

2Cp06 アーキアの補酵素A合成に関する生化学的解析

○富田 宏矢¹, 横大路 裕介¹, 石橋 拓也¹, 今中 忠行^{2,3}, 跡見 晴幸^{1,3}
 (¹京大院・工・生化,²立命館大・生命・生物工,³科技団・CREST)
 tomita.hiroya.72z@st.kyoto-u.ac.jp

補酵素A (CoA) は生体内でアシル基の担体として機能し、TCA回路や脂肪酸の合成・分解など様々な細胞内代謝に関与する。CoAは細胞内において9段階の酵素反応によって合成されることが知られているが、細菌・真核生物でpantoateから4'-phosphopantothenateへの変換を担う2つの酵素pantothenate synthetase (PS)、pantothenate kinase (PanK)の相同遺伝子が多くのアーキアゲノム上に存在しない。我々は今までに超好熱性アーキアの一つ*Thermococcus kodakarensis*において既存のPS/PanK経路に代わる2つの新規酵素pantoate kinase (PoK)、phosphopantothenate synthetase (PPS)を同定し、アーキアにおけるpantoateから4'-phosphopantothenateへの変換経路を明らかにした。

本研究では新規酵素PoK、PPSに加え、ketopantoateからpantoateへの変換を担うketopantoate reductase (KPR)の酵素学的諸特性の解明を目的とした。PPS、KPRは大腸菌内で、PoKは*T. kodakarensis*内で大量発現し、各々の組換え型タンパク質を精製した。いずれの酵素も厳密な基質特異性を示したが、PoKのnucleotide特異性のみ例外的に広いものであった。速度論的解析の結果、PoKはpantoate、PPSは4-phosphopantoateおよびATPによる基質阻害を受けることを見出した。またPoKは4-phosphopantoateによる生成物阻害を受けることも判明した。KPRはNADH/NADPHのいずれも電子供与体として利用したが、NADHに依存した活性の方が高い k_{cat}/K_m 値を示した。CoA、acetyl-CoA添加による各酵素の活性への影響も検討したので報告する。

Biochemical characterization of coenzyme A biosynthesis in the archaea

○Hiroya Tomita¹, Yuusuke Yokooji¹, Takuya Ishibashi¹, Tadayuki Imanaka^{2,3}, Haruyuki Atomi^{1,3}
 (¹Dept. Synth. Chem. Biol. Chem., Kyoto Univ., ²Dept. Biotechnol., Ritsumeikan Univ., ³CREST, JST)

Key words archaea, coenzyme A

2Cp08 *Thermococcus kodakarensis* 由来高分子量型及び低分子量型FKBPの構造機能解析

○安東 洋平, プディマン チャヒョウ, 古賀 雄一, 金谷 茂則
 (阪大院・工・生命先端)
 Y.Ando@bio.mls.eng.osaka-u.ac.jp

【目的】

FKBPはcyclophilin、parvulinと共にPPIaseに分類される。PPIaseはフォールディング反応の律速段階であるシス-トランス異性化反応を触媒している。さらにPPIaseはタンパク質の凝集を防ぐことからシャペロンのような機能も備えていることが明らかにされている。しかしこの二つ目の機能は複数のドメインを持つFKBPのみでしか観察されていない。これらのドメインは部分的に折りたたまれたタンパク質の結合部位として働くことによりFKBPにシャペロンのような機能を与えている。

超好熱古細菌 (始原菌) *Thermococcus kodakarensis* は、long-typeとshort-typeの2つのFKBPを持つという特徴を有し、これらのタンパク質はTk-FKBP38、Tk-FKBP17と呼ばれている。好熱菌や超好熱菌がこれら2つのFKBPを持つことの意義や、役割については明らかにされていない。そこで本研究では、Tk-FKBP38とTk-FKBP17について構造的、機能的解析を行い、これらのタンパク質の役割を解明することを目的とする。

【結果】

精製したタンパク質を用いてPPIase活性を測定したところTk-FKBP17の活性はTk-FKBP38の活性より高かった。しかし、シャペロン活性はTk-FKBP17よりもTk-FKBP38のほうが高い活性を示すことがわかった。この活性の違いはTk-FKBP17とTk-FKBP38の役割の違いによるものと考えられる。現在は、Tk-FKBP17やTk-FKBP38の役割を明らかにするために、Tk-FKBP38のPPIase活性や会合状態に強い影響を与えると考えられるC-terminal domainを欠損させたFKBP38 ΔCTD変異体を構築し、その諸特性解析を進めている。

Structural and functional studies of long- and short-type FKBP from *Thermococcus kodakarensis*

○Yohei Ando, Cahyo Budiman, Yuichi Koga, Shigenori Kanaya
 (Dept. Mat. Life Sci., Osaka Univ.)

