

3P-005 Bacillus cereusのシリカ蓄積機構における胞子タンパク質 CotB1 の役割

○本村 圭, 池田 丈, Abdelhamid Mohamed A. A., 廣田 隆一, 黒田 章夫
(広島大院・先端物質)
knotomura@hiroshima-u.ac.jp

【背景と目的】ケイ素は生物にとって重要な元素であり、珪藻や一部の海綿などは環境中から取り込んだケイ酸 (H_4SiO_4) を細胞内で重合してシリカ (SiO_2) を形成し、骨格などとして利用している。当研究室では、*Bacillus cereus* とその近縁種がケイ酸を多量に取り込み、胞子コート近傍にシリカとして蓄積することで胞子の酸耐性を向上させていることを発見した。遺伝学的解析から、胞子タンパク質の一種と推定される CotB1 の C 末端近傍がその機構に寄与していることも明らかとなっている。本研究では、さらに詳細なシリカ蓄積機構の解明のため、CotB1 の細胞内における動態および生化学的特性を解析した。【方法と結果】CotB1 の発現時期および局在を調べるため、cotB1 遺伝子が持つネイティブプロモーター制御下に CotB1-GFP 融合タンパク質の遺伝子を組み込んだプラスミドを構築した。*B. cereus* に形質転換して GFP の蛍光を観察したところ、シリカ蓄積と時期を合わせるように胞子形成中期から後期にかけて発現し、胞子中に局在することを確認した。CotB1 の C 末端近傍は、珪藻のシリカ重合ペプチドの一種であるシラシディンと相同性を持つ負電荷領域と、アルギニンを豊富に含む正電荷領域に分けられる。それぞれの領域を含む合成ペプチドのシリカ重合活性を測定した結果、正電荷領域のペプチドにおいて高い活性が認められた。少なくともこの領域が *B. cereus* 胞子中でのシリカ形成に関与していることが示唆された。現在、大腸菌で発現・精製した組換え CotB1 のシリカ重合能を評価している。

Role of spore coat protein CotB1 on silica accumulation in *Bacillus cereus*

○Kei Motomura, Takeshi Ikeda, Mohamed A. A. Abdelhamid, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words *Bacillus cereus*, spore coat protein, silica, biomineralization

3P-007 超好熱菌の低温適応に必要な分子シャペロニンのアミノ酸置換

○高 楽¹, 今中 忠行², 藤原 伸介¹
(¹関西学院大・理工・生命科学,²立命館大・生命科学・生物工学)
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

背景及び目的: *Thermococcus* 属は Thermococcales 目に属する超好熱菌であり、同目の *Pyrococcus* 属に比べ低い温度で生育する。この低温適応には低温ストレス下で機能する RNA ヘリカーゼ (1) や分子シャペロニン (2) が重要な役割を果たしている。本研究では低温誘導型分子シャペロニン CpkA の変異が低温適応に与える影響を検討するため、より低温で機能するようになった変異 CpkA を構築し、その機能を検討した。さらにこれら変異を *T. kodakarensis* の染色体に導入し、生育に及ぼす影響を調べた。

結果及び考察: CpkA は熱ショック分子シャペロニン CpkB と C 末端側のアミノ酸配列に顕著な違いが認められる。そこで、この領域に様々なアミノ酸置換を導入し、ATPase の至適温度が低下した変異 CpkA を取得した。CpkA-E530G は 50℃ を反応至適温度とし、その最大値は野生型 CpkA よりも高かった。この変異を有する DA4 株 ($\Delta pyrF$, cpkA-E530G) は 50℃ でも生育した。この知見は C 末端側が低温での適応に関与していることを示唆する。

A single amino acid substitution of thermosome assigned a cold adaptation in hyperthermophile

○Le Gao¹, Tadayuki Imanaka², Shinsuke Fujiwara¹
(¹Dept. Biosci., Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., ²Dept. of Biotech., Col. of Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words cold adaptation, chaperonin, hyperthermophile, *Thermococcus kodakarensis*

