

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K21903

研究課題名（和文）原始環境に存在したと推定されるアミノ酸のみで発現可能なタンパク質機能の探索

研究課題名（英文）Exploration of protein functions that can be expressed solely using amino acids estimated to exist in the primordial environment

研究代表者

赤沼 哲史（Akanuma, Satoshi）

早稲田大学・人間科学学術院・教授

研究者番号：10321720

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：生命誕生以前の原始環境で合成されたアミノ酸から構成された原始タンパク質の機能探索を実施した。特に、RNA結合、ATP結合、鉄-硫黄クラスターを持つタンパク質の構築に必要な少数種類アミノ酸の検討をおこなった。本研究からは、15種類以下のアミノ酸種類で再構成されたタンパク質がRNA結合能を持つことを明らかにした。また、ATP結合活性を持つタンパク質を12種類のアミノ酸で再構成した。さらに、現在の真正細菌および古細菌のフェレドキシンの分子系統解析と推定した祖先アミノ酸配列に基づき、主にプレバイオティックアミノ酸からなる29残基のペプチドの重複による原始フェレドキシンの誕生モデルを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学進化実験、隕石の分析などの地球化学的研究から予測された、初期地球に存在したアミノ酸を主要な構成成分として再構成されたタンパク質が発現し得る機能をいくつか示した。また生命の起源に取り組む方法論として、現在のタンパク質から全生物の共通祖先のタンパク質を経てさらに過去へと遡る研究と、化学進化や地球化学的な研究とを結びつけた新しいアプローチを確立した。加えて、分子系統解析を主体としたトップダウン型手法に構成アミノ酸の種類数を系統的に減らしていくアミノ酸組成単純化実験を組み合わせることが、全生物の共通祖先を超えて過去に遡り、タンパク質の起源に取り組むための有効な手段となり得ることを示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted experiments to estimate the functions of primitive proteins composed of amino acids synthesized in the prebiotic environment before the origin of life. Specifically, we investigated a small number of amino acid species necessary for the construction of proteins with RNA binding, ATP binding, or iron-sulfur cluster formation. The study revealed that proteins reconstructed with 15 or fewer amino acid species possess RNA binding ability. Additionally, we reconstructed proteins with ATP binding activity using 12 amino acid species. Furthermore, based on molecular phylogenetic analysis of existing bacterial and archaeal ferredoxins and the inferred ancestral amino acid sequence, we established a model for the emergence of primitive ferredoxin through duplication of a peptide consisting of 29 residues primarily composed of prebiotic amino acids.

研究分野：地球生命科学

キーワード：生命の起源 タンパク質の起源 RNA結合 ATP結合 鉄硫黄クラスター プレバイオティックアミノ酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命の起源に関して、RNA ワールド仮説が支持を得ており、次の重要な課題の一つとなっているのが「RNA ワールドにどのようにタンパク質が誕生したか？」の解明である。生命誕生以前には、生物が持つアミノ酸生合成系が存在しなかったため、タンパク質合成には環境中に存在したアミノ酸だけが利用されたはずである。しかし、現在のタンパク質合成に使われる 20 種類のアミノ酸すべてが原始地球環境中に揃っていたかは現時点では分からない。むしろ、いくつかのアミノ酸は原始環境中で非生物的に合成されたとは考えづらく、生命誕生後に生合成系によってつくられたアミノ酸もあったと思われる。したがって、原始タンパク質は 20 種類未満のアミノ酸から合成されていたという主張もある。研究代表者が過去の研究で復元に成功した世界最古（約 38 億年前）のタンパク質である祖先生物のヌクレオシドニリン酸キナーゼ (NDK) は高い耐熱性を有し、全生物共通祖先が超好熱菌であった最初の実験による証拠となった (Akanuma et al. PNAS 2013; Akanuma et al. Evolution 2015)。この世界最古の復元タンパク質 Arc1 を用いて、生命誕生以前の原始タンパク質のアミノ酸組成に関する研究を開始した。これまでに、Cys を持たず 19 アミノ酸種から構成される Arc1 から、どれか 1 種類のアミノ酸を他のアミノ酸に置換し欠損させた改変体を 19 個作製した。その耐熱性と触媒活性の解析から、容易に欠損が可能なアミノ酸と欠損が困難なアミノ酸を明らかにした。さらに、欠損が容易なアミノ酸種を系統的に複数種同時に欠損させ、13 アミノ酸種だけから、触媒活性を持ち 70 以上まで安定な Arc1 改変体が合成できること、10 アミノ酸種だけから、触媒活性を失うが、80 以上まで安定な Arc1 改変体が合成できることを示した (Shibue, Akanuma et al., Sci. Rep. 2018)。その 10 アミノ酸種の多くが、非生物的に合成されやすく原始地球に存在したと推定されていることから (Miller, Science 1953; Johnson et al., Science 2008; Cleaves et al., Orig. Life Evol. Biosph. 2008)、最初期のタンパク質は安定な立体構造を形成したが、自身では直接触媒能を持たなかったと推定した。しかし、触媒活性を持たなくても、何らかの別の機能を有したはずである。そこで、原始地球上に存在したアミノ酸種だけから再構成されたタンパク質が発現可能な機能を探索することにした。

