

## 分子系統解析で絞り込んだ未知機能蛋白質の実験的な機能解析

●横堀 伸一

東京薬科大学生命科学部分子生命科学科

### 〈研究の目的と進め方〉

ゲノム解析での、配列ホモロジーからの機能推定は、機能未知蛋白質の機能の大まかな推定には強力ではあるが、細かい機能については、必ずしも機能の推定は正確ではない。本研究では相同蛋白質遺伝子を含む複合系統樹の作成を行い、解析すべき蛋白質候補を絞り込む。絞り込んだ蛋白質について、その機能解析を試みる。その結果から、その蛋白質を含む相同蛋白質を、機能で分類する基盤を作ると共に、それらの蛋白質の進化についての考察を試みる。分岐鎖アミノ酸代謝系や脂質合成系など幾つかの遺伝子グループについての分子系統解析から、機能未知蛋白質の機能を知る上で鍵となり得る蛋白質を選び、その翻訳産物の性質を検討することで、代謝系等の進化経路を解析する。

1 分岐鎖アミノ酸代謝系：アミノ酸代謝系遺伝子の系統樹を作成すると、いくつかの遺伝子の機能が祖先型から分化した様子が推定できる。しかし、分化して生まれた酵素の機能は実際には不明或いは誤って機能推定されている遺伝子が多い。最近、申請者等はロイシン合成系に関する遺伝子について、多くの同族（スーパーファミリー）遺伝子の統合系統樹を作成すると、機能未知遺伝子の機能を絞り込むことができる、と言う結果を得た。これらの結果を踏まえ、特に古細菌をターゲットとして機能未知蛋白質の機能推定を生化学的な手法で行い、これらの蛋白質（とその関与する代謝系）の進化について検討する。

2 脂質合成系：古細菌はイロプラニルアルコールがグリセロールにエーテル結合した、エーテル脂質と呼ばれる独特の脂質を持っている。我々は、このエーテル脂質合成系が真核生物のステロイド合成系に類似しておりおそらくその起源であろうと推定している。本申請では、真核生物のステロイド合成系に関与する酵素の遺伝子などをもとにそれらの古細菌や真正細菌におけるhomologを探索することを目的とする。更に、分子系統解析などを行ってその起源と進化について検討する。

### 〈研究開始時の研究計画〉

① 分岐鎖アミノ酸代謝系：leuA、leuB、leuC、leuDとそれらのhomologとの間で、それぞれ複合系統樹を作製し、機能未知の蛋白質（leuA homolog）のグループを見だし、また、古細菌の蛋白質が、これらの複合系統樹上で蛋白質と別の蛋白質の境界部分に位置することが多いことを見だしている。より精緻な分子系統解析を行い、その結果を確認、アップデートする。その結果を踏まえ、*Sulfolobus tokodaii*、*Pyrococcus horikoshii*、*Aeropyrum pernix*等から当該蛋白質の遺伝子をPCR cloningし、その大量発現系と活性測定を確立する。熱処理等を用いることで、精製ステップを大幅に簡略化でき、多くの遺伝子の解析を効率よく進めることができると期待される。

② 脂質合成系：古細菌はイロプラニルアルコールがグリセロールにエーテル結合した、エーテル脂質と呼ばれ

る独特の脂質を持っている。申請者等は、このエーテル脂質合成系が真核生物のステロイド合成系に類似しておりおそらくその起源であろうと推定している。また、申請者等は、酵素学的な解析から、好熱古細菌からのエーテル脂質合成系に関わる蛋白質の探索を行っている。本申請では、真核生物のステロイド合成系を構成する蛋白質の一次配列を参考とし、好熱古細菌におけるエーテル脂質合成系関連蛋白質を全ゲノム情報から情報科学的に抽出する。分岐鎖アミノ酸代謝系のケース同様、それらの遺伝子の分子系統解析を行い、それらの蛋白質の機能推定を行う。

