

Thermus thermophilus HB8 のシステム生物学へ向けて

Toward Whole-Cell Biology of a Model Organism, *Thermus thermophilus* HB8

理研 放射光科学総合研究センター 放射光システム生物学研究グループ

SR System Biology Research Group

RIKEN SPring-8 Center, RIKEN Harima Institute

Home Page: <http://www.thermus.org>

e-mail: struct7@spring8.or.jp

「はじめに」で述べた第1段階の「ゲノムワイドなタンパク質の立体構造解析」や、第2段階の「ゲノムワイドな分子機能解析」を利用しつつ、第3段階の「分子の立体構造にもとづいたシステム生物学的解析」を目指した研究を進めている。機能未知タンパク質が関与するシステムについては、機能発見研究も並行して進めている。

<ゲノムワイドなタンパク質の立体構造解析（構造ゲノム科学）>

本高度好熱菌のゲノムサイズは 2.1 Mbp で、約 2,200 個の ORF が存在する。

これらタンパク質を量産化するために、各タンパク質の ORF を発現プラスミド pET-11a (Novagen 社) に組み込み、現在までに約 2,060 個の発現プラスミド構築を完了した。タンパク質の量産化には大腸菌 BL21(DE3) 株などを用い、現在までにその内の 70% のタンパク質について量産化に成功し、約 940 個のタンパク質精製が完了している。精製タンパク質の結晶化には各種ロボットなどを用いているが、精製されたタンパク質の結晶化成功率は 72% であった。

	Proteins
(1) Plasmids for overexpression	2059
(2) Overproduction in <i>E. coli</i>	1450
(3) Purification	944
(4) Crystallization	682
(5) Data collection	460
(6) 3D structure	360

360 + (106) = 466

回折データ測定に際しては、凍結保存した結晶を実験室系のロボット回折計で予めチェックしておき、選別された結晶のみをビームラインで測定することで、X線結晶回折データを効率良く収集することができた。さらに最近では、20 μm 程度の微小結晶でも、ビームラインでのX線回折データ収集が可能になった。

その結果、現時点までに約 360 種類のタンパク質の立体構造解析が完了している。プロジェクトとは独立に決定された構造解析数 106 個を加えると、460 個を超える。これは、全 ORF の約 21% に相当し、立体構造解析済タンパク質の割合が最も多い生物種になりつつある。(タンパク質発現プラスミド (http://www.brc.riken.jp/lab/dna/en/thermus_en.html) や、様々なデータは、順次公開の予定。)

さまざまな工夫をしつつ立体構造解析を継続しているが、現在の立体構造解析の技術レベルでは 25-30% の成功率が限界に近いと考えられる。しかし、(1) 最近我々も試みている膜タンパク質の調製技術、(2) タンパク質の結晶化技術、(3) マイクロビームラインによる微小結晶の X 線回折データ収集の技術 (さらに将来は、FEL を利用した一分子の立体構造解

析技術)などの諸技術が向上すれば、立体構造解析の成功率が上昇すると期待される。本高度好熱菌のタンパク質は安定性が高く、結晶化の成功率も高いので、それら諸技術の開発時にも、本高度好熱菌のタンパク質の有効活用が期待される。

<ゲノムワイドな分子機能解析(機能ゲノム科学)を利用した機能発見研究>

細胞全体の生命現象を理解するためにシステム生物学的研究を行うためには、全タンパク質の約 1/3 を占める機能未知タンパク質の機能を、予め知っておく必要がある。そのために、これまでにほぼ全てについて立体構造解析を試みたところ、立体構造解析に成功したタンパク質の約 60%は、その構造的特徴から分子機能の推定が可能であり、**立体構造解析は機能推定にとって非常に強力であることがわかった**。しかし、立体構造の成功率は約 20%なので、まだ機能未知のタンパク質が約 9 割残る。

立体構造情報の有無にかかわらず機能未知タンパク質の機能推定には、耐熱性選択マーカー(カナマイシン耐性)を用いた遺伝子破壊株を利用したり、ゲノムワイドな mRNA(トランスクリプトミックス)・タンパク質(プロテオミック)・代謝物質(メタボロミックス)の解析法などを利用している。

これらの **ゲノムワイドな分子機能解析** や **立体構造解析** を利用して **機能発見** に成功した成果を、本研究会で報告する。ゲノム解析時(2004年)に機能未知であったタンパク質のうち、これまでに約 1 割の **分子機能が発見** された。それら機能未知タンパク質の中には、意外な機能をもつ分子が数多く含まれている。

その他、タンパク質が安定なため、分子機能解析法が使いやすいという利点を活かして、高度好熱菌タンパク質の各論的な構造機能解析がグループ内外で行われており、本連携研究会でも、いくつかの成果が発表されている。

<システム生物学を目指して>

複数のタンパク質がシステムを構成して機能している DNA 修復システム、転写翻訳システム、酸化ストレス防御システムなどの研究例を報告する。

発表項目

1. タンパク質調製 **【要旨番号 15~17】**
2. タンパク質結晶化、X線回折データの収集・解析 **【18~20】**
3. 遺伝子破壊株作製、トランスクリプトーム・メタボローム解析 **【21】**
4. 実験情報のデータベースシステム **【22; 23】**
5. 機能未知タンパク質の機能発見、システム生物学的研究 **【24; 25; 41~51; 53~55 など】**

