

細胞全体の基本的生命現象を、化学的に理解できる時代の到来



随 筆

倉 光 成 紀*

Whole-Cell Research - Systematic Analyses of Basic Biological Phenomena -

Key Words : whole-cell research, discovery of protein (gene) function,
prediction of phenomena

1. はじめに

21世紀になる前後から、ヒトを含めた多くの生物のゲノム解析がなされたことによって、各生物の全体像を考えながら研究することが可能になった^{1,2)}。生命科学関連の情報も、飛躍的に増大しつつある。その一端を学ぶ高校生も、学校で使用する教科書の合計が500頁を超えるらしい。また、大学の生命科学を扱った参考図書も、1,000頁を超えるものが少なくない。そして、さらに頁数が増加する傾向にある。

生命科学研究の現状は、発見できることが非常に多いので、研究はとても楽しい。しかし、各生物の全体像を勉強して理解しようとしても、情報が歯抜けだらけなので、とても難しいのが現状である。

そのような生命科学の現状に対して、例えば物理学の熱力学では3つの法則、電磁気学ではMaxwellの4つの式を理解すれば、一生の間、広く利用できる知識を身につけることが可能である。「生命科学にも、ヒトを含めた各生物全体の生命現象（環境適応）が、化学的に理解できるような学問大系構築のきっかけを作りたい」と思い、「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト — 基本的生命現象の系統的解析 —」へ向けたボランティア的研究を始めた^{1,2)}。

2. まずは、生物間に共通で基本的生命現象に関与する遺伝子（タンパク質）の収集

「多くの生物に共通で、基本的生命現象に関与する遺伝子（タンパク質）」を、どのように収集すれば良いか。この難題は、自然が進化の過程ですでに解決してくれていた。ゲノム情報を整理してみると、約1,500個の遺伝子（タンパク質）があれば、生物は環境中の栄養源を摂取して生きることができる（1,500個よりも遺伝子数が少ないと、共生や、ウイルスのように寄生をすることになる）。しかも、それら1,500個の遺伝子は、生物間で共通性が高い。

ならば、遺伝子数が1,500個に近い生物を、モデル生物として選ぶのが得策である。さらに、タンパク質分子の機能を解析するためには安定性の高い方が有利である。1990年当時は、遺伝子操作が可能な高度好熱菌は *Thermus thermophilus* のみであったので、*T. thermophilus* HB8株をモデル生物として選んだ^{1,2)}。

3. 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト

— 基本的生命現象の系統的解析 — の道筋

研究の最終目標に到達するまでに、研究は以下の4段階で並行して進行すると考えられる（図1）²⁾。

第1段階：タンパク質その他生体分子のゲノムワイドな立体構造解析。

第2段階：タンパク質その他生体分子のゲノムワイドな機能解析。

（機能未知遺伝子（タンパク質）の機能推定を含む。）

第3段階：細胞内各システムの各論的個別解析。

（機能未知遺伝子（タンパク質）の機能発見を含む。）

第4段階：予測可能なレベルのシミュレーション（システム生物学）。



* Seiki KURAMITSU

1949年9月生
大阪大学理学研究科 生物科学専攻 博士課程修了（1977年）
現在、大阪大学 理学研究科 生物科学専攻 大阪大学名誉教授 理学博士
生物化学・生物物理学・分子生物学
TEL : 090-1023-2278
E-mail : kuramitsu@bio.sci.osaka-u.ac.jp



図1. 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト²⁾
4段階の研究ステップは、並行して進む。

これらの基本的コンセプトは、以前^{1,2)}と変わっていないが、第1段階のタンパク質分子の立体構造解析は、飛躍的な進展を遂げた。

4 - 1. 第1段階：飛躍的發展を遂げた「細胞全体のタンパク質の立体構造情報」

Protein Data Bank (PDB) に、現時点のタンパク質の立体構造情報が10万件以上登録されている。

さらに、それらの情報を利用して、タンパク質主鎖の立体構造をドメイン単位で予測する方法が改良され、その成功率が7割以上になった。

さらに、ごく最近になって、原子分解能のクライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) が出現した。2014年以降は3 Åよりも高分解能で決定された構造がPDBに登録されるようになり、その数も飛躍的に増加しつつある (このCryo-EMは、2017年のノーベル化学賞になった)。