3P-006 2 種類の金属ナノ粒子を内包する水溶性ナノカプセルとしてのシャペロニン GroEL 複合体の利用の検討

○依田 ひろみ, 小池 あゆみ
(神奈川工大院・工・応用バイオ)
koike@bio.kanagawa-it.ac.jp

大腸菌 GroEL は、ダブルリング構造をしたホモ 14 量体分子である。各リングは直径約 5 nm の空洞を有し、細胞内に存在する変性ポリペプチドを結合し、ATP 依存的に GroES と複合体を形成することによって基質を内腔に取り込み、折れ畳みを介助する。ATP 加水分解を遅延した GroEL 変異体では、GroEL/GroES 複合体の維持時間が延長でき、ADP 存在下で GroEL に 1 つの GroES を結合し、続いて ATP 存在下で 2 つ目の GroES を結合することにより、ナノ空間を順次閉鎖することが可能である。この GroEL 変異体に 2 種類の量子ドットを順次内包した複合体を形成し、HPLC ゲルろ過クロマトグラフィーで分析したところ、GroEL 複合体の溶出時間 12 分付近に 2 種類の量子ドットに基づく蛍光ピークを得た。また、FePt と量子ドットを内包させた GroEL 複合体の 1 分子に分析範囲を絞った STEM-EDS 分析では、各ナノ粒子に由来する Fe, Pt, Cd が他の元素より多く検出された。このことから、1 分子の GroEL の各空洞に 2 種類の金属ナノ粒子を内包した複合体の形成が確認でき、GroEL のナノカプセルとしての利用が期待できる。

Studies of GroEL chaperonin complexes as a water-soluble nanocapsules encapsulating two different metal nanoparticles

○Hiromi Yoda, Ayumi Koike-Takeshita
(Dept. Appl. Chem. Biosci., Grad. Sch. Eng., Kanagawa Inst. Technol.)

Key words chaperonin, GroEL, GroES, Metal nanoparticle

3P-008 好熱性真菌 *Chaetomium thermophilum* 由来 Hsp104 の機能構造解析

○北 亮一¹, 山本 陽平¹, 野口 恵一², 尾高 雅文¹, 養王田 正文¹
(¹農工大院・工・生命工,²農工大・機器分析セ)
ryoichi.kita@yohda.net

Hsp104 は AAA+ ファミリーに属する分子シャペロンであり、凝集したタンパク質の脱凝集が可能であることから注目されている。AAA+ ファミリーに特徴的な 6 量体リング構造を形成し、変性したタンパク質を ATP 加水分解依存的に中央の孔に引き込むことにより、その分解や脱凝集を行う。しかし、真正細菌ホモログである ClpB 単量体の結晶構造が決定されているが、詳細な脱凝集機構はわかっていない。好熱性真菌 *Chaetomium thermophilum* は至適生育温度が 45℃ と真核生物としては高く、その Hsp104 (以下 ctHsp104) は高い構造的安定性が予測される。そこで本研究では ctHsp104 の機能構造解析をすることで、真核生物の Hsp104 の詳細な機能と構造を明らかにすることを目的とした。*C. thermophilum* から Total RNA を抽出し、逆転写 PCR により ctHsp104 をコードする cDNA を獲得した。発現ベクター pET-23b に導入し、大腸菌 BL21 (DE3) に形質転換することで、発現系を構築した。SDS-PAGE によって発現を確認したところ、可溶性画分に発現が確認された。また発現した ctHsp104 は 70℃ までの温度で安定性を示した。また、精製 ctHsp104 の会合状態をゲル濾過 HPLC、SEC-MALS 法による絶対分子量測定、透過型電子顕微鏡により検討した。その結果、ctHsp104 は ATP, ADP の存在下において 6 量体リング状構造を取ることが明らかとなった。本発表では、ctHsp104 のシャペロン機能、コファクターとの協調作用機構、詳細な構造について最新の知見を報告する。

Structural and functional characterization of Hsp104 from *Chaetomium thermophilum*

○Ryoichi Kita¹, Yohei Yamamoto¹, Keiichi Noguchi², Masafumi Odaka¹, Masafumi Yohda¹
(¹Biotechnol. Life Sci., Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²Instr. Anal. Center, Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words chaperon, Hsp104, AAA+