高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト： 構造ゲノム科学からシステム生物学へ

理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター*1, 大阪大学大学院理学研究科*2,
京都大学大学院理学研究科*3, 理化学研究所横浜研究所ゲノム科学総合研究センター*4,

東京大学大学院理学系研究科*5

海老原章郎*1, 新海暁男*1, 中川紀子*1,*2, 増井良治*1,*2,
三木邦夫*1,*3, 横山茂之*1,*4,*5, 倉光成紀*1,*2,*4

Akio EBIHARA, Akeo SHINKAI, Noriko NAKAGAWA, Ryoji MASUI, Kunio MIKI, Shigeyuki YOKOYAMA and Seiki KURAMITSU: Structural-Biological Whole Cell Project of *Thermus thermophilus* HB8 : From Structural Genomics to Systems Biology

The final goal of this research project is the understanding of all fundamental biological phenomena in terms of physical chemistry. As a model organism for the structural and functional studies, an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB8, is very promising because of the small genome size, the availability of genetic tools for functional analysis, and the thermostability of its proteins (<http://www.thermus.org/>). In this report, we summarize the recent progress of this research project toward the systems biology.

1. はじめに

タンパク質は、遺伝子の塩基配列で定められたアミノ酸が1つ1つ直鎖上につながってできた生体高分子で、細胞内代謝や細胞外情報の感受など幅広い生命現象を担う。アミノ酸が並んだ順序(アミノ酸配列)によりその三次元立体構造が決まり、異なるアミノ酸配列をもつタンパク質はそれぞれ独自の立体構造と機能を有する。立体構造に基づいてタンパク質分子の機能を明らかにすることは、タンパク質が関与するさまざまな生命現象を物理化学的に理解するうえで非常に重要である。

1990年代前半、X線結晶解析をはじめとする構造生物学的解析法が目覚ましい発展を遂げ、タンパク質をはじめとする生体分子の立体構造解析が盛んに行われていた。一方、ヒトを含めた多くの生物に対するゲノム(遺伝子の総和を指し、生命の設計図とも呼ばれる)が解読されつつあり、ポストゲノムシーケンス時代の到来が予感されていた。ゲノムが解読されると、遺伝暗号表に基づいて、生物内に存在し得る膨大なタンパク質のアミノ酸配列が手に入る。アミノ酸配列には立体構造形成の最終的な情報が含まれている。しかし、アミノ酸配列に基づいた立体構造の骨格(主鎖)の予測には、配列類似性の高いタンパク質に対する立体構造が存在することが必須であり、90年代前半にはゲノム全体のタンパク質構造を予測できるほど実

験的に決定された立体構造は多くなく、立体構造を知るには実験的に決定するのが確実であった。そこで、ゲノム全体を対象とした(ゲノムワイドな)研究が、構造生物学的解析法とタンパク質分子機能解析と組み合わせて実現できれば、1つの生物で営まれる生命現象を物理化学レベルで理解できる可能性が広がる。

このような背景に基づき、1995年に新たな研究提案が日本蛋白工学会で行われた¹⁾。あらゆる生物に共通な生命現象を研究するモデル生物の要件として、

- (1) 生命現象を営むのに必須な基本的遺伝子約1500個をもつ
- (2) 分子機能を理解するために不可欠な遺伝子操作系が確立されている
- (3) 立体構造解析や分子機能解析に有利なタンパク質の高い安定性

を挙げ、これらを兼ね備えた生物として高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8を選び、タンパク質をはじめとする生体分子の立体構造を基にして、細胞全体の生命現象を、物理化学的レベルで理解することを目指すものであった。1995年は世界初のゲノム解読が行われた年である。

高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8は、1968年に日本の伊豆半島・峰温泉で、大島泰郎・東京工業大・東京薬科大名誉教授によって発見された好気性真正細菌で、85℃の高温でも生育できる²⁾(図1)。*T. thermophilus* HB8のゲノ

ムサイズは約2 Mbp, 遺伝子数は約2000個と推定され, 最小培地で独立に生育できる生物として必要な遺伝子は一揃いもっていると考えられる。しかも, ほかの生物のゲノムと同様, 機能が解明されていない遺伝子が全体の約1/3を占めると推測され, これら機能未知遺伝子から新しい生命現象の発見が期待できる。

