

学 位 論 文 題 名

A pilot study of the structural genomics
of *Pyrococcus horikoshii*

(*Pyrococcus horikoshii* 構造ゲノム科学の先導的研究)

学位論文内容の要旨

ゲノム塩基配列解析はこれまでの分子生物学的パラダイムに変化をもたらしている。すなわち塩基配列の解析により我々の眼前に潜在的な真実の姿が提示されたわけである。しかしながら我々の有するゲノム塩基配列の内容を解析し、そこから引き出した情報を細胞内、生体内のイベントの完全理解に使用するために必要な情報の翻訳手法は未熟である。ポストゲノム期における研究はゲノム情報を種々の生命現象を記述し得るものにする研究と言える。

ゲノム DNA の配列情報は機能分子へと翻訳され、これらの機能分子が複雑なネットワークを構成していく。生体内における機能分子の内、細胞内における基本生命現象から高度な生命現象に至るまで幅広く用いられるのが蛋白質である。蛋白質はその種類と取り巻く環境に応じて固有の機能を発現する。これらの機能は蛋白質の立体構造と深い関わりを有する。ゲノム配列情報から蛋白質の一次配列を解析し、その配列に対応する蛋白質の立体構造を解析することが可能である。しかし、ゲノム解析の結果からも明らかであるが遺伝子の数は膨大であり、これらの遺伝子の産物である蛋白質の立体構造をすべて解析することは物理的に不可能に近い。しかしながら情報生物学の進歩により配列類似性の高い蛋白質の立体構造予測の精度が向上しており、すべての蛋白質の立体構造を実験的に解析せずともホモロジーモデリング法により大多数の蛋白質の構造予測（解析）が可能になると考えられている。しかし、モデリングの精度を向上させるためにはこれまでに発見されていないフォールドなどを実験的に立体構造解析しなければならない。その数は少なくとも 10,000 個以上と推定されている。

日米欧を主軸とした国際協調によりこれらの対象となる蛋白質の重複を避け、また多種の蛋白質を短期間に構造解析することを目的としたプロジェクトである構造ゲノム科学プロジェクトが 2001 年春より開始された。本研究はこのプロジェクトのコアとなる技術であるハイスループット蛋白質立体構造解析の必要性に着目し、超高度好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* ゲノムをターゲットとして行った先導的研究である。対象となった蛋白質は配列比較により機能が予測される蛋白質約 100 種と機能が予測できない蛋白質の内、非膜蛋白質と推定された中から生物種間で広く保存されている 84 種の蛋白質であった。蛋白質調製は大腸菌組換え発現系を用い、並列処理を基本としたストリームラインを構築してきた。我々のチームはストリームラインの構築と平行し、結晶構造解析を行い、これまでに 35 種の蛋白質結晶が得られ、その内 13 種が構造解析された。本論文では例として機能予測された細胞分裂部位決定因子 MinD と機能未知蛋白質 PH0642 の立体構造解析について述べてい

る。

前者は細胞分裂時において複製された染色体が正確に娘細胞に分配されるための機構に関与している。原核生物の細胞分裂では正確に細胞の中央における細胞分裂を行うためには分裂部位の決定機構が必要になる。細胞は FtsZ 蛋白質が重合して形成される Z 環により締め付けられ、分裂する。この Z 環の形成部位は細胞の両極付近でも起こり得るため Z 環が細胞中央で形成されるように位置決めを行う必要がある。MinD はこの機構において細胞膜内側に局在し、Z 環の形成を阻害する活性を有しているが自身の有する ATP 加水分解活性によって細胞の極から極へ周期的に振動することにより MinD の濃度分布が生じ、細胞中央のみで Z 環形成を許容する。この周期振動において MinD は ATP を加水分解するエネルギーを用いて細胞内を移動することができるモーター蛋白質と考えられていた。大腸菌ホモログである *P. horikoshii* の MinD の立体構造はモーター蛋白質であるキネシンと類似しており、ATP 加水分解に関与する構造モチーフも類似していた。さらに ATP 加水分解活性もモーター蛋白質型であり、これらの結果から MinD が細胞内でモーター蛋白質として機能しているという機能予測を裏付ける結果が得られた。

機能未知蛋白質 PH0642 は配列比較により nitrilase superfamily に帰属される。しかし nitrilase superfamily 内における真の酵素反応は明らかになっていない。PH0642 の立体構造は 1.6Å 分解能で解析された。立体構造は nitrilase superfamily に属するカルバミラーゼなどと類似していたが活性部位近傍の残基が異なっており、基質認識に違いが生じることが示唆された。実際 PH0642 はカルバミラーゼ活性を有していなかった。そこで活性部位のポケット内部の表面形状と静電的な環境の考察を行った。このポケットは入り口が疎水性残基の相互作用により狭くなっており、嵩高い基質の侵入を防いでいる。また、ポケットの内部は負電荷を帯びており、正電荷を有した基質の侵入を助長していると考えられた。また、ポケット最奥部は正電荷を帯び、これにより基質を押しとどめていると推察された。また、nitrilase superfamily では保存されているシステイン残基を介して、基質とアシル化酵素を形成するといわれている。PH0642 はこのシステイン残基を有しており、上述した条件を満たした基質を認識し、アシル化酵素状態を経た反応を触媒するものと示唆された。機能未知蛋白質の立体構造から蛋白質機能を解析する手法は未だ確立しておらず、以上の方法は活性部位形状からの基質推定に関する基礎的な研究である。

