

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15854

研究課題名（和文）単純なペプチドから汎用的な祖先タンパク質フォールドへの進化

研究課題名（英文）Protein evolution from simple peptide to versatile protein fold

研究代表者

八木 創太（Yagi, Sota）

早稲田大学・人間科学学術院・講師（任期付）

研究者番号：10779820

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、遺伝子発現システムで働く多くのタンパク質に保存される β -バレル構造の進化を実験的に再現することに成功した。初めに、RNAポリメラーゼの活性コアに存在する β -バレル構造DPBBが7種類のアミノ酸からなる約40残基ほどの短いダイマーペプチドから再構成できることを見出した。この単純で短いペプチドは環境条件に従って自然界にはない新たな β -バレル構造DZBBも形成することを発見した。このDZBBはタンパク質進化のミッシングリンクとなる構造であり、OB構造など他の β -バレルタンパク質構造へと分岐進化可能であることを明らかにした。これらは、遺伝子発現系の初期進化を明らかにする上で大きな成果だと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の初期進化研究は理論的研究が先行しており、実験的検証が進んでいない状況であった。それに対して、本研究では、遺伝子発現系に關与するRNAポリメラーゼやリボソームタンパク質が持つ β -バレルタンパク質がどのようにして単純なペプチド配列から進化してきたのか、また β -バレル構造の多様化が生じてきたのかを実験的に明らかにしてきた。これらの結果は、将来的に遺伝子発現系がどのように誕生し進化をしてきたかを明らかにする上で実験的な証拠を提供し、生命の起源の理解に大きな貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this project, I have succeeded in experimentally reconstruction of the evolution of the β -barrel structure conserved in many proteins involved in the gene expression system. First, I found that the β -barrel fold DPBB conserved in the active core of RNA polymerase can be reconstituted from a short dimeric peptide of about 40 residues consisting of seven types of amino acids. I also found that this simple short peptide can adopt a new β -barrel structure, DZBB, which is not found in nature. The DZBB can be converted to other β -barrel protein folds, such as the OB structure, suggesting that it may be the missing-link in the evolution of proteins. These findings are a remarkable achievement in elucidating the early evolution of gene expression systems.

研究分野：分子進化学

キーワード：タンパク質 生命の起源 RNAポリメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

生命の中枢を成す「セントラルドグマ」は1958年にフランス・クリックにより提唱され (Crick, et al., Symp. Soc. Exp. Biol., 1958) 今日では一般論として多くの人に認知されている。しかし、60年以上経った今でも、セントラルドグマがどのように誕生したかは全く分かっておらず、生物学における究極の謎の1つである。セントラルドグマを司る実態はDNA、RNA、タンパク質である。そして、DNAとRNAはタンパク質により「複製」、「転写」過程で合成され、タンパク質はRNAにより「翻訳」の過程で合成される。つまり、核酸とタンパク質は互いに合成し合う依存関係にあり、この関係性こそがセントラルドグマの根幹とも言えるシステムを成している。この共依存的関係を成立させているのはDNA/RNAポリメラーゼとリボソームである。すなわち、これら触媒酵素の進化的起源を理解することができれば、セントラルドグマの起源の解明が期待できる。

DNA/RNAポリメラーゼの起源には、その活性部位を構成するバレル構造である Double-psi beta-barrel (DPBB) 構造があったと考えられている。また、リボソームタンパク質をはじめとした各種翻訳系に関するタンパク質にはRIFT構造や、OB構造、SH3構造などの類似した小型バレルタンパク質構造が保存されている。これらの異なるバレル構造は配列などが異なる一方で、部分的な構造類似性が認められることから、進化的関係性があると考えられてきた。ただし、実験的検証も行われていないため、どのようにこれらのバレルタンパク質が進化してきたかは謎であった。

2. 研究の目的

本研究では、RNAポリメラーゼの活性部位で保存されるDPBB構造の初期進化過程を再現することで、どのように原始的なタンパク質が作られるようになったかを明らかにする。また、DPBBと他のバレルタンパク質構造の進化を実験的に再現することで、これら古代タンパク質の進化的関係性を明らかにする。以上のタンパク質の初期進化過程を解明することで、セントラルドグマの起源に関する知見を得ることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

