

イネより単離したヒト病原菌に対する増殖抑制タンパク質の構造生物学 Structural analysis of growth inhibitory proteins from *Oryza sativa* against human pathogenic bacteria

落合秋人^{1,*}, 菅井寛¹, 田中聖也¹, 伊東孝祐¹, 谷口正之¹

¹新潟大学自然科学系, 〒950-2181 新潟市西区五十嵐2の町 8050

Akihito Ochiai^{1,*}, Hiroshi Sugai¹, Seiya Tanaka¹, Kosuke Ito¹ and Masayuki Taniguchi¹

¹Graduate School of Science and Technology, Niigata University,
8050 Ikarashi 2-no-cho, Nishi-ku, Niigata, 950-2181, Japan

1 はじめに

熱ショックタンパク質(Heat Shock Protein, Hsp)は、種々のストレス条件下で細胞を保護する役割を担い、分子シャペロンとして機能する。その立体構造は、N末端側の ATPase ドメインと C末端側の基質結合ドメインから主に構成される。植物におけるストレス応答の研究は、ストレスに強い作物を育種するために広く行われている。これまでの研究において、イネ (*Oryza sativa*) の種子からヒト病原菌 *Porphyromonas gingivalis* に対する増殖抑制成分として、分子サイズ約 72 kDa の Hsp 様タンパク質 (OsHsp70) を見出した。イネにおいても寒冷条件下におけるストレス応答遺伝子の発現パターンなどが過去に報告されているが、イネをはじめとする植物由来 Hsp の分子レベルでの詳細な応答機構は不明である。また、OsHsp70 は、ヒトやウシなどの Hsp70 と高い相同性を示し、ウエスタンブロット解析により米糠部において最も高発現することを明らかにしている。本研究では、OsHsp70 の低温ストレス条件下における発現変動を解析するとともに、X線結晶構造解析によりその立体構造を明らかにした。

2 実験

催芽処理したイネ種子(日本晴)を蒸留水を浸したシャーレに置床し、暗黒条件下で 30°C、16 時間静置した。さらに、暗黒条件下で 5°C、0~5 日間低温処理を施し、OsHsp70 の発現変動をウエスタンブロット解析により検証した。また、OsHsp70 の N末端側 ATPase ドメイン(OsHsp70N)の大腸菌を用いた大量発現系を構築した。発現ベクターおよび宿主には、それぞれ pET15b と *Escherichia coli* BL21(DE3)株を使用した。発現させた組換え OsHsp70N を 3段階のクロマトグラフィーにより精製し、沈殿剤として PEG4000 を含む条件において X線結晶構造解析に適した結晶を得た。回折実験は NW12A ビームラインにて行った。

3 結果および考察

OsHsp70 の発現変動をウエスタンブロット解析により検証した結果、OsHsp70 は低温処理により発現誘導を受け、その蓄積量は 24 時間で最大になるこ

とがわかった。1.9 Å 分解能において決定した OsHsp70 の全体構造は、18 本の β-ストランドと 15 本の α-ヘリックスから構成される馬蹄形であり(図)、ADP 認識に関わるアミノ酸残基を含めて、立体構造既知のヒト、ウシ、酵母、および大腸菌由来の Hsp70 と高い類似性を有していた。また、これらの Hsp70 において保存性の低い領域はほぼ分子表面に位置しており、植物細胞に固有の特徴であることが示唆された。現在、OsHsp70 の C末端基質結合ドメインを含む全体の立体構造解析を進めている。

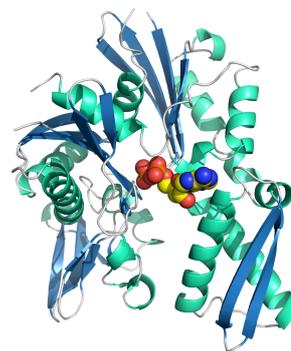


図. 決定した OsHsp70N の立体構造

謝辞

X線データ測定においては PF スタッフの方々は大変お世話になりました。感謝申し上げます。

成果

[学会発表]

1. 落合 秋人、菅井 寛、原田 計、田中 孝明、谷口 正之. 低温ストレスに応答するイネ由来熱ショックタンパク質 Hsp70 の X線結晶構造解析
日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 30 日
2. 菅井 寛、落合 秋人、原田 計、田中 孝明、谷口 正之. イネ由来熱ショックタンパク質 Hsp70 の構造と機能の解析
第 65 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月 20 日

* ottie@eng.niigata-u.ac.jp