

- 703 超好熱菌 *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 株の Acetylpolyamine amidohydrolase (APH) の塩基配列と酵素的性質
(阪大院・工・応生, *京大院・工・生化, CREST 今中プロジェクト)
○林 智宏 藤原伸介 高木昌宏 *今中忠行

【目的】 ポリアミンは、DNA・RNA など多様な酸性物質と相互作用することで、細胞増殖・分化に様々な効果を発揮することが分かっている。本研究では、アセチルポリアミンの脱アセチル化を触媒する APH の遺伝子を超好熱菌からクローン化するとともに、その構造解析を行い、組換え APH の酵素的性質を検討した。

【方法・結果】 超好熱菌 *P. kodakaraensis* KOD1 株の *ior* 遺伝子 (Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase をコードする) の下流に *Mycoplana ramosa* の *aphA* 遺伝子と高い相同性を有する遺伝子ホモログを見出した。この遺伝子ホモログの全域をクローニングし、得られた遺伝子を *Pk-aphA* と命名した。

塩基配列を決定したところ、開始コドンは TTG であることが示唆され、ORF は 1002 塩基からなることが予想された。推定アミノ酸配列は、*M. ramosa* の APH と相同性を示し、34% のアミノ酸が同一であったが、*M. ramosa* に特徴的な亜鉛結合部位は認められなかった。*Pk-aphA* 遺伝子を PCR 法で増幅し、発現ベクター pET-8c に導入し、組換えプラスミド pET-*aphA* を得た。pET-*aphA* を用いて大腸菌を形質転換し誘導発現を試み、粗酵素液を抽出した。得られた粗酵素液を用いて、アセチルブタレスシン、アセチルスペルミジン、アセチルスペルミンに対する脱アセチル化活性を調べた。*Pk-APH* は 50℃ 以上でいずれの基質に対しても活性を示し、70℃ が反応最適温度であった。現在、*Pk-APH* の精製を行っている。

Gene cloning, sequencing and enzyme characterization of acetylpolyamine amidohydrolase from *Pyrococcus kodakaraensis* strain KOD1. ○Tomohiro Hayashi, Shinsuke Fujiwara, Masahiro Takagi, *Tadayuki Imanaka (Dept. Biotechnol., Osaka Univ., *Dept. Synth. Chem. & Biol. Chem., Kyoto Univ., CREST Imanaka project)

【Key words】 archaea, hyperthermophile, acetylpolyamine amidohydrolase, *Pyrococcus*

- 704 超好熱菌 *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 株の細胞分裂蛋白質 *Pk-FtsZ* の機能 (阪大院・工・応用生物, *京大院・工・生化, CREST 今中プロジェクト) ○藤原伸介、中村 剛、永久圭介、高木昌宏、今中忠行*

【目的】 細菌に存在する細胞分裂タンパク質 FtsZ は細胞分裂の初期に中心的な役割を果たす。その一次配列は真核生物の細胞骨格タンパク質 tubulin と相同性が高く、構造的にも類似している。我々は細胞分裂の原始的機構に関する知見を得るため、超好熱始原菌 *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 株の FtsZ タンパク質 (*Pk-FtsZ*) に注目し、組換えタンパク質として *Pk-FtsZ* を精製し、生化学的性質を検討した。

【方法及び結果】 *Pk-ftsZ* 遺伝子を系統的に解析すると細菌 FtsZ、真核生物 tubulin とほぼ等距離で離れており、極めて興味深い位置付けが認められている。*Pk-ftsZ* 遺伝子をプラスミド pET8c に導入し、大腸菌 BL21(DE3) を宿主に用いて組換えタンパク質として大量発現させた。細胞破碎液を熱処理後、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムに供し、*Pk-FtsZ* を精製した。*Pk-FtsZ* は細菌の FtsZ、真核生物の tubulin に広く認められる GTP 結合活性、及び GTPase 活性を有していた。さらに大腸菌 PAT84 株 (*ftsZ84*) を用いて生育の相補実験を試みたところ、*Pk-ftsZ* 遺伝子は PAT84 株の 42℃ での生育を相補した。このことから *Pk-FtsZ* は細胞分裂時に機能するタンパク質と考えられた。現在、*Pk-FtsZ* の *in vitro* での重合、及び tubulin 構造の形成について検討を行っている。

Function of cell division control protein *Pk-FtsZ* from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. ○Shinsuke Fujiwara, Tsuyoshi Nakamura, Keisuke Nagahisa, Masahiro Takagi, Tadayuki Imanaka* (Dept. Biotechnol., Osaka Univ., Dept. Synth. Chem. & Biol. Chem., Kyoto Univ., CREST Imanaka project)

【Key words】 archaea, hyperthermophile, *Pyrococcus*, cell division, *ftsZ*