### 〈研究期間の成果〉

分岐鎖アミノ酸の一種であるロイシンの生合成に関わる4種の蛋白質遺伝子（leuA、leuB、leuC、leuD）とその相同蛋白質遺伝子（TCA回路、リジン生合成に関わる蛋白質遺伝子と、BLAST検索等で見出された機能未知蛋白質遺伝子）について分子系統解析を行い、既に機能解析がなされている蛋白質を系統樹上にマッピングし、各蛋白質を改めてグルーピングした。いずれの系統樹でも、古細菌（殊にメタン菌）が、ロイシン合成系酵素とTCA回路の酵素との境界領域に位置する場合が多いことが観察された。また、真正細菌や真核生物に比べて、古細菌由来の蛋白質遺伝子のhomolog間の一次配列の差違が小さい傾向にあり、その機能分化の程度については検討の余地があると考えられた。

機能未知蛋白質のみで構成されている蛋白質グループに属する蛋白質と、機能の異なる蛋白質グループ同士の境界に系統樹上位置する蛋白質について、好熱性の古細菌（*Sulfolobus tokodaii*、*Aeropyrum pernix*、*Pyrococcus horikoshii*）からの遺伝子の取得と、その大腸菌中での発現を試みた。発現を試みた蛋白質の過半数が、不溶性の封入体を作るか、発現しなかった。それらの発現効率を検討すると、2～3割程度の蛋白質が発現し、可溶性画分に来るという結果であった。

また、いずれの系統樹でも、古細菌（殊にメタン菌）が、ロイシン合成系酵素とTCA回路の酵素との境界領域に位置する場合が多いことが観察されたことから、超好熱性古細菌に限らず、他の古細菌、特にメタン菌の控訴の解析を試みることにした。そのため、*Methanocaldococcus jannaschii*の各遺伝子の取得を行い、その発現系の構築を試みた。それらの発現効率を検討すると、*S. tokodaii*等の蛋白質の場合と同様、2～3割程度の蛋白質が発現し、可溶性画分に来るという結果であった。封入体となっている蛋白質の可溶化など、蛋白質の発現・精製法については、再検討する必要がある。

また、これらと平行して、ポリアミン生合成系、RNA修飾酵素などについても分子系統解析を行い、その進化、特に機能/基質認識の進化について検討を行った。ポリアミン生合成系の進化は、分岐鎖アミノ酸代謝系の進化に比べ、より複雑であり、その解析結果は、明確とはならなかった。

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究の目標である未知機能蛋白質の機能推定とその実験的な解析は、現在のようなゲノム解析の進展と、網羅的な蛋白質の構造解析の進展の中で、求められている研究課題であると考えられる。本研究では、ターゲット蛋白質の選択に至ったが、その蛋白質の機能解析が未了であるため、当該学問分野及び関連学問分野への貢献度に関して、現時点で論じることは難しい。しかし、本研究のようなアプローチから、未知機能蛋白質の機能推定とその実験的な解析が進展することで、特に生化学的な蛋白質研究の進展に貢献できると考えられる。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

上記のように、発現を試みた蛋白質の過半数が、不溶性の封入体を作るか、発現しなかった。ランダムに古細菌の蛋白質を選び、それらの発現効率を検討すると、2~3割程度の蛋白質が発現し、可溶性画分に来るという結果であった。特に、機能未知の蛋白質について、可溶性かつ大量調製可能であると思われるものが得られなかったため、実際の蛋白質の生化学的解析に達することができなかった。

### 〈今後の課題〉

今後の課題としては、発現を試みた蛋白質の更なる発現条件の検討によって、その効果的な発現条件を見だし、実際にその生化学的解析を行うことが最大のものである。

また、分岐鎖アミノ酸合成系関連蛋白質の分子系統解析の結果は、生物の初期進化を考える上で、様々なヒントを与えている。このようなアプローチがすべての代謝関連酵素群に有効であるかは不明であるが、より多くの代謝系関連蛋白質について、その経路丸ごとの分子系統解析をすることで、より深い生物の初期進化への理解を深めて行くことができると考えられる。

### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

#### 1) 論文

1. Iwabata, H., Watanabe, K., Ohkuri, T., Yokobori, S., and Yamagishi, A., Thermalstability of ancestral mutants of *Caldococcus noboribetetus* isocitrate dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.* 243: 393-398 (2005)
2. Watanabe, K., Ohkuri, T., Yokobori, S., and Yamagishi, A., Designing thermostable proteins: Ancestral mutants of 3-isopropylmalate dehydrogenase designed by using a phylogenetic tree. *J. Mol. Biol.* 355: 664-674 (2006)