

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440194

研究課題名(和文) 真正細菌と古細菌由来タンパク質のEvolvability

研究課題名(英文) Evolvability of thermophilic proteins from archaea and bacteria

研究代表者

高野 和文 (Takano, Kazufumi)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：40346185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： 生命の進化の謎を明らかにするために、タンパク質に着目した。タンパク質も生命の進化と共に、そのアミノ酸配列を変化させてきた。本研究では、タンパク質にランダムに変異を入れ、機能が向上(進化)するために必要な要因を探った。その結果、タンパク質の安定性が重要であることが分かった。このことは、生命の起源が、好熱菌であることと関連しており、進化における新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)： To understand the evolution of life, we focused proteins. Proteins have changed their amino acid sequences along with evolution. In this study, we investigated a random mutational drift of proteins for evolution. Our results collectively support a crucial link between protein evolution and stabilization mechanisms based on the evolutionary history of organisms.

研究分野： 生体分子工学

キーワード： タンパク質 進化 安定性

1. 研究開始当初の背景

生物界は、真正細菌・古細菌・真核生物の3つのドメインに分けられる。真正細菌と古細菌は進化初期に分岐し、古細菌は真核生物と同じ系統に属する。真正細菌と古細菌には、(超/高度)好熱菌と呼ばれる高温環境に生育する生物が属しており、それらは進化系統樹の根本に存在する。好熱性の真正細菌と古細菌およびそれらが産するタンパク質に関する最近の知見を以下に示す。

- ・好熱性古細菌は、高温環境に生育してきたが、好熱性真正細菌は、一度常温環境に適応したのち、高温環境に再適応した。
- ・好熱菌タンパク質の高い安定性は、タンパク質の進化に重要な因子である。
- ・好熱性古細菌由来のタンパク質は、主に分子内部の疎水性相互作用により安定化されているが、好熱性真正細菌由来のタンパク質は、特異的な水素結合やイオン結合により安定化されている。
- ・好熱性古細菌由来のタンパク質の変性速度は著しく遅い。

これらの知見を踏まえ、『真正細菌と古細菌のタンパク質のEvolvabilityは異なるのではないか?』という仮説を提唱した。

2. 研究の目的

上記のように、異なる生物界ドメインを構成する「真正細菌」と「古細菌」において、近年、それらのタンパク質が、アミノ酸組成・配列のみならず、構造物性も異なることが明らかとなってきた。本研究では、これらの違いがタンパク質の進化に影響を及ぼしてきたという仮説を立て、これらのタンパク質の進化実験を行い、両ドメインにおける進化する力『Evolvability』を検証する。具体的には、ランダム変異を導入し、変異による機能への影響力を調べる。本研究により、進化とタンパク質の構造特性における新たな知見の獲得が期待できる。

3. 研究の方法

好熱性の真正細菌と古細菌が産するタンパク質について、エラープローンPCRを用いてランダム変異体を作製し、それらの活性を測定する。ランダム変異により、活性が上昇する変異体タンパク質が得られるのかを検証するとともに、その結果の原因を、それら変異体タンパク質の配列解析・安定性測定などを通して探求する。また、高活性変異体タンパク質など特徴的な変異体が見られれば、その変異体を基に同様の実験を繰り返す(第2世代・第3世代...)。活性向上(進化)の限界や活性向上の必須因子の抽出も追及する。(図1)

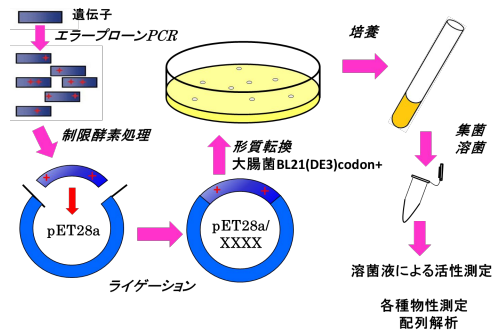


図1 実験概要

4. 研究成果

まず、好熱性 Archaea タンパク質である *Sulfolobus tokodaii* 由来エステラーゼ (Sto-Est) を用いた進化実験を行った。その結果、活性の向上する変異体が見られ、さらに高活性変異体をテンプレートに用いた第2世代・第3世代においても、活性の向上する変異体が見られた。(図2) また、安定性を保持した変異体と損失した変異体を進化させながら、活性変動を観測することにより、進化過程における安定性と活性の関係を調べた。その結果、活性が低下した変異体が再び復活するには、安定性の寄与が必要不可欠であることと、安定性を保持した変異体の方が、更なる進化を遂げる可能性が高いことなどがわかった。(図3)

