

## 真正細菌祖先酵素および古細菌祖先酵素の復元とその性質

## Reconstruction and characterization of enzyme of Bacterial ancestor and Archaeal ancestor

# 木村 光夫 [1]; 横堀 伸一 [2]; 浦辺 徹郎 [3]; 山岸 明彦 [2]

# Mitsuo Kimura[1]; Shin-ichi Yokobori[2]; Tetsuro Urabe[3]; Akihiko Yamagishi[2]

[1] 東大・理・地惑; [2] 東薬大・生命; [3] 東大・理 地球惑星科学

[1] Earth and Planetary Science, Tokyo Univ; [2] Dep. Mol. Biol., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.; [3] Earth and Planetary Science, Univ. of Tokyo,

16S/18S rRNA を基に作成した進化系統樹をみると、根元付近には至適生育温度が非常に高い生物が多く存在していることが分かる。このことより、『全生物の共通の祖先(コモノート)は好熱性の生物だったのではないか?』という仮説が提唱されている。この仮説を実験的に検証するため、本研究室ではこれまでにロイシン生合成系の酵素イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(IPMDH)、TCA 回路の酵素で IPMDH と起源が同じと考えられているイソクエン酸脱水素酵素(ICDH)、タンパク質翻訳系の酵素グリシル tRNA 合成酵素(GlyRS)の3種のタンパク質について、進化系統樹から祖先型アミノ酸残基を推定し、祖先型化変異酵素を作製し、その熱安定性を調べてきた。その結果、祖先型化変異酵素の耐熱性は野生型より上昇する傾向があり、仮説を支持する結果となった。しかし、これらの実験は数残基を既存の酵素に導入するものであった。そこで本研究では、代謝系酵素であるヌクレオシド2リン酸キナーゼ(NDK)をモデル酵素として、既存の酵素を祖先型に近付けた変異酵素を作るのではなく、共通の祖先が持っていたであろう全配列を推定・再現し、その性質を調べることで仮説の検証を行った。

今回我々は、系統樹を基にして真正細菌祖先型及び古細菌祖先型 NDK のアミノ酸配列を推定し、PCR によって祖先型遺伝子を全合成した。それらの遺伝子を大腸菌内で発現させ、祖先型 NDK の精製を行った。その後、円二色性(CD)を用いて祖先型 NDK の熱安定性を測定した。また、既存の生物である高度好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* 由来の NDK と超好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来の NDK をクローニング・精製後、耐熱性を測定し、祖先型 NDK の耐熱性と比較した。その結果、真正細菌祖先型 NDK では *Thermus thermophilus* 由来の NDK と同程度の熱安定性を示し、古細菌祖先型 NDK は *Sulfolobus tokodaii* 由来の NDK よりも高い耐熱性を示した。

今回の結果より、真正細菌の祖先は高度好熱菌以上の温度で生育する生物であった可能性が高く、古細菌の祖先は超好熱性の生物であった可能性が高い、ということが示唆された。