

「生命活動のプログラム」
平成 8 年度採択研究代表者

鈴木 理

(生命工学工業技術研究所 室長)

「超好熱性古細菌転写因子ネットワークの構造生物学的解析」

1. 研究実施の概要

本研究では超好熱性古細菌の転写調節機構を系統的に解析する事により、

1. 転写調節系全体像の解明
2. 細胞内での生体高分子(蛋白質、核酸)の耐熱化機構の解明
3. 古細菌を含めた三生物界の進化の機構の解明を目標とする。

平成11年度は、特に、研究目標 2 について成果を得た。好熱性古細菌 *Thermoplasma volcanium* のゲノム全塩基配列を決定、確認し、この配列を超好熱性もしくは常温性の微生物のゲノム配列と比較する事により、また 超好熱性、好熱性古細菌由来の蛋白質の立体構造の決定、解析により、特に からは個々の分子を安定化するための具体的な要因が、 からは、それらの分子を1つの細胞システムへと統合し、高温で機能させるための要因が明らかになった。*T. volcanium* の最適生育温度は60度で、すでにその全塩基配列が決定されている超好熱性微生物(産業上有用な菌等、最適生育温度80~100度)と常温性微生物(病原菌や大腸菌等、最適生育温度37度付近に集中)の中間に位置し、この事実が、これらの要因の同定のために極めて重要であった。

2. 研究実施内容

ゲノム配列の比較解析に基づく耐熱機構の解明 耐熱機構の解明のためには、異なる生育温度に適応した古細菌どうし、さらには真正細菌との系統的な比較が重要である。本研究以外で、現在までにゲノム配列の決定対象となった古細菌、真正細菌は、主として、1. 産業上の有用性(耐熱酵素の利用等)や、2. 人間との緊密な関係(大腸菌や病原菌に代表される)から選択されてきた。この結果、これらの菌は、最適生育温度が80度以上の高温の群と37度近辺の2群に二分されている。*T. volcanium* の最適生育温度はこの中間(60度)であり、比較のための重要な位置を占める。*T. volcanium* を中心として、これらの配列を比較した結果、古細菌の最適生育温度と以下の3点に強い相関が同定された。表現を変えるなら、これらが、DNA分子や蛋白質を一つの細胞システムの中に組織し、このシステムをより高い温度で機能させるための必要事項である。

第一はゲノムDNA分子中でピリミジン(Y)どうし (TT/CC/TC/CT) もしくはプリン(R) どうし (AA/GG/AG/GA) を組み合わせ、一方YR (TA/TG/CA/CG) やRY (AT/AC/GT/GC) の組み合わせを避ける傾向が、最適生育温度の上昇につれて、より明確化する事である。この傾向と最適生育温度の相関はきわめて高く (相関係数0.92) 相関を介して、ゲノムDNA配列からその生物の最適生育温度が正確に予測される。X線結晶解析により得られているDNA立体構造に関する情報に照らすと、この事実は、生育温度の高い菌ほどそのゲノムDNA分子が硬い (柔軟性が低い) 事を意味している。蛋白質等との相互作用、また細胞内へのDNA分子全体の収納等に際して、ゲノムDNA分子の柔軟性が重要となる。したがって、異なる生育温度で柔軟性が適切なレベルに保たれるように、ゲノムDNA分子は自らの物性をも記録していると考えられる。

第二はゲノムに記録される、したがって細胞内に存在すると考えられる蛋白質集団の等電点の分布の変化である。大腸菌ゲノムに記録された蛋白質集団の大部分が酸性蛋白質である事は実験的に知られていた。しかしながら、転写、翻訳シグナルの同定をもとに *T. volcanium* ゲノムに正確に同定された蛋白質群は、2群 (酸性蛋白質群と塩基性蛋白質群) に分かれていた。8を中心として7~9付近の等電点を持つ蛋白質はきわめて少なく、両群はこの谷間によって隔てられている。 *Pyrococcus* 属では塩基性蛋白質の集団がさらに増加していた。8つの古細菌のゲノムに共通にコードされている蛋白質を選択し、その等電点の平均値を計算したところ、最適生育温度との高い相関を示した (相関係数0.88)。

等電点の谷間は、一般に蛋白質内に、極端なpK値を持つアミノ酸 (酸性-D,E, 塩基性-K,R) が、中性に近いpK値を持つアミノ酸 (C,H) の10倍近くも存在する事に由来する。最適生育温度の上昇と相関した塩基性蛋白質群の増加は、細胞内での蛋白質の変性の問題と深く関係しているらしい。大腸菌のような常温に生育する菌から抽出した蛋白質溶液を熱すると、蛋白質は変性し、沈殿する。この様に変性と沈殿 (したがって蛋白質群の全体としての電荷の中和) は深く関係している。古細菌細胞中のpHは谷間 (8付近) より酸性側 (5~7) にある。生育温度が上昇して、蛋白質が全体として変性しやすくなる状況の中で、総電荷の中和を避けるために、塩基性の蛋白質集団が増加するのであろう。