2. 研究の目的

上述の観察を踏まえ、本研究では、原始環境に存在したアミノ酸から発現可能なタンパク質機能の解明を目的とした。作業仮説として、RNA との結合、ATP 結合、鉄 - 硫黄クラスター形成を原始的機能と仮定し、これらの機能発現に必要な最少のアミノ酸種類の検討をおこなった。

3. 研究の方法

(1) RNA ワールドにどのようにタンパク質が誕生したか？を考える際に真っ先に思い浮かぶ原始タンパク質の機能は RNA 機能の補助 (RNA の安定化、RNA 触媒の活性化など) である。そのためには原始タンパク質が RNA と相互作用する必要がある。原始 RNA 結合タンパク質が少数種アミノ酸組成を持っていた可能性を検証することを目的に、まずは、現存リボソームタンパク質 uS8 のアミノ酸配列の解析から分子系統樹を作成し、その系統樹を利用して真正細菌共通祖先 uS8 を復元した。さらに祖先型 uS8 を少数種のアミノ酸のみで再構築し、その RNA 結合能を解析することによって、RNA 結合活性の発現に必要な最少アミノ酸種類の同定を試みた。

(2) 細胞の「エネルギーの通貨」とも呼ばれる ATP は、現存のすべての生物が細胞内のエネルギーの保存や利用に用いる化合物であると同時に RNA の前駆体の一つでもある。したがって、ATP 結合は原始タンパク質が獲得した機能の有力候補の一つである。これまでの研究で、13 アミノ酸種で再構成した Arc1-13 が ATP 結合活性を持つことを明らかにした。そこで、Arc1-13 からさらに 1 種ずつ系統的にアミノ酸種を欠損させることで、ATP 結合活性を失わずにどこまでアミノ酸種類を減らせるか検討した。

(3) 自己複製触媒から細胞生物の誕生に至る過程は海底面の硫化鉄マウンドで起こったという仮説 (Koonin & Martin, Trends. Genet. 2005) に代表されるように、鉄と硫黄は生命の起源に深く関わったはずである。そこで、内部に鉄 - 硫黄クラスターを持つ原始的なタンパク質の代表であるフェレドキシンに着目した。最初に、現存フェレドキシンアミノ酸配列の分子系統解析をおこない、古細菌共通祖先フェレドキシンと真正細菌共通祖先フェレドキシンのアミノ酸配列を推定した。推定した祖先型フェレドキシンのアミノ酸組成の解析、および、アミノ酸配列の解析から、原始フェレドキシン誕生シナリオを考察した。

4. 研究成果

(1) RNA 結合能を持つタンパク質の合成に必要な最少アミノ酸種類数を同定するため、まず、配列データベースから現存生物の uS8 のアミノ酸配列を収集し、多重配列アライメントを作成した。このアライメントを基に、uS8 の分子系統樹を構築した。構築した系統樹では、古細菌由来配列と真正細菌由来配列がそれぞれ単系統となった。多重配列アライメントと系統樹を用いて、真正細菌共通祖先 uS8 のアミノ酸配列を推定し、そのアミノ酸配列をコードする遺伝子を合成、大腸菌に取り込ませ、大量発現をおこなった。祖先型 uS8 を精製後、熱安定性と RNA 結合能を解析した。その結果、祖先型 uS8 は現存生物が持つ uS8 と同程度の親和性で RNA と結合することを明らかにした。