これまで、RNAポリメラーゼは活性部位を構成するDPBB構造から誕生してきたと考えられてきた。また、このDPBBの内部構造に着目すると、N末端半分とC末端半分の配列および構造が似ている(内部対称性が高い)。そのため、古代のDPBBは40残基程度のペプチドがホモダイマーとなってDPBBを形成しており、その後遺伝子重複と融合を経て80残基程度のDPBBに進化してきたと仮説が立てられていた。そこで、本研究ではこの仮説にのっとり古代DPBBの再構成を進めた。現代のDPBBにおいて特に内部配列対称性が高いDPBBタンパク質を出発材料として、約40残基の配列が二回繰り返した完全対称型DPBB、さらに半分にした約40残基で構成されるホモダイマーを構築した。また、古代の翻訳系では20種以下のアミノ酸しか利用できなかったと推定されているため、本研究でも20種以下の限定アミノ酸セットでホモダイマーDPBB配列を構築した。さらに上記で構築した単純なDPBB配列から他のバレルタンパク質へと、どの程度の変異で変換できるかを検証した。

設計した配列は大腸菌による異種発現を行ったのち、精製した。物理化学的解析により、設計した各種タンパク質改変体の二次構造、構造安定性、オリゴマー形態を解析した。さらに、精製したタンパク質改変体はX線結晶構造解析により、その3次元構造を確認した。

4. 研究成果

(1) DPBB フォールドの進化の再構成

自然界において高い内部対称性を持つDPBB配列を同定した。Methenopyrus kandlerii と Aeropyrum pernix の持つ分子シャペロンVCPのDPBBドメインは約40%ほどの内部対称性を維持していることを見出した。これらのDPBBドメインを出発材料とし、理論的設計法及び計算科学的手法により内部に完全な二回対称性を持つDPBBを13種構築

したところ、10種がDPBB構造を維持し、X線結晶構造解析から少なくとも5種は設計通りの完全内部対称DPBB構造を持つことが確認できた。

さらに、この完全内部対称DPBBを半分とした43残基のペプチドもホモダイマー化しDPBB構造を維持することを発見した。本結果は、DPBBフォールドが50残基にも満たない短いホモダイマー化ペプチドから誕生したという仮説を裏付ける結果である。

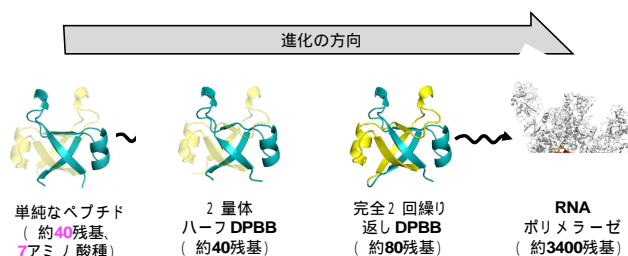


図1: DPBBの進化の再現

また、このペプチドは13種類のアミノ酸で構成されていることに着目し、より少ないアミノ酸種でDPBBが構築できないかを検討した。その結果、7種類のアミノ酸(Ala, Val, Gly, Asp, Glu, Lys, Arg)でもDPBB構造を維持できることが分かった。つまり、**短く単純なペプチド(43残基・7アミノ酸種)であってもDPBBフォールドが誕生しうることを実験的に証明できた(図1)**。

この結果はJournal of the American Chemical Society誌に掲載され理化学研究所のプレスリリースにも掲載された。

(2) 新規 バレルフォールドの発見

上記(1)の研究で短く単純なペプチドでもDPBB構造を作れることを見出したが、このペプチドは同じ配列であるにもかかわらず異なる環境条件では異なる **バレル構造へと形態変化するMetamorphicタンパク質**であることを発見した(図2)。X線結晶構造解析の結果、このバレル構造は自然界にはない全く新しい構造であるためことがわかり、このバレルをDouble-zeta beta-barrel (DZBB)と名付けた。興味深いことに、このDZBBは、翻訳系関連酵素(リボソームタンパク質など)に高度に保存されるバレル構造群(RIFTバレル、OB-fold)と高い類似性が認められた。また、RIFTバレルタンパク質に高度に保存される5つのアミノ酸を導入したところ、DZBBの構造安定性が高まった。これらの結果は、DZBBは転写を司るDPBB RNAポリメラーゼと、翻訳系を司るリボソームタンパク質の進化をつなぐミッシングリンクの可能性が高いと言える。