電子顕微鏡による観察なので、X線結晶解析のようにタンパク質を結晶化させる必要がない。高分解能のCryo-EMは、さらなる発展を遂げつつあり、高度好熱菌のような微生物なら細胞全体が観察できる。その電子顕微鏡画像に、これまでにわかったタンパク質分子の立体構造を「ジグソーパズル」のようにあてはめることで、タンパク質の存在場所を同定する試みも行なわれ始めている。

原子分解能のCryo-EMの出現によって、今後、立体構造情報を活用しつつ生命現象を研究する標準

的手順は、以下のようになるのではないだろうか³⁾。

- ・第1段階として、分子の形をCryo-EMで解析する。もし、分子の動的情報も必要なら、原子間力顕微鏡 (AFM) で観察しておく。

- ・第2段階は、これまでの生化学的および生物物理学的な解析方法の長所を駆使しつつ、分子機能解析を進める。

- ・第3段階として、2 Åよりも高い分解能が必要な場合には、X線結晶解析を行なう。また、各原子の動的情報が必要な場合には、NMRを利用する。

いずれにしても、「解析の最初は、Cryo-EMで分子構造の情報を取得」が、今後の標準になるであろう。

モデル生物としている *T. thermophilus* HB8 の場合、実験的に立体構造が解析できたのは細胞中の全タンパク質の25%だが、上記の予測成功率を考慮すると、約8割近いタンパク質の立体構造情報が何らかの形で得られる時代になった。この状況は、いずれの生物でもほぼ同様である。

4 - 2. 第2段階：細胞全体のタンパク質の分子機能情報 (課題：機能未知タンパク質)

第2段階の「細胞全体でのタンパク質の機能解析」は、DNAやRNAの塩基配列決定法や質量分析法の改良に伴って大きく進展したが、まだ多くの改良を必要としている。

この第2段階を進める際に、もっとも大きな課題は、機能未知のタンパク質 (遺伝子) が約1/3も残されていることである⁴⁾。それが障害となって、細胞全体を理解するにはほど遠い状況が、依然として続いている。

生物間で共通性が高い約100種の機能未知タンパク質についてですら、機能発見研究は、ほとんど手付かずの状態が続いている。それには、現代のプロジェクト研究になりにくい2つの理由があるように思われる。(1) 機能発見の「成果が得られるまでの期間」が予想できない。(2) あまりに重要なタンパク質なので、遺伝子が欠損するとこの世に生まれて来ることが難しくなる。そのため、医療の対象となる患者さんがほとんど存在せず、「役に立たない研究」と思われているのかも知れない。(機能未知タンパク質に関する研究テーマは、意外にも、高校生

の自主研究に役立つことがわかった。)

そこで、利用可能な方法を組み合わせて²⁾、機能未知のタンパク質（遺伝子）の機能を推定することにした（第2段階）。そして、推定が可能になったタンパク質については、実際に発現・精製を行い、その分子機能を解析した（第3段階）。

機能推定には、立体構造解析情報をもっとも役立ったが²⁾、それと並行して、各遺伝子の破壊株を作製し、mRNAの発現（トランスクリプトミックス）、タンパク質の発現（プロテオミックス）、分子間相互作用（インターラクトミックス）、代謝物質の増減（メタボロミックス）、表現型（フェノミックス）などの解析法を利用した。

最終段階（第4段階）では細胞全体の理解を目指す、その前段階として、いくつかのサブシステムを選択し、関連する機能未知タンパク質の機能発見を行なうとともに、第3段階の「各論的な分子機能解析」に着手することにした。手がけたサブシステムは、DNA修復系サブシステム⁵⁾、mRNAの分解系サブシステム⁶⁾、タンパク質の翻訳後修飾のリン酸化系サブシステム⁷⁾、アシル化系サブシステム⁸⁾などである。