ここにあげた構造ゲノム科学研究における解析例ではゲノム塩基配列情報を蛋白質立体構造へと翻訳することで蛋白質機能解析への道筋がより明確なものになることが示されている。一次配列から機能予測された蛋白質の立体構造を明らかにすることでこれらの分子の機能するメカニズムについてより正確に推定することが可能になることが明らかになった。また、機能未知蛋白質の機能予測が蛋白質立体構造をもとに行うことで反応機構の予測、基質の予測の確度が向上することが期待される。解析には開発中のハイスループット技術が用いられており、実際にある種の蛋白質立体構造を短期間のうちに解析することが可能であることも示している。蛋白質立体構造解析のハイスループット化を含んだ構造ゲノム科学プロジェクトは創薬、有用酵素作成などの産業面にも多大な影響を及ぼすものだろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 勲

副 査 教 授 新 田 勝 利

副 査 助 教 授 渡 邊 信 久

学 位 論 文 題 名

A pilot study of the structural genomics of *Pyrococcus horikoshii*

(*Pyrococcus horikoshii* 構造ゲノム科学の先導的研究)

ゲノム解析プロジェクトの進展により、さまざまな生物のゲノム塩基配列が利用できるようになっている。今後は、ゲノム塩基配列情報を生物学、医学、農学等にいかにより利用するかが問われる。ゲノム DNA の配列情報は機能分子である蛋白質に翻訳され、さらに、発現蛋白質は取り巻く環境に応じて固有の機能を発現する。これらの機能は蛋白質の立体構造と深い関わりを有する。したがって遺伝子の機能を真に理解するためには、遺伝子産物である蛋白質の立体構造解析が不可欠である。

多種の蛋白質を短期間に構造解析することを目的とした構造ゲノム科学プロジェクトが国際的な規模で推進されている。本研究では、そのプロジェクトの中核技術である蛋白質立体構造解析のハイスループット化を実現するために、発現系の構築から構造解析までのシステム化を行い、また実際に、超高度好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* のゲノムからターゲット蛋白質を選択し、ハイスループットな構造解析を実現したものである。ターゲットとして選択した蛋白質は、配列比較により機能が予測される蛋白質約 100 種と、生物種間で広く保存されている 84 種の機能未知蛋白質（非膜蛋白質）である。研究の結果、35 種の蛋白質結晶が得られ、その内 13 種が構造解析された。論文では、ホモログ蛋白質から機能予測が可能であった細胞分裂部位決定因子 MinD、および、機能未知蛋白質 PH0642 の立体構造解析について述べている。

細胞分裂部位決定因子 MinD は細胞分裂時において複製された染色体が正確に娘細胞に分配されるための機構に関与している。原核生物の細胞分裂では正確に細胞の中央における細胞分裂を行うためには分裂部位の決定機構が必要になる。細胞は FtsZ 蛋白質が重合して形成される Z 環により締め付けられ、分裂する。この Z 環の形成部位は細胞の両極付近でも起こり得るため Z 環が細胞中央で形成されるように位置決めを行う必要がある。MinD はこの機構において細胞膜内側に局在し、Z 環の形成を阻害する活性を有しているが、自身の有する ATP

加水分解活性によって細胞の極から極へ周期的に振動することにより細胞内で濃度分布を生じさせ、細胞中央のみで Z 環形成を許容する。この周期振動において MinD は ATP を加水分解するエネルギーを用いて細胞内を移動することができるモーター蛋白質と考えられていた。本研究では、大腸菌 MinD のホモログ蛋白質である *P. horikoshii* 由来 MinD の立体構造解析を行い、この蛋白質の立体構造が、モーター蛋白質であるキネシンと類似しており、ATP 加水分解に関与する構造モチーフも類似していること、さらに ATP 加水分解活性もモーター蛋白質型であることを示した。これらの結果から MinD が細胞内でモーター蛋白質として機能しているという機能予測を裏付ける結果が得られた。

機能未知蛋白質 PH0642 は配列比較により nitrilase superfamily に帰属される。しかし nitrilase superfamily 内における真の酵素反応は明らかになっていない。PH0642 の立体構造は 1.6Å 分解能で解析された。立体構造は nitrilase superfamily に属するカルバミラーゼなどと類似していたが活性部位近傍の残基が異なっており、基質認識に違いが生じることが示唆された。実際 PH0642 はカルバミラーゼ活性を有していなかった。そこで活性部位のポケット内部の表面形状と静電的な環境の考察を行った。このポケットは入り口が疎水性残基の相互作用により狭くなっており、嵩高い基質の侵入を防いでいる。また、ポケットの内部は負電荷を帯びており、正電荷を有した基質の侵入を助長していると考えられた。また、ポケット最奥部は正電荷を帯び、これにより基質を押しとどめていると推察された。また、nitrilase superfamily では保存されているシステイン残基を介して、基質とアシル化酵素を形成するといわれている。PH0642 はこのシステイン残基を有しており、上述した条件を満たした基質を認識し、アシル化酵素状態を経た反応を触媒するものと示唆された。

この2つの解析例では、ゲノム塩基配列情報を蛋白質立体構造へと翻訳することで蛋白質機能解析への道筋がより明確なものになることが示されている。一次配列から機能予測された蛋白質の立体構造を明らかにすることで、分子の機能するメカニズムをより正確に推定することが可能になることが明らかになった。また、機能未知蛋白質の機能予測の確度が、蛋白質立体構造をもとに行うことで、向上することが示された。解析には開発中のハイスループット技術が用いられており、実際にある種の蛋白質立体構造を短期間のうちに解析することが可能であることも示されている。

以上、本論文は、これまでにない広範な蛋白質を研究ターゲットとする構造ゲノム科学の可能性を示したものであり、本研究が生物科学に及ぼす貢献には多大なものがあると考えられ、よって審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を得る十分な資格があるものと認めた。