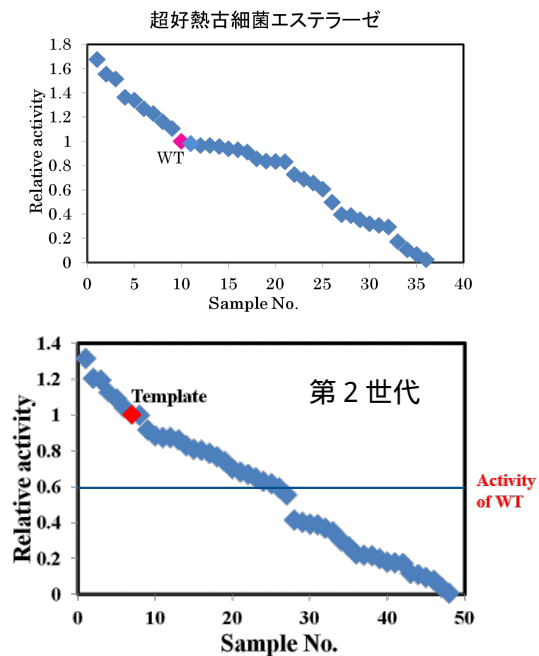
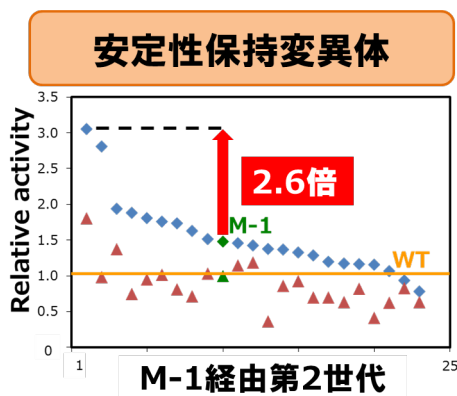
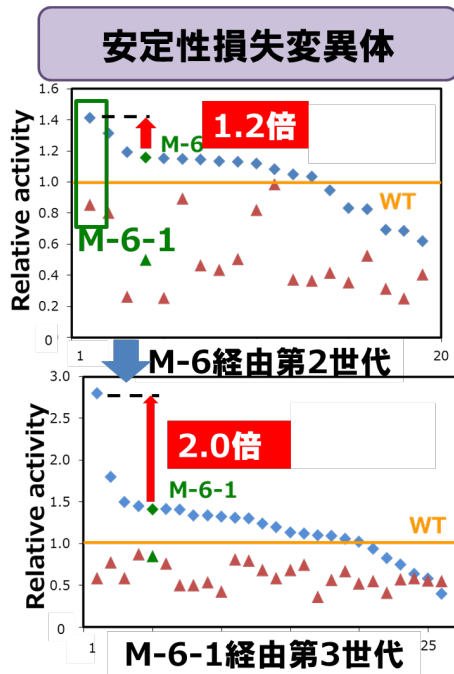


図2 進化実験結果



活性上昇率

安定性保持 > 安定性損失

図3 進化実験結果

次に、好熱性 Bacteria 由来エステラーゼの連続進化実験を行い、好熱性 Bacteria 由来タンパク質の進化に必要な因子を見出すことに取り組んだ。その結果、すべての変異体の活性は低下した。(図4)そこでより詳細に調べた結果、変異により至適温度での活性が低下しても安定性を保持していれば再び復活する可能性があること、安定性が大幅に低下した変異体は至適温度での復活の可能性は低いが、低温への適応力があることなどがわかった。(図5)

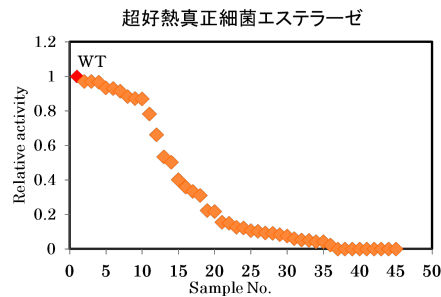


図4 進化実験結果

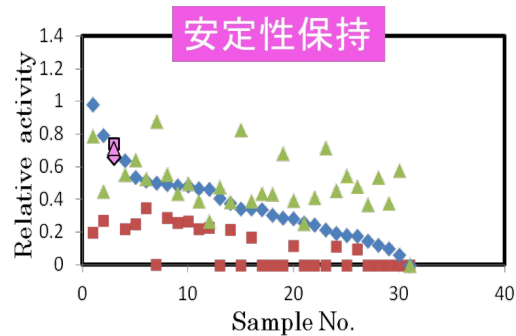


図5 進化実験結果

以上の結果、安定性は進化過程において必須因子であることが示唆された。タンパク質が有害な変異に耐えて、より良い機能を得るためには、一定の安定性を保持している必要があると考えられる。生物においても、進化過程における長時間の変異の蓄積に耐えるためには、タンパク質の安定性が不可欠であったと考えられ、進化における新たな要因を見出すことができた。

5. 主な発表論文等
(研究代表者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Kazufumi Takano, Atsushi Aoi, Yuichi Koga & Shigenori Kanaya, *Evolvability of Thermophilic Proteins from Archaea and Bacteria*, *Biochemistry*, 査読有, 52 巻, 2013, 4774-4780
DOI: 10.1021/bi400652c

[学会発表](計6件)

高野和文、青井敦史、古賀雄一、金谷茂則、好熱性 Archaea と Bacteria 由来タンパク質の Evolvability, 第15回日本進化学会、つくば、2013.8.28-31
K. Takano, A. Aoi, Y. Koga, S. Kanaya, *Evolvability of thermophilic proteins from archaea and bacteria*, *Thermophiles 2013*, Regensburg (Germany), 2013.9.8-13

倉橋亮、岡田淳、佐野智、高野和文、好熱性タンパク質の Evolvability と安定性の関係、第 14 回日本蛋白質科学会、横浜、2014.6.25-27

倉橋亮、佐野智、高野和文、好熱性 Archaea タンパク質の進化過程における安定性と活性の関係、日本農芸化学会関西支部第 489 回例会、京都、2015.5.23

倉橋亮、佐野智、高野和文、生物進化過程におけるタンパク質の安定性の役割、日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌、2016.3.27-30

太田夏子、倉橋亮、佐野智、高野和文、好熱性 Bacteria 由来タンパク質の進化過程における安定性の役割、第 16 回日本蛋白質科学会、福岡、2016.6.7-9 (発表確定)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 和文 (TAKANO, Kazufumi)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：40346185