Key words FKBP, PPIase, Archaea, Chaperone

2Cp07 *Thermococcus kodakarensis* 由来 Lon-like protease の構造機能解析

○大田黒 晴樹¹, 平田 あずみ², 劉 東周¹, 高野 和文², 古賀 雄一¹, 金谷 茂則¹
 (¹阪大院・工・生命先端,²京府大院・生命環境科学)
 haruki_otaguro@bio.mls.osaka-u.ac.jp

[背景] Lon proteaseはArchaea, Bacteria, Eukaryaに広く存在するプロテアーゼであり、主に細胞内においてミスフォールドしたタンパク質を分解する役割を担う。また、6-7個のサブユニットから成るオリゴマーを形成し、各サブユニットはATPaseドメインとProteaseドメインを含むことが知られている。今回、我々は超好熱古細菌 (始原菌) *Thermococcus kodakarensis* から、Lon proteaseと類似した配列を持つ菌体外プロテアーゼ (Tk2168) を単離した。Tk2168はN末端シグナルペプチド、Lonと相同性の高いProteaseドメイン、構造・機能ともに未知のC末端ドメインで構成されている。その一方で、Tk2168は、ATPaseドメインを持たない点、菌体外で作用する点でLon proteaseとは異なっており、独自の酵素特性、および生理的役割を保持していることが推測される。本研究ではTk2168の諸特性解析を通じて、本酵素の酵素特性および生理的機能について明らかにすることを目的とした。

[結果] シグナルペプチドを除いたTk2168を、大腸菌内で発現し、組換えTk2168を調製した。カゼインを用いた活性測定により、Tk2168は100℃において最大の活性を示すなど十分な酵素活性をもった耐熱性酵素であることを確認した。さらにC末端ドメインを欠損させた変異体を作製し、熱安定性、ペプチダーゼ活性について野生型と比較したところ、高温における活性、および熱安定性が低下することが示された。これらの結果から、機能不明なC末端ドメインが、高温条件下でのTk2168の活性維持に重要なドメインであることが示唆された。

Characterization of Tk2168 from *Thermococcus kodakarensis*

○Haruki Otaguro¹, Azumi Hirata², Dong-Ju You¹, Kazufumi Takano², Yuichi Koga¹, Shigenori Kanaya¹
 (¹Dept. Mat. Life Sci., Osaka Univ., ²Grad. Sch. Life. Env. Sci., Kyoto Pref. Univ)

Key words proteolysis

2Cp09 超好熱古細菌 (始原菌) *Thermococcus kodakarensis* KOD1 由来 glycerophosphodiester phosphodiesterase の特性解析

○熱田 侑也¹, 古賀 雄一¹, 小林 淳¹, 劉 東周¹, 佐藤 喬章², 跡見 晴幸², 金谷 茂則¹
 (¹阪大院・工・生命先端,²京大院・工・合成生化)
 atsuta@bio.mls.eng.osaka-u.ac.jp

【目的】

グリセロール代謝で重要な役割を果たすと考えられる酵素の1つにglycerophosphodiester phosphodiesterase (GPDP) が挙げられる。この酵素はglycerophosphodiester (G3POR)をglycerol 3-phosphate (G3P)とアルコールに加水分解する働きがあり*T. kodakarensis*ではtk1397、tk1398というORFにコードされていると推定されている。真核生物や真正細菌の場合、膜をG3PORが構成しているため、この酵素によって膜が分解されている。一方、古細菌ではG3PORではなく、その鏡像異性体であるG1PORが膜を構成している。そのため、tk1397、tk1398がコードするタンパク質 (Tk-GPDP1、Tk-GPDP2) がGPDP活性もつのか、また、なぜ同じ働きを持つと思われるタンパク質が隣接した2つのORFによってコードされているのか興味を持たれる。本研究では、これらのタンパク質の特性解析を行い、*T. kodakarensis*における働きを推定することを目的とした。

【方法・結果】

培養したKOD1のRNAを抽出し、逆転写して得られたcDNAを鋳型にPCRを行った結果、菌体内でのTk-GPDP1、Tk-GPDP2の発現を確認した。また、tk1397とtk1398はオペロンを形成していることも明らかになった。Tk-GPDP1については大腸菌で発現、精製し、その後特性解析を行った。また、類縁酵素とのより詳細な比較を行うため、X線結晶構造解析を行い、分解能2.0 Åを示す結晶から分子置換法により構造を決定した。

Characterization of glycerophosphodiester phosphodiesterase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1

○Yuya Atsuta¹, Yuichi Koga¹, Atsushi Kobayashi¹, Dong-Ju You¹, Takaaki Sato², Haruyuki Atomi², Shigenori Kanaya¹
 (¹Dept. Mat. Life Sci., Osaka Univ., ²Dept. of Synth. Chem. & Biol. Chem., Kyoto Univ.)

Key words glycerophosphodiester phosphodiesterase, glycerol, archaea