T. thermophilus HB8 をモデル生物とする研究は「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」と名づけられ, 現時点では, その最終目標を達成するまでに, 以下の4段階で進行すると考えている(図2)。

第1段階: ゲノムワイドな立体構造解析

第2段階: ゲノムワイドな機能解析

第3段階: 細胞内システムの分子機能解析

第4段階: システム生物学

このプロジェクトのうち, 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)と機能解析を行う部分は, 1999年から理化学研究所播磨研究所において第1期のプロジェクトとして行われ,³⁾ その成果を基礎にして2006年4月から同研究所で細胞内システムの理解を目指した第2期プロジェクトが新たにスタートした。本稿では, *T. thermophilus* HB8 の構造ゲノム科学の進展状況を概観し, 特に機能未知タンパク質の理解に果たした役割と今

後の細胞内システムの理解へ向けた取り組みを報告する。

2. 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)

第1期プロジェクトを開始するにあたり, まず *T. thermophilus* HB8 のゲノム解析を行った。その結果, ゲノムサイズは2.1 Mbp で, 約2200個の遺伝子が同定された(図3)。そのうち, 約1400個はアミノ酸配列の相同性から機能を推定できる。それらのタンパク質は, アミノ酸代謝やヌクレオチド代謝, 転写, タンパク質合成といった機能カテゴリに属するタンパク質一群として分類でき, 細胞内での特定の生理的役割を担う「細胞内システム」を構成する。一方で, 機能を予測できない遺伝子は約800個存在する(全体の35%を占める)。ゲノム情報は, 2004年11月から公開されている。

タンパク質を大腸菌で大量生産するために, 発現プラスミドを構築し(ノバジェン社のpET-11aを標準利用),⁴⁾ 現在までに約2060個(全体の90%程度)の発現プラスミドが完成した。*T. thermophilus* HB8 タンパク質を大腸菌BL21(DE3)で大量生産すると, 全体の約72%がIPTG誘導なしで発現した⁴⁾(図4)。発現しないタンパク質に対しては, IPTG誘導を行う, 宿主大腸菌を変える, 培地組成を変えるなどの試みによって, 現在までに約80%のタンパク質について量産化に成功した。結晶解析の位相問題を容易にするため, 分子内の含硫アミノ酸メチオニンをセレノメチオニンに置換したタンパク質も生産している。タンパク質

図1 高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 の電子顕微鏡写真。(Electron micrograph of *T. thermophilus* HB8.)

図2 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクトの概念図。(Work flow of the Whole Cell Project of *T. thermophilus* HB8.)

図3 高度好熱菌遺伝子の機能分類。(Classification of genes from *T. thermophilus* HB8.) 遺伝子産物であるタンパク質のアミノ酸配列を用いた相同性検索から機能分類を行った。機能未知(モチーフあり)は, 機能既知のモチーフを有するもの, 機能既知(他種でも保存)は, 機能既知タンパク質との類似性はないが複数の生物種に配列類似性が認められるタンパク質が存在するもの, 機能未知(TTHB8のみ)は他種に配列類似性が認められるタンパク質が存在しないものを意味する。

	発現したタンパク質数 合計 1,379	成功率 (可溶画分)
・BL21(DE3)	998	72.3% (55.7%)
↓		
・BL21(DE3) with IPTG	9	+0.7% (+0.3%)
↓		
・Rosetta(DE3)	97	+7.0% (+4.7%)
↓		
・HMS174(DE3)	8	+0.6% (+0.3%)
↓		
・BL21(DE3) + glucose	3	+0.2% (+0.1%)

図4 高度好熱菌の発現実験。(Protein expression of *T. thermophilus* proteins.) 宿主大腸菌は、大きくB株とK株に分かれる。BL21 (DE3) は代表的なB株由来の大腸菌である。Rosetta (DE3) は、大腸菌における稀少コドンを補うよう外来プラスミドを有するB株由来の大腸菌である。HMS174 (DE3) はK株由来の大腸菌である。大腸菌B株は、IPTGを添加しなくても大腸菌染色体T7 RNAポリメラーゼのリーク発現を行う傾向があり、本プロジェクトではこの現象を積極的に利用した。グルコースを培地に添加するとリーク発現は停止するので、宿主に害のある遺伝子を発現する際に有効である。

