

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19580396  
 研究課題名 (和文) ゲノムインフォマティクスを利用した酵素ドメイン機能と分子進化に関する研究  
 研究課題名 (英文) Analysis of domain functions and a molecular evolution of an enzyme by bioinformatics technique.  
 研究代表者  
 矢嶋 俊介 (YAJIMA SHUNSUKE)  
 東京農業大学 応用生物科学部 教授  
 研究者番号：90301548

## 研究成果の概要：

Transketolase は全ての生物が有する必須の酵素である。しかしながらこの transketolase の研究は全長約 700 アミノ酸からなる単一タンパク質のみについてであった。今回報告者は古細菌においてはこの transketolase は N 末側と C 末側のドメインがサブユニットとして 2 つの遺伝子の形態で存在していることを明らかにした。これは真正細菌、真核生物が 700 アミノ酸のタイプを持つ点から進化的に興味深いことである。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	680,000	3,380,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：ゲノムインフォマティクス

## 1. 研究開始当初の背景

Transketolase は基転移酵素の一種であり、ケトン基を含む炭素断片をアルドースへ転移し、新たなアルドースとケトースを生合成する反応を触媒する酵素である。Transketolase は、ペントースリン酸経路や植物の炭素固定経路中で働いており、  
 リボース 5 リン酸 + キシルロース 5 リン酸  
 $\rightleftharpoons$  セドヘプツロース 7 リン酸 + グリセルアルデヒド 3 リン酸  
 キシルロース 5 リン酸 + エリスロース 4 リン酸  
 $\rightleftharpoons$  フルクトース 6 リン酸 + グリセルアルデヒド 3 リン酸

の可逆反応を触媒している。また、その反応には thiamine diphosphate (TPP) や二価の金属イオン ( $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、etc) を補酵素として必要としている。ほぼすべての生物に存在する酵素であるが、今までの研究では酵母、大腸菌において約 700 アミノ酸残基からなる酵素 (以後ドメイン型) として、生化学的研究や遺伝子同定が行われてきていた。このような中で報告者は、ある微生物が、transketolase の N 末側と C 末側のドメインを構成する 2 つのサブユニットに対応した 2 つの遺伝子として (以後サブユニット型) ゲノムに持っていることを発見した。

## 2. 研究の目的

古細菌においてはゲノム配列が知られている全てにおいて、サブユニット型のみをゲノム上に持っていた。一方、真正細菌ではドメイン型のみを持つもの、ドメイン型とサブユニット型の両方を持つものが存在した。真核生物においてはドメイン型のみが存在するため、一般的に、原核生物→古細菌→真核生物の順に進化が進んだと考えた場合には *transketolase* の分子進化の説明が成り立たない。そこで、バイオインフォマティクスによりゲノム配列が明らかとなっている微生物からの *transketolase* 遺伝子の分類を行い、分子進化の道筋を推定することを目指した。また、サブユニット型 *transketolase* をクローニングし、その蛋白質の生化学的解析によりドメイン型 *transketolase* と機能に差異があるかどうかを検証することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) バイオインフォマティクスの手法により、NCBI データベース中からドメイン型、サブユニット型の *transketolase* 遺伝子の抽出を行う。その後、サブユニット型、ドメイン型をもつ細菌の分類を試みる。

(2) 古細菌からのサブユニット型 *transketolase* 遺伝子のクローニングと機能解析。 *Thermococcus kodakaraensis* のゲノムからサブユニット型 *transketolase* 遺伝子のクローニングを行い、大腸菌で組み換え体蛋白質の発現精製系の確立を行う。その後、酵素反応解析およびX線結晶構造解析により、構造機能相関解析を行うことを目指した。

## 4. 研究成果

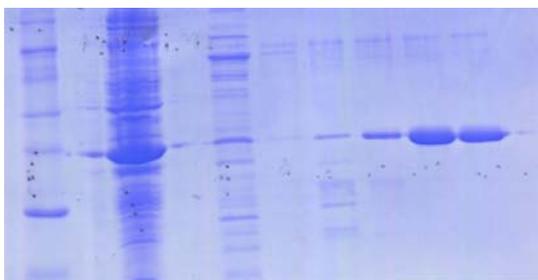
(1) 真正細菌では大腸菌のようにドメイン型のみをもつものと、ドメイン型およびサブユニット型の両方を持つものは存在したが、サブユニット型 *transketolase* のみを持つものは見つからなかった。ドメイン型、サブユニット型の両者を持つ場合には、サブユニット型は1セットであるが、ドメイン型はパラログが存在するケースが多く見られた。しかしながら、それらの遺伝子保有パターンから細菌を分類した場合、現時点で未だ分類学的特徴は得られていない。一方で、古細菌の場合にはサブユニット型のみが検出され、ドメイン型は存在しなかった。 *Transketolase* が必須代謝遺伝子であることを考えると、真正細菌と古細菌の間では一方向の水平伝搬が起こったのではないかと予想された。

(2) 実際に、サブユニット型 *transketolase*

の活性を解析するために *Thermococcus kodakaraensis* 由来の遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いた発現系の構築、精製系の構築に成功した。

下にC末側サブユニットの精製過程の結果を示す。この蛋白質のN末端側に His<sub>6</sub>-tag を付けて大腸菌により発現させ、Ni キレートカラムにより精製した。SDS-PAGE の結果、右側から2列目が Imidazole 250 mM による溶出、一番右の列が Imidazole 500 mM による溶出結果である。このように、組み換え体蛋白質として均一に精製することができた。

また、N末側ドメインは His-tag 無し構築により、C末側ドメインを Ni キレートカラムに吸着させ、N末側ドメインを発現させた大腸菌破碎上清を流すことにより、N-, C-サブユニット複合体としての精製が可能であることも明らかとなった。このことは、N-, C-サブユニットが *in vivo* でも複合体を形成していることを示唆していると考えられる。



(2) 酵素活性測定と結晶化は、精製した組み換え体蛋白質によって行った。酵素活性測定は基質としてグリコールアルデヒド、補酵素に TPP を用いた。その結果、 *T. kodakaraensis* が超好熱菌であることから反応温度を高くしたところ、グリコールアルデヒドが変色をすることが明らかとなり、正確な活性が測定できない結果となった。そこで、今後は高温の反応系に適した活性測定系を構築する必要がある。

また、結晶化はスクリーニングキットを用い、バッファー条件、蛋白質濃度を各種設定し、数百条件の検討を行ったが、まだ結晶は得られていない状況である。さらなる条件検討が必要と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢嶋 俊介

東京農業大学 応用生物科学部  
教授

研究者番号：90301548

(2) 研究分担者

佐々木 康幸

東京農業大学 応用生物科学部  
助教

研究者番号：50398814

(3) 連携研究者