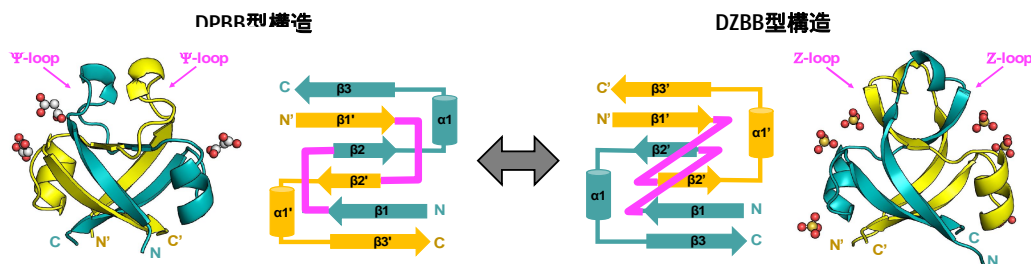


図2：DPBB構造と発見したDZBB構造

(3) バレルフォールド間の分岐進化の再現

上記で発見したDZBBからOB構造やRIFT構造への進化が実際に可能なのか、どの程度の変異で構造変換が可能であるかを検証した。その結果、DZBBの一部のアミノ酸配列を削除するとRIFT構造へと変換できることがわかった。また、DZBBに数個のアミノ酸変異および短い配列挿入することでOB構造へと変換できることを見出した(図3)。さらに、作成したOBタンパク質を円順列置換変異(Permutation)させることで、SH3構造となることも見出した。これらの結果から、DZBB構造を介して、転写酵素に欠かせないバレル構造(DPBB)、翻訳酵素に欠かせないバレル構造(RIFT、OB、SH3)は相互に変換可能であり、これらのバレルタンパク質構造は同一の祖先タンパク質から分岐進化してきた可能性がわかった(図3)。また、これらの構造変換は非常に単純な変異で達成できることから、非常に短い期間にバレルタンパク質の構造多様化は完了したかもしれない。この結果はセントラルドグマの初期進化を理解する上で大きな発見であり、現在、本成果をまとめ学術論文として国際誌へ投稿している。

