった。構築した反応系は、無細胞翻訳系として、PURE system (Shimizu, Y. et al. Nature biotechnol., 2001)、翻訳と複製の鋳型として RNA 複製酵素遺伝子を含むセンス鎖 RNA を用いた。RNA から翻訳された複製酵素は、センス鎖 RNA を鋳型としてアンチセンス鎖を合成する。生成したアンチセンス鎖 RNA 量を定量 RT-PCR 法を用い調べた結果、60min でセンス鎖の 1/10 程度合成されていた。本発表では、この翻訳-複製反応にによるアンチセンス鎖 RNA 合成を、反応モデルと実験的に求めた各反応の速度定数を用い説明する。さらに、新たなセンス鎖合成や RNA 複製酵素の翻訳系内での複製反応などについて議論したい。

H. Kita, K. Hosoda, T. Matsuura, K. Tsukada, I. Urabe and T. Yomo : kinetic study of reconstituted translation-replication system

1P118

グループII型シャペロニン連結変異体の機能解析

○神前 太郎¹、飯塚 怜¹、古谷 昌弘²、養王田 正文¹ (¹農工大・院工・生命工、²積水化学・水無瀬研)

真核生物の細胞質や古細菌に存在するグループII型シャペロニンの反応機構は、大腸菌の GroE に代表されるグループI型シャペロニンとは様々な点で異なっているが、詳細な解明は進んでいない。我々は、超好熱性古細菌 *Thermococcus* strain KS-1 (T. KS-1) 由来のII型シャペロニンを用いて、その反応機構の解析を進めている。我々のグループの古谷らは、T. KS-1 α サブユニットの9残基目と隣接するサブユニットの526残基目を直接連結した変異体を作成した。この連結シャペロニンは、野生型と同様のオリゴマー構造を形成したが、変性タンパク質を捕捉できず、シャペロニンとしての機能を失っていた (Furutani et al., 2005)。我々はこの連結変異体を用いることにより、リング内の特定のサブユニットだけに変異を導入することが可能となり、その機能的特徴を明らかにできると考え研究を進めている。活性を失った原因が、連結部分の構造変化の自由度が失われたことであると考え、 α サブユニットのC末端側に4残基または6残基のリンカーを介して、隣接する α サブユニットのN末端側を直接連結した変異体を作成したところ、変性タンパク質は捕捉するものの、タンパク質フォールディング活性を失っていた。Farr らが作成した連結 GroEL 変異体では、精製後にリンカー配列部分をプロテアーゼで処理して切断することで活性のあるオリゴマーを得ている (Farr et al., 2000)。そこで、トロンピン切断配列を介して α サブユニットを連結した発現系を新たに構築し、精製後にトロンピン処理を行うことで、活性の回復を図った。本年度ではこの連結変異体の機能解析の結果について報告する。

T.KANZAKI, R.IIZUKA, M.FURUTANI, and M.YOHDA : Functional analysis of concatenated group II chaperonin mutant

1P120

RecA-DNA 複合体フィラメントのヌクレオチド依存性形状解析

○西中 太郎^{1,2,3}、土井 ゆうこ¹、橋本 牧子¹、柴田 武彦³、原田 慶彦^{4,5}、木下一彦^{4,5}、野地 博行⁶、八島 栄次¹ (¹ERATO・JST、²PRESTO・JST、³理研・遺伝生化学、⁴CREST・JST、⁵慶大・理工、⁶阪大・産研)

Escherichia coli RecA タンパク質は相同組換え時に中心的な役割を果たす 38kDa の球状タンパク質で、そのホモログは多岐の生物種に渡って存在する。ATP, dATP やそれらの難加水分解アナログである ATP γ S 存在下で、RecA タンパク質は単鎖 DNA に 5' から 3' の方向へ協同的に結合し、らせん状の複合体を形成する。この RecA-単鎖 DNA 繊維状複合体は他の二重鎖 DNA との間で相同塩基配列の探索を行い、相同対合、鎖交換反応などの反応を促進する。これらのヌクレオチド補助因子を用いて形成させた RecA-線状単鎖 DNA 複合体フィラメントを抗 RecA 抗体、蛍光標識二次抗体を用いて蛍光染色し、フィラメント長を測定することによって、ヌクレオチド依存の RecA フィラメント形状解析を行った。また RecA システイン変異体を用い RecA フィラメントを蛍光標識し、抗 DNA 抗体を組み合わせることで蛍光多重染色することによって、RecA フィラメントの外側に露出している DNA の局在部位についても可視化し解析することができた。dATP を用いて複合体形成した場合が最も長く、連続したフィラメントを形成し、ATP を用いた場合はそれよりも短く、不均一なフィラメントを形成した。ATP γ S を用いて複合体形成した場合、均一に短いフィラメントを形成したが、後に SSB タンパク質を加えることによって、延伸した。ヌクレオチド因子非存在下でも RecA は単鎖 DNA と複合体フィラメントを形成するが、その長さは均一であるが短く、後に ATP γ S を加えることによって伸張した。これらの知見を元に RecA-単鎖 DNA 複合体フィラメント形成の機構について議論したい。

T. Nishinaka, Y. Doi, M. Hashimoto, T. Shibata, Y. Harada, K. Kinoshita Jr., H. Noji and E. Yashima : Nucleotide-dependent Morphological Analysis of the RecA-DNA Filamentous Complex