たとえば、mRNAの分解系サブシステムの例を図2⁶⁾に示す。これまで多くの研究は、mRNAの合成に注目してきたが、分解系との関係はあまり考えられていなかった。それは、解析方法の難しさに一因がある。というのは、mRNAの分解系サブシステムを理解しようとする、まず、(1) mRNAを分解する酵素を、既知のタンパク質の他に機能未知タンパク質の中から探し出すことも必要になる。次に、(2) それぞれのRNA分解酵素を単離精製して、(3) 各酵素の基質特異性を、様々な基質を準備した上で解析する必要がある。その際に、触媒基を含めた酵素反応機構を調べておくと、なぜ、細胞中に10種類近いRNA分解酵素が存在する必要があるのか、さらに、なぜヒトにRNA分解酵素が多数存在するのか、などの理解も深まるであろう。その段階を経て、(4) 図2の例のような「環境によって各RNA分解酵素の役割が異なる理由」が説明できるようになれば、ようやくRNA分解系サブシステムが理解で

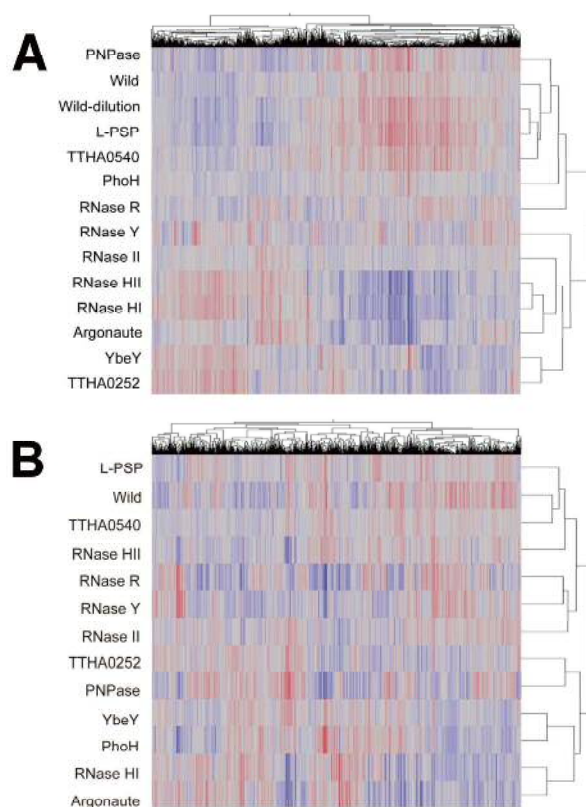


図2. RNA分解酵素およびその関連酵素の遺伝子破壊によるmRNA発現量の増減⁶⁾

対数増殖期(A)と静止期(B)において、遺伝子破壊株のmRNAが野生株よりも増加した遺伝子を赤線、減少した遺伝子を青線で表した。

きたことになり、新たな実験条件での結果が予測できるようになる(かも?)。そうなれば、第4段階の「予測可能なシミュレーション」に挑戦可能な、サブシステムが完成したことになる。

しかし、当然のこととして、その分解系はRNA合成系サブシステムとも情報交換をしているであろう。そうなると、サブシステム間の研究へと展開して行くことになる。

そのように考えると、RNA分解系サブシステムの理解だけでも、一つの細胞全体の調節機構を理解するまでには、長時間を要する。しかし、細胞は進化の過程で、その複雑な仕事を成し遂げるようにでき上がっている。

4-3. 第3段階：各論的な分子機能解析

機能推定ができれば、個別的研究で分子機能解析の糸口が得られる。そして、「機能発見の判断基準」は、酵素分子の場合、「定常状態の k_{cat}/K_m が 10^{5-8}

M⁻¹s⁻¹程度を超える基質が明らかになった時」としている。

各論的研究からは、思いがけない現象や、利用価値のあるタンパク質に、数多く遭遇する。

耐熱性酵素群の利用例

モデル生物の高度好熱菌 *T. thermophilus* は、遺伝子増幅のPCR用酵素として、最初に利用された好熱菌である。

DNA修復系サブシステムの中で、ミスマッチDNAを認識するMutSタンパク質を単離精製して、遺伝子増幅のPCR用溶液に添加してみると、増幅遺伝子の正確性が格段に向上した(図3)^{9,10}。