精製には、*T. thermophilus* HB8 タンパク質の高い熱安定を利用して精製の初期段階に熱処理を用いると、精製純度が向上した。⁴⁾ 熱処理後、典型的なカラムクロマトグラフィ法 (疎水性、イオン交換、ヒドロキシアパタイト、ゲルろ過) を組み合わせ、室温で精製可能である。現在までに、約930個 (全体の42%) のタンパク質精製が完了している。なお、発現プラスミドは理研バイオリソースセンターなどから配布予定である。発現や精製に関する情報の公開も準備中である。

タンパク質の結晶化には、市販の結晶化試薬、約500条件で初期スクリーニングを行い、結晶化ロボット⁵⁾を用いて迅速化した。X線による結晶の損傷を低減するため、タンパク質結晶を冷却窒素ガス気流中で瞬間凍結した後、放射光施設 SPring-8 にある理研構造ゲノムビームラインII (BL26B2) ^{6),7)} で回折データを測定する。このビームラインには結晶交換ロボットがあり、無人データ収集と効率的な結晶スクリーニング (重原子誘導体や非分解基質および補因子複合体の検索に有効) が可能である。さらに、結晶をもち寄ってさまざまな研究グループとビームタイムをシェアできる利点がある。

新規構造に対しては、結晶中のタンパク質に含まれた金属またはセレンなどの異常散乱原子の異常分散効果を位相決定に利用した多波長異常分散法の回折データを測定し、引き続き重原子位置の決定と位相計算、電子密度図に基づく分子モデリング、精密化を行う。類似性の高い構

表1 高度好熱菌の構造ゲノムの進捗状況。(Progress of the structural genomics of *T. thermophilus* HB8.)

段階	タンパク質数
(1) 発現プラスミド	2059
(2) 大腸菌での大量発現	1450
(3) 精製	941
(4) 結晶化	658
(5) データ収集	432
(6) 立体構造	321
ほかのグループによる立体構造 (83個)	404

造が存在するときには、類似構造を利用した分子置換法が利用できる。近年のコンピュータの高速化と解析ソフトウェアの発達によって、迅速な構造決定が可能となっている。⁸⁾ 必要に応じ、重原子を利用した位相計算や分子置換法を行う種々の解析ソフトウェアを組み合わせ、設定パラメータを総当たりに試すことで最適な位相決定条件を検索する解析パイプライン (理研播磨研・国島直樹チーム開発) も利用する。また、得られた立体構造中の原子座標の整合性、対称を考慮に入れた原子間距離、水分子の距離のチェックなどを行う構造評価システム (国島チーム開発) を利用し、迅速かつ精度良い立体構造の決定を目指している。ゲノムワイドな構造研究を支えるため、タンパク質の配列から位相決定の進捗までの実験情報をデータベース化し、実験者間における情報共有を実現している。

多くの研究者の協力で、現時点までに約320種類のタンパク質の立体構造解析が完了または進行中である (表1)。プロジェクトとは独立に国内外で決定された構造解析数83個を加えると404個に達し、*T. thermophilus* HB8の全タンパク質の18%に相当する。構造ゲノム科学の部分は、当プロジェクトの第1期期間中に始まったタンパク3000プロジェクトと一部協同したことによって加速した。2000年付近から世界各地で開始された構造ゲノムプロジェクトは、生物種を特定して、あるいはさまざまな生物種から興味あるタンパク質 (新規構造や疾患関連など) を選択して行われている。⁹⁾ 現時点で生物種別に構造決定された割合を表2に示す (解析例の多い生物種を文献⁹⁾ に基づき選んだ)。研究の歴史が長い大腸菌の構造決定率は19%と最も高い。酵母 *S. cerevisiae* では6%が決定されているが、ドメイン単位の解析例が多い。好熱菌の構造決定率は高く、好熱性真正細菌の *T. maritima* MSB8 の構造決定率は14%である。当プロジェクトの最近の進捗を考慮した *T. thermophilus* HB8 の構造決定率は大腸菌に次ぐ18%に達し、*T. thermophilus* HB8 の構造ゲノムの進展が顕著であることがわかる。

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では25~30%の成功率が限界に近いと考えられる。しかし、近い将来に、(a) 膜タ

表2 各生物種における構造決定率. (Coverage of protein structure space for each genome.)