第三は、生育温度の低い古細菌、もしくは高い古細菌のみに存在する遺伝子群に関係する。補酵素の中には、それ自身やその中間体が熱的に不安定なものが多い。ヘム合成系に関与する酵素の遺伝子を同定、比較したところ、 *T. volcanium* はヘム a,bの合成に必要な酵素をほぼ全て持つのに対し、より生育温度の高いメタン菌はF430の合成へとバイパスする中間点までに必要な酵素しか持たず、さらに生育温度の高い *Pyrococcus* はこの経路に関与する酵素を全く持たない事が分かった。同様に、

生育温度の上昇とともに避けられる傾向は、葉酸やCoA複合体でも見られた。これ以外にもDNA超構造や蛋白質の安定性に関係する酵素（シャペロンなど）が生育温度に相関して、順次、出現したり、あるいは消失したりする。

蛋白質立体構造に基づく耐熱機構の解明 平成11年度までに総計200～300の古細菌由来蛋白質の発現系を構築し、NMR分光法やX線結晶解析法を適用する事により、その立体構造や物理化学的性質を解析してきた。平成11年度に立体構造が精度よく決定された蛋白質は、RNAポリメラーゼサブユニットTFIIS（*Pyrococcus* 由来）、転写、翻訳関連蛋白質NusG（*Pyrococcus* 由来）、基本転写因子TBP（*Sulfolobus* 由来）である。これらの立体構造を解析した結果、蛋白質が高温下で機能するためには 1 蛋白質の各ドメインを熱的に最安定化するとともに、 2 高温でのドメイン間の熱的ゆらぎを正常なレベルに保つこと（蛋白質が広義の酵素機能を持つためには基質の状態に対応して複数の構造をとらねばならず、これはドメイン内の位置関係の変化によってなされるため）が明らかになりつつある。一般に超好熱菌由来の酵素が常温では機能しない理由は 2 に由来する。つまり常温で機能するには「固すぎる」。少なくとも、TBPでは 1 と 2 の要因はかなりの程度、分離可能である。2つの要素を切り離し、ドメインをより安定に保ちながら、ドメイン間相互作用を適切に維持することができれば、常温から高温まで広い範囲で機能する酵素の設計が可能になるであろう。

3．主な研究成果の発表（論文発表）

Suzuki M.,

An Outline of an Informatical Method for Identifying the Complete Set of Genes Using the DNA Sequence of a Whole Genome, Proceedings of the Japan Academy, B75, 81-86 (1999)

Koike H., Kawashima T., and Suzuki M.,

Comparison of Archaeobacterial Central Metabolic Pathways Using the Genomic DNA Sequences, Proceedings of the Japan Academy, B75, 101-106 (1999)

Makino S., Amano N., Koike H., and Suzuki M.,

Prophages inserted in archaeobacterial genomes, Proceedings of the Japan Academy, B75, 166-171 (1999)

Kawashima T., Yamamoto Y., Aramaki H., Nunoshiba T., Kawamoto T., Watanabe K., Yamazaki M., Kanehori K., Amano N., Ohya Y., Makino K., and Suzuki M.,

Determination of the Complete Genomic DNA Sequence of *Thermoplasma volcanium* GSS1, Proceedings of the Japan Academy, B75, 213-218 (1999)

Higuchi S., Kawashima T., and Suzuki M.,

Comparison of Pathways for Amino Acid Biosynthesis in Archaeobacteria Using Their

Genomic DNA Sequences, Proceedings of the Japan Academy, B75, 241-245 (1999)
Koike H., Kawashima T., and Suzuki M.,
Enzymes Identified Using Genomic DNA Sequences Suggest Some Atypical Characteristics of de novo Biosynthesis of Purines in Archaeobacteria, Proceedings of the Japan Academy, B75, 263-268 (1999)
Makino S., Amano N., and Suzuki M.,
Visual Presentation of Complete Genomic DNA Sequences, and its Application to Identification of Gene-coding Regions, Proceedings of the Japan Academy, B75, 311-316 (1999)
Koike H., Kawashima T., Yamamoto Y., Aramaki H., Kawamoto T., Nakamasu K., Noshiro M., Nunoshiba T., Watanabe K., Yamasaki M., Ohya Y., Amano N., Suckow J.M., Tatenno M., Makino K., and Suzuki M.,
Determination of the Complete Genomic DNA Sequences of Thermoplasma volcanium GSS1, Microbial & Comparative Genomics, 4, 121 (1999)
鈴木理 「生命情報科学- ゲノム生物学と構造生物学を結ぶ-」
『現代化学』 No.341, 30-38 東京化学同人 1999. 8.
鈴木理 「21世紀の生命情報科学」
『化学工業』 第51巻1号, 36-44 2000. 1.