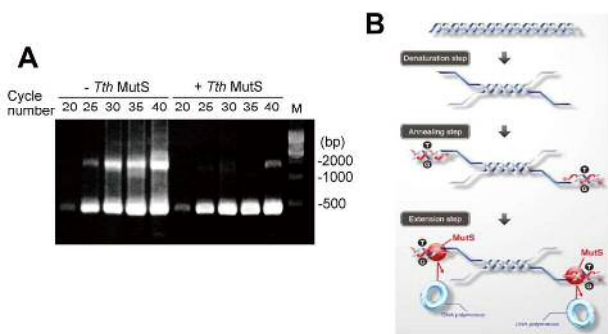


図3. ミスマッチDNAに結合するDNA修復系酵素(MutS)の添加によって、遺伝子増幅(PCR)の正確性が飛躍的に改善⁹⁾

MutSタンパク質はミスマッチDNA修復系酵素の一つであり、DNA修復反応の初段階において、二本鎖DNAのミスマッチ部分を認識する働きをすることが知られている。DNA増幅のためのプライマーDNAが、非特異的にDNAに結合すると、その部分にミスマッチDNA部分が生じるため、MutSタンパク質が結合し、DNAポリメラーゼの結合を阻害して(B)、非特異的なDNA増幅を激減させた(A, 右側)。

MutSタンパク質が存在する「ミスマッチDNA修復系」は、数個のタンパク質群で構成されているが、その反応過程の初発タンパク質MutSを添加しただけでも大きな効果があった。それなら、ミスマッチDNA修復系全体を再構成すれば、ミスマッチDNA修復の正確度が細胞内と同レベルにまで高めることが出来るかもしれない。さらに、DNAにはミスマッチ修復系以外に様々な修復系が存在するので⁵⁾、それらも試験管内で共存させれば、さらにPCRの正確度が高まる可能性がある。

不思議な機能の酵素例

例えばdNTPaseと名付けた酵素の場合、dNTP(N=G, A, T, C)が共存すると分解活性があるが、1種類の基質のみでは活性が存在しない不思議な酵素は^{3,11)}、ヒトにも存在する。

ヒトの細胞にウイルスが感染すると、dNTPaseが細胞中のdNTPを分解して枯渇させる。そうすると、細胞自身もDNA合成ができなくて困るはずだが、それよりも感染したウイルスをもっと困らせて、細胞自身を守っているらしい。このように、かつて機能未知であったタンパク質の機能が少しわかってきたが、基質に対する新奇な酵素反応機構は、いまだに全く分かっていない。

また、DNA修復系などで働き、不要なDNAやRNAを端から分解するRecJに似た酵素は、基質の長さが変わっても親和性(定常状態反応の K_m)は変化しないが、律速段階の反応速度(k_{cat})は、短くなるにしたがって増大した¹²⁾。この不思議な機能を示す酵素の反応メカニズムも、未だに全く理解できていない。

これらの酵素の反応メカニズムが解明できれば、人工酵素作製のための新たな方法が明らかになる。

なお、タンパク質の機能解析の一助になればと思いい、*T. thermophilus* HB8のタンパク質発現プラスミドや、遺伝子破壊株作製のプラスミドなどは、バイオリソースセンターから自由に入手可能な体制にしている。さらに、タンパク質発現・精製の情報なども公開されている(http://dna.brc.riken.jp/en/thermus_texten、ならびに、問い合わせ先は kuramitu@bio.sci.osaka-u.ac.jp)。

4-4. 第4段階：予測可能なレベルのシミュレーション

第4段階では、第3段階までの膨大な情報を統合し、細胞全体を原子レベルで理解するために、予測可能なシミュレーションを目指すことになる。たとえばタンパク質群が十種類から構成される場合ですら、実験的な証明は容易でない。しかし自然は、細胞全体で、再現性よく環境適応を成し遂げているので、そこには必然性があるはずである。

