

26G-pm08

酵母輸送タンパク質 Emp46p/47p のコイルドコイルドメインの会合特性改変と pH バイオセンサーへの応用

○加藤 紘一¹, 古橋 隆久¹, 野口 彩佳¹, 栗本 英治¹ (¹名城大薬)

【目的】酵母輸送タンパク質 Emp46p/47p は、コイルドコイルドメイン(Emp46c/47c)を介して pH 依存的に会合・解離する。この制御には Emp46c の疎水面に唯一存在する荷電性の E303 が関与することが明らかとなってきたが、詳細なメカニズムは不明である。本研究は、この会合制御メカニズムを解明し、細胞内 pH センサー等に応用することを目的とする。

【方法】各種変異タンパク質は大腸菌発現系により調製し、会合特性の変化はゲルろ過クロマトグラフィー等により解析した。また、Emp46c/47c に蛍光タンパク質を融合し、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)による複合体形成の解析を行なった。

【結果および考察】Emp46c/47c ヘテロ複合体は pH5 以下で解離するが、様々な pH センサーとして応用するためにヒスチジン残基を導入して解離 pH 領域の改変を試みた。Emp46c の E303 を His に置換した変異体では pH5 でも複合体解離が認められなかったため、E303 近傍へ His を導入した変異体を作成した。その結果、2重変異体 V300H/E303Q および V300H/E303L において解離 pH が野生型より高 pH 側にシフトすることを見出した。また、蛍光タンパク質融合体による FRET によっても同様の变化を捉えることができた。pH の低下による解離メカニズムとして、野生型では Emp46c の安定化が想定されるが、これら変異体においてはヘテロ複合体の不安定化が考えられた。その要因として、Emp46c に導入した His とその近傍に位置する Emp47c の Lys との静電的反発が予想された。以上、Emp46c への His 導入により、複合体解離の pH 領域を改変することが可能となった。今後、この解離 pH 領域変化のメカニズムを明らかとすることにより、よりきめ細かな複合体会合制御の手法の開発および pH センサーへの応用が期待される。