

機能未知タンパク質の機能発見に向けて：  
Omics 解析を併用した新しい酵素機能の発見

増井良治<sup>1,2</sup>, 大賀拓史<sup>1,3</sup>

Ryoji Masui<sup>1,2</sup>, Takushi Ooga<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>阪大院理・生物, <sup>2</sup>理研・播磨研, <sup>3</sup>ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ (株))

(<sup>1</sup>Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup>RIKEN SPring-8 Center, <sup>3</sup>HMT)

e-mail: rmasui@bio.sci.osaka-u.ac.jp

新しい酵素機能の探索は、細胞システムを理解する上で重要な課題の1つである。機能未知に分類されるタンパク質およびそのドメインの中には、機能既知の酵素との類似性に基づいて、その機能が推定されているものが多い。しかし、生理学的に真の基質を同定することは未だ非常に難しい問題であり、実験的な検証が不可欠である。さらに、特定の条件下でのみ発現するような酵素およびそれが働く経路を見つけることはより困難である。本発表では *Thermus thermophilus* HB8 の Nudix ファミリータンパク質を例に、各種 omics 解析を含めた統合的なアプローチの試みを紹介する。

Nudix ファミリーとは Nudix モチーフと呼ばれる保存配列をもつ大きなタンパク質ファミリーであり、バクテリア、アーキアからヒトまで広く存在している。多くの生物種が複数の Nudix タンパク質遺伝子を持つ (例: ヒトでは 18 個) ことから、それらの機能が細胞にとって重要なことが示唆される。Nudix タンパク質は、主にヌクレオシド二リン酸誘導体を基質とした pyrophosphatase 活性を示す。例えば、*E. coli* の MutT は 8-oxo-dGTP を特異的に分解することによって DNA の酸化傷害を未然に防ぐことが知られている。このことから、他の Nudix タンパク質も細胞毒性を示すヌクレオチドやその類似物を分解することで、house-cleaning enzyme として働くと考えられるようになった。また、*in vitro* で ADP-ribose や diadenosine polyphosphateなどを分解するものについては、各種の代謝中間体やシグナル分子を分解する働きをもつとも推定されてきた。しかし、実際に *in vivo* での本来の基質が何であるかが示された Nudix タンパク質はほとんど存在せず、それらの細胞機能は依然として未知なままである。我々は、Nudix タンパク質群が新奇な生体防御システムを担っている可能性があると考え、*T. thermophilus* HB8 を用いて Nudix タンパク質の研究を行っている (表 1)。

表 1 *T. thermophilus* HB8 の Nudix タンパク質

	Ndx1	Ndx2	Ndx3	Ndx4	Ndx5	Ndx6	Ndx7	Ndx8
Amino acids	126 aa	182 aa	141 aa	170 aa	115 aa	155 aa	138 aa	155 aa
Expression plasmid	●	●	●	●	●	●	●	●
Overproduction	●	●	●	●	●	●	●	●
Purification	●	●	●	●	▲	▲	●	●
Substrate identification	●	●	●	●			▲	●
Crystallization	●	●	●	●			●	
3D structure	●	●	●	●				
Functional analysis	▲	▲	▲	▲				▲
Physiological analysis			▲					▲

● finished ▲ in progress

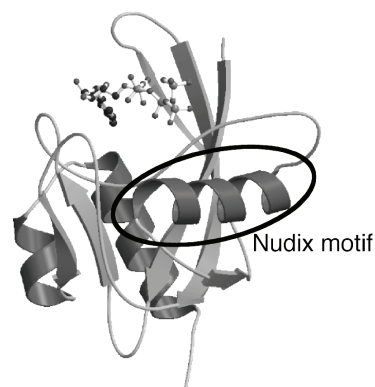


図 1 Ndx1 の立体構造

*T. thermophilus* HB8 には 8 つの Nudix タンパク質 (Ndx1~Ndx8) が存在する。これまでに、それらを発現・精製し、生化学的解析や立体構造解析により酵素機能の解明を進めてきた。例えば、Ndx1 (TTHA1880) と Ndx3 (TTHA0135) は Ap<sub>4</sub>A などの diadenosine polyphosphate を特異的に分解する (図 1) (1)。一方、Ndx2 (TTHA0863) と Ndx4 (TTHA0528) は ADP-ribose や FAD のような NDP-sugar を基質とする (2, 3)。これらについては基質特異性や触媒機構の詳細も明らかにしたが、その一方で生理的な機能の解析はあまり進んでいない。Ndx8 (TTHA1939) についても、*in vitro* での活性測定は行ったものの、従来の方法だけではその基質分子と生物学的機能の同定は困難と予想された。そこで遺伝学のおよび生化学的解析とゲノムワイドな omics 解析を併用することにより、その機能解明を試みた (4)。

まず *ndx8* 遺伝子破壊株の増殖の様子を調べたところ、低栄養条件下で増殖の一時的な停滞を示し、停滞時の細胞形態は定常期のものに似ていた。トランスクリプトーム解析の結果からは、低栄養条件下で細胞増殖を抑制する遺伝子発現の制御が起こることが示唆された。次に、細胞内の小分子を網羅的に解析するメタボローム解析を行って基質候補を検索したところ、破壊株の細胞中に guanosine-3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) が蓄積することを発見した。また、精製した Ndx8 が *in vitro* で ppGpp を分解することも確認した。ppGpp はアミノ酸の飢餓状態に対応した転写制御の変化 (緊縮応答; stringent response) を引き起こすシグナル分子だが (図 2)、近年の研究では細菌の増殖期の推移にも関わることが明らかにされつつある。そこで、ppGpp 合成を担う TTHA1717 (RelA/SpoT ホモログ) との二重遺伝子破壊株を作製したところ、*ndx8* 単独破壊株で見られた増殖の停滞は観察されなかった。以上の結果から、Ndx8 は ppGpp に対する加水分解活性を持ち、細胞内で栄養環境を感じ取るセンサーの一部として働いていると推定された (図 3)。今回のような omics 解析と各論的解析を組み合わせがアプローチは、他の機能未知タンパク質の機能解明にも役立つものと思われる。

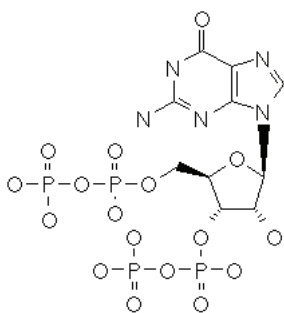


図 2 ppGpp の構造

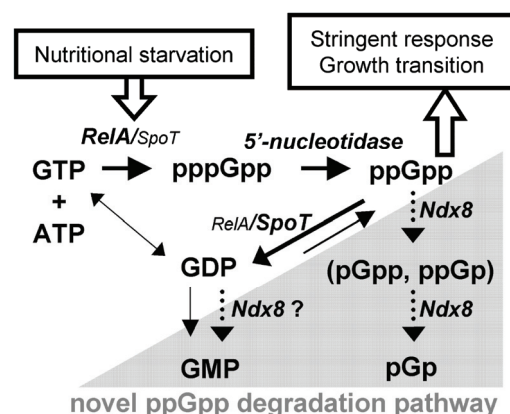


図 3 *T. thermophilus* における ppGpp 代謝経路

- (1) Iwai, T., et al. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**(21), 21732-21739.
- (2) Ooga, T., et al. (2005) *Biochemistry*, **44**(26), 9320-9329.
- (3) Wakamatsu, T., et al. (2008) *J. Bacteriol.*, **190**(3), 1108-1117.
- (4) Ooga, T., et al. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**(3), 15549-15556.