多細胞生物のヒトなどの場合には、さらに、組織

レベル、個体レベルでの理解が必要となるが、細胞レベルの学問基盤が確立すれば、ヒトの病気の治療や予防などにも様変わりすることが期待される。

5. おわりに

原子分解能の Cryo-EM の出現によって、生命科学は大きく変わりつつある。今後は、生体分子の構造をもとにして、生命現象を「化学的」に理解する能力がとて重要になってくる。さらに、生命科学の測定方法は、「物理学」に頼ることが多い。そのため、今後の生命科学研究者には、少なくとも「物理学や化学の研究者と共同研究をすることができる程度の基礎的な知識」が不可欠になる。

しかし、現状の生命科学は、「基本的な機能未知蛋白質（遺伝子）が、まだ 100 以上残されている発展途上の段階」なので、複雑な生命現象を素直に観察して、その本質を「直感で補いつつ理解するセンス」も不可欠である。

大学や中学・高校の教育プログラムも、そのような状況に即応していく必要がある³⁾。

参考文献

- 1) 倉光 (1998) 「『高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクトー 基本的生命現象の系統的解析ー』へ向けてのボランティア」生産と技術 **50**, 84-86
- 2) 倉光 (2009) 「『高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト』に必要な技術開発」生産と技術 **61**, 17-26
- 3) 倉光 (2017) 「生化学は、大きな変革期に！」生化学 **89**, 485-485
クライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) の特集が、例えば *Acta Cryst.* **D73**, 467-548 (2017); *J. Struct. Biol.* **197**, 71-198 (2017); *Prot. Sci.* **26**, 5-145 (2017) などに掲載されている。
- 4) 倉光 (2008) 「多数の基本的生命現象発見のチャンス到来！」生化学 **80**, 1075-1075
- 5) Morita *et al.* (2010) “Molecular Mechanism of the Whole DNA Repair System: A Comparison of Bacterial and Eukaryotic Systems”, *J. Nucl. Acids* **2010**, ID 179594
- 6) Ohyama *et al.* (2014) “The Role of Ribonucleases in Regulating Global mRNA Levels in the Model Organism, *T. thermophilus* HB8”, *BMC Genomics* **15**, 386
- 7) Takahata *et al.* (2012) “Close Proximity of Phosphorylation Sites to Ligand in the Phosphoproteome of the Extreme Thermophile, *T. thermophilus* HB8”, *Proteomics* **12**, 1414-1430
- 8) Okanishi *et al.* (2013) “Acetylome with Structural Mapping Reveals the Significance of Lysine Acetylation in *T. thermophilus*”, *J. Proteome Res.* **12**, 3952-3968 ; その他関連論文は Okanishi *et al.* (2014) *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 2382-2398 ; Okanishi *et al.* (2017) *Extremophiles* **21**, 283-296 ; Okanishi *et al.* (2017) *Biochim. Biophys. Acta* **1865**, 232-242 ; Kim, K. *et al.* (2012) *Proteomics* **12**, 3063-3068
- 9) Fukui *et al.* (2013) “Thermostable Mismatch-Recognizing Protein MutS Suppresses Nonspecific Amplification during PCR”, *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 6436-6453
- 10) Fukui and Kuramitsu (2013) “Simultaneous Use of MutS and RecA for Suppression of Nonspecific Amplification during PCR”, *J. Nucleic Acids* **2013**, ID 823730
- 11) Kondo *et al.* (2004) “Biochemical Characterization of TT1383 from *T. thermophilus* Identifies a Novel dNTP Triphosphohydrolase Activity Stimulated by ATP and dTTP”, *J. Biochem.* **136**, 221-231
- 12) Wakamatsu *et al.* (2011) “Role of RecJ-Like Protein with 5'-3' Exonuclease Activity in Oligo(deoxy) Nucleotide Degradation”, *J. Biol. Chem.* **286**, 2807-2816
- 13) 倉光成紀他 「生命科学の基礎と生物共通の法則ータンパク質の基本と解明されていない課題ー」(2018、出版予定)