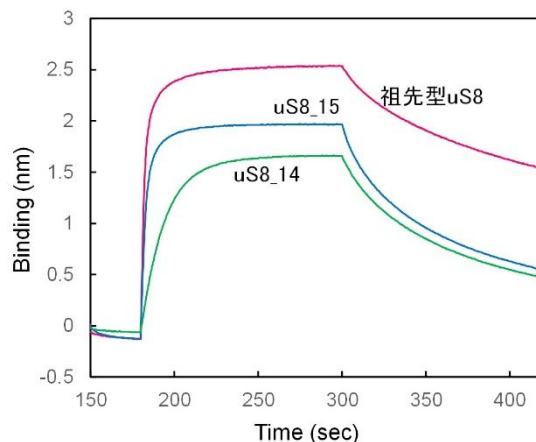


図1 . BLITZ システムによる RNA 結合解析

推定・復元した祖先型 uS8 はヒスチジン残基を持たないため、19 種類のアミノ酸から構成された。19 種類のうち、1 種類のアミノ酸を完全に欠損させた、18 アミノ酸種だけから構成された uS8 改変体を設計した。すなわち 19 種類の 1 アミノ酸種欠損体を合成した。RNA 結合活性解析をおこなった結果、19 種類の改変体のうちの 9 種類が RNA 結合活性を保持していた。すなわち、9 種類のアミノ酸は RNA 結合能を損ねることなく容易に欠損が可能であり、ヒスチジンを除く残りの 10 種類のアミノ酸は欠損が困難であった。

次に、欠損が容易であった 9 種類のアミノ酸のうちの複数のアミノ酸種を同時に欠損させた uS8 改変体を構築した。15 種類と 14 種類のアミノ酸だけで構成された uS8_15 と uS8_14 は RNA 結合活性を保持することを明らかにした (図1)。したがって、RNA 結合活性を保持したタンパク質が、現存の 20 種類よりもはるかに少ない種類のアミノ酸だけから合成可能であり、進化の初期段階に誕生した RNA 結合タンパク質は、20 種類よりも少ないアミノ酸種だけから構成されていた可能性が支持された。

(2) ATP 結合活性の発現に必要な最少アミノ酸種類数を同定するため、祖先型ヌクレオシドリリン酸キナーゼである Arc1 あるいは少数種アミノ酸で再構成された Arc1 改変体の ATP 結合活性を、ATP アガロースを用いて検証した。その結果、Arc1 と 13 アミノ酸種で再構成された Arc1-13 では ATP 結合活性が見られた。さらに、Arc1-13 からアルギニンまたはアスパラギンを欠損させた改変体では ATP 結合活性が見られなかったが、Arc1-13 からヒスチジンまたはチロシンを欠損させた改変体は ATP と結合することを明らかにした。すなわち、12 種類のアミノ酸から ATP 結合活性を発現可能であることを示した。

さらに、11 種類のアミノ酸から再構成された改変体の ATP 結合活性を検討した。しかし、11 種類のアミノ酸から再構成された改変体の中から ATP 結合活性を持つ改変体は得られなかった。

一方、Arc1-13 と異なる 13 アミノ酸種から Arc1-13(F) と Arc1-13(M)、12 アミノ酸種から Arc1-12(FM) を合成した。これら 3 つの改変体は、本来の NDK 活性である反応を触媒しなかったが、Arc1-12(FM) は、本来の活性とは異なる、2 分子の ADP から ATP と AMP を合成する反応を触媒することを見出した。

(3) 鉄-硫黄との相互作用に必要な最少アミノ酸種類数の同定を試みた。現在のタンパク質合成に使われる 20 種類のアミノ酸のうち、10 種類 (Ala, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Pro, Ser, Thr, Val) は様々な証拠に基づいて初期地球に比較的豊富に存在したとしばしば報告されており、プレバイオティックアミノ酸として参照される。一方、残りの 10 種類のアミノ酸は非プレバイオティックアミノ酸とされる。フェレドキシンの進化系統解析と祖先配列解析から推定された原始フェレドキシン配列のアミノ酸組成を解析したところ、アーキア共通祖先フェレドキシンでは非プレバイオティックアミノ酸のうちの 7 アミノ酸種が欠損しており、バクテリア共通祖先フェレドキシンでは、非プレバイオティックアミノ酸のうちの 6 アミノ酸種が欠損していた。また、現存の真正細菌のフェレドキシンと比べて、アーキア共通祖先フェレドキシン、バクテリア共通祖先フェレドキシンともにプレバイオティックアミノ酸が占める割合が増加していた。この結果は、プレバイオティックアミノ酸が原始タンパク質において多く使われていたことを支持する新たな証拠と言える。