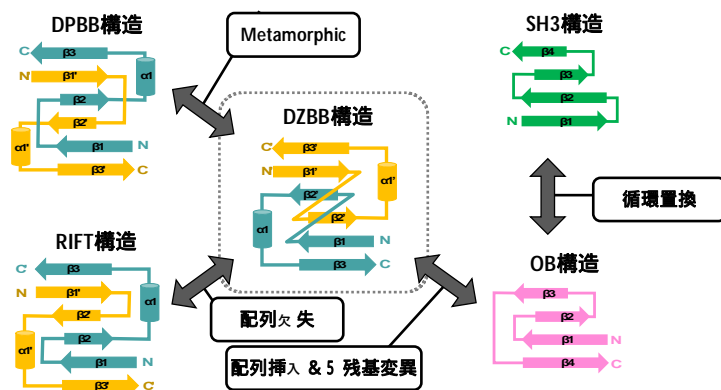


図3：バレル構造の進化の実験的再現

(4) バレルの起源となりうるダイマーペプチドの再構成

2023年度においては、上記のバレル構造群のさらなる進化ネットワークの拡張を目指した。特に、金属結合タンパク質であるRubredoxinはSH3構造と立体構造がよく似ていることから、両者の進化的関係性は以前より提唱されていた。そこで、申請者が上記で作成したSH3タンパク質にRubredoxinで保存される金属結合残基を導入したところ、Rubredoxinと同様に金属結合性能を獲得し、X線結晶構造解析の結果、Rubredoxin様の構造をとることを見出した。つまり、Rubredoxinも上記のバレルタンパク質の進化ネットワークに含まれる可能性が高い。また、Rubredoxinはセントラルドグマに関与するタンパク質だけでなく、代謝系に関与するタンパク質でも多く保存されているため、バレル構造の分岐進化は遺伝子発現系だけでなく代謝系の発展にも寄与したかもしれない。本成果についても現在論文執筆中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sota Yagi, Aditya K. Padhi, Jelena Vucinic, Sophie Barbe, Thomas Schiex, Reiko Nakagawa, David Simoncini, Kam Y. J. Zhang, and Shunsuke Tagami	4. 巻 143
2. 論文標題 Seven Amino Acid Types Suffice to Create the Core Fold of RNA Polymerase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 15998-16006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c05367	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 該当する
1. 著者名 八木創太、田上俊輔	4. 巻 50
2. 論文標題 7種類のアミノ酸だけで古代 パレルを創る	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viva Origino	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.50968/vivaorigino.50_1	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 -
1. 著者名 Yagi Sota, Padhi Aditya K., Vucinic Jelena, Barbe Sophie, Schiex Thomas, Nakagawa Reiko, Simoncini David, Zhang Kam Y. J., Tagami Shunsuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Seven amino acid types suffice to reconstruct the core fold of RNA polymerase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biorxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.02.22.432383	査読の有無 無
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 Yagi Sota, Tagami Shunsuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Missing-link fold reveals the evolutionary pathway between RNA polymerase and ribosomal proteins	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biorxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.07.05.547881	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Sota Yagi and Shunsuke Tagami
2. 発表標題 Experimental reconstruction of the evolutionary pathway bridging central dogma machinery via a missing-link fold
3. 学会等名 Joint CO world & 12th ELSI Symposium “EMERGENCE AND DETECTION OF LIFE”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Sota Yagi and Shunsuke Tagami
2. 発表標題 Experimental reconstruction of the evolutionary pathway between ancient beta barrel proteins
3. 学会等名 日本進化学会第25回沖縄大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sota Yagi and Shunsuke Tagami
2. 発表標題 Reconstruction of ancient protein folds in the central dogma machinery
3. 学会等名 Library Design for Protein Engineering 2023, OIST mini symposium（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 八木創太、田上俊輔
2. 発表標題 13残基ペプチドを起源とした バレル構造群の進化
3. 学会等名 第48回 生命の起源および進化学会学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Sota Yagi and Shunsuke Tagami
2. 発表標題 Experimental reconstruction of the evolutionary pathway bridging central dogma machinery via a missing-link fold
3. 学会等名 Joint CO world & 12th ELSI Symposium “EMERGENCE AND DETECTION OF LIFE” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Sota Yagi and Shunsuke Tagami
2. 発表標題 Reconstruction of ancient protein folds in the central dogma machinery
3. 学会等名 Library Design for Protein Engineering 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sota Yagi and Shunsuke Tagami
2. 発表標題 Experimental reconstruction of the evolutionary pathway between ancient beta barrel proteins
3. 学会等名 日本進化学会第25回沖縄大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 八木創太、田上俊輔
2. 発表標題 Experimental reconstruction of the evolutionary pathway between ancient four b-barrels through a missing-link fold
3. 学会等名 第47回 生命の起源および進化学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 八木創太、田上俊輔
2. 発表標題 Reconstruction of the evolution of the ancient b-barrels with a limited amino acid types
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 八木創太、田上俊輔
2. 発表標題 RNAポリメラーゼの進化的起源
3. 学会等名 第24回日本進化学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八木 創太、田上 俊輔
2. 発表標題 単純なペプチドから RNA ポリメラーゼコアドメインへの進化過程の実験的再現
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八木創太、田上俊輔
2. 発表標題 古代 バレルタンパク質のメタモルフォーゼ
3. 学会等名 第46回 生命の起原および進化学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八木創太
2. 発表標題 7種類のアミノ酸だけで古代 パレルを創る
3. 学会等名 生命の起原および進化に関するシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sota Yagi
2. 発表標題 Evolution of the core fold in RNA polymerase from ancient simple peptide
3. 学会等名 RIKEN BDR symposium 2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>生命誕生初期のタンパク質を再現する試み https://www.riken.jp/press/2021/20211202_2/index.html Evolution of a RNA polymerase https://www.riken.jp/en/news_pubs/research_news/rr/20220127_1/index.html</p>

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
---------	---------