さらに、復元した祖先型フェレドキシンのうちのひとつについて大量発現、精製、解析を実施した。吸光スペクトル解析から内部に 4 鉄-4 硫黄クラスターを含むことが確認された。熱変性解析からは、60 以上まで安定な構造を保持することが明らかになった。したがって、現時点で、15 種類程度のアミノ酸があれば、鉄-硫黄クラスターを持つフェレドキシンを構築できることを明らかにした。この 15 種類という数字は、今後の研究の発展によってはさらに少なくなる可能性がある。

さらに本研究では、現存の真正細菌および古細菌のフェレドキシンの分子系統解析と推定し

た祖先アミノ酸配列に基づき、主にプレバイオティックアミノ酸からなる 29 残基のペプチドの重複による原始フェレドキシンの誕生モデルを構築した。

<引用文献>

Akanuma S, Nakajima Y, Yokobori S, Kimura M, Nemoto N, Mase T, Miyazono K, Tanokura M, Yamagishi A. Experimental evidence for the thermophilicity of ancestral life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 2013, 11067-11072

Akanuma S, Yokobori S, Nakajima Y, Bessho M, Yamagishi A. Robustness of predictions of extremely thermally stable proteins in ancient organisms. *Evolution* 69, 2015, 2954-2962

Shibue R, Sasamoto T, Shimada M, Zhang B, Yamagishi A, Akanuma S. Comprehensive reduction of amino acid set in a protein suggests the importance of prebiotic amino acids for stable proteins. *Sci. Rep.* 8, 2018, 1227

Miller, SL. A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science* 117, 1953, 528-529

Johnson AP, Cleaves HJ, Dworkin JP, Glavin DP, Lazcano A, Bada JL. The Miller volcanic spark discharge experiment. *Science* 322, 2008, 404

Cleaves HJ, Chalmers JH, Lazcano A, Miller SL, Bada JL. A reassessment of prebiotic organic synthesis in neutral planetary atmospheres. *Orig. Life Evol. Biosph.* 38, 2008, 105-115

Koonin EV, Martin W. On the origin of genomes and cells within inorganic compartments. *Trends Genet.* 21, 2005, 647-654

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 赤沼哲史	4. 巻 48
2. 論文標題 原始タンパク質における少数種アミノ酸組成の実験的検証	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viva Origino	6. 最初と最後の頁 4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.50968/vivaorigino.48_4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kimura M, Akanuma S.	4. 巻 88
2. 論文標題 Reconstruction and characterization of thermally stable and catalytically active proteins comprising an alphabet of ~13 amino acids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Mol. Evol.	6. 最初と最後の頁 372-381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00239-020-09938-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryutaro Furukawa, Satoshi Akanuma
2. 発表標題 Ancestral sequence inference of ferredoxins possessed by the last archaeal and bacterial common ancestors
3. 学会等名 RIKEN BDR Symposium 2022 “Emergence in Biological Systems: Challenges to Bridging Hierarchies”（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古川龍太郎、赤沼哲史
2. 発表標題 フェレドキシンの祖先配列推定に基づく原始タンパク質のアミノ酸組成の推定
3. 学会等名 第10回日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤沼哲史
2. 発表標題 プレバイオティックアミノ酸による触媒活性を持ったタンパク質の再構築
3. 学会等名 生命の起原および進化学会2021年オンラインシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 趙方正、古川龍太郎、赤沼哲史
2. 発表標題 リボソームタンパク質S8の祖先配列再構成と解析
3. 学会等名 2019年度アストロバイオロジーワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 趙方正、赤沼哲史
2. 発表標題 少数種アミノ酸を用いた機能ある祖先型リボソームタンパク質uS8の再構築
3. 学会等名 第12回日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 趙方正、赤沼哲史
2. 発表標題 祖先再構成型リボソームタンパク質を用いた原始タンパク質のアミノ酸組成の探索
3. 学会等名 第47回 生命の起原および進化学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 趙方正、赤沼哲史
2. 発表標題 少数種アミノ酸を用いた祖先型リボソームタンパク質uS8の再構築
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤沼哲史
2. 発表標題 宇宙や原始地球にありそうなアミノ酸から酵素をつくる
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関