生物種	生物界	タンパク質数	構造数	割合 (%)
<i>Escherichia coli</i> K-12	真正細菌	4537	847	19
● <i>Thermus thermophilus</i> HB8	真正細菌	2238	404	18
● <i>Thermotoga maritima</i> MSB8	真正細菌	1876	254	14
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	真核生物	5855	373	6
● <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	古細菌	2254	134	6
<i>Bacillus subtilis</i> strain 168	真正細菌	4106	230	6
● <i>Methanocaldococcus jannaschii</i> DSM 2661	古細菌	1803	63	3

●は好熱菌を示す. 構造数は, 全長の半分以上の領域に対し95%以上の配列相同性をもつ構造数を示す.

ンパク質や複合体タンパク質の調製技術, (b) タンパク質の結晶化技術, (c) 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, 自由電子レーザーを利用した立体構造解析技術) 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. それら諸技術の開発時にも, 高い安定性と高い結晶化成功率を有する *T. thermophilus* HB8 のタンパク質の有効活用が期待される.

3. ゲノムワイドな分子機能解析 (機能ゲノム科学)

高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 を構成するパーツ (タンパク質) の形を知ると同時に, 各タンパク質が細胞内のほかのタンパク質とどのような相互作用をし, どのように機能に関連しているかを知ることは重要である. われわれは *T. thermophilus* HB8 に対する機能ゲノム科学的解析法を構築しつつ, 順次利用している (図5).

まず, 遺伝子操作の汎用性を高めるため, 薬剤耐性遺伝子 (カナマイシン耐性遺伝子) を耐熱化し,¹⁰⁾ これを利用した遺伝子破壊法を確立した.¹¹⁾ 現時点では, 約1000個 (全体の45%) の遺伝子破壊用プラスミドを作製した. mRNA解析には, アフィメトリクス社のジーンチップシステムを導入した. 培養時間に対する全遺伝子のmRNA量を観測したところ, 定常期を超えた時間帯からタンパク質翻訳系やATP合成系の遺伝子群のmRNA量が減少する一方, 機能未知遺伝子群の中にmRNA量の上昇を示すものがあるという興味深い結果が出ている. タンパク質の発現解析では, フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴法¹²⁾ を用いた手法を構築中である. 代謝物質解析は, キャピラリー電気泳動と質量分析を組み合わせた手法¹³⁾ で進行中である (慶応大・富田 勝先生らとの共同研究). 形態解析を含めたこれらの機能ゲノム科学的解析法は, 遺伝子破壊株と野生型との比較を行うことでさらに大きな生物学的意義を見出すことができる. 現在, いくつかの細胞内システムを対象として選び, 各システムの細胞内での役割を解析するとともに, 同システムに関与する機能未知タンパク質の同定を行っている.

図5 高度好熱菌のゲノムワイドな分子機能解析.

(Molecular functional analyses on *T. thermophilus* HB8.)

4. 機能未知タンパク質の機能発見

高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 の全タンパク質の約1/3は機能未知タンパク質である. 「配列モチーフを有するが機能が確定していないタンパク質」も含めると, 全体の半分弱のタンパク質の機能はわかっていない (図3). 細胞内システムに関与するタンパク質群と代謝物質は, 現時点での文献やデータベースなどのさまざまな情報に基づいて推定し同定するが, 機能未知タンパク質の機能を発見することは, 細胞内システムを構成するタンパク質群を同定・把握するうえで必須であり, 細胞全体の生命現象を理解するために超えるべき重要な課題である.

タンパク質の立体構造は, アミノ酸配列以上に進化の過程で保存されており,¹⁴⁾ 加えて, 立体構造は分子機能に密接にかかわっている. そこで, 構造ゲノム科学的手法によって機能未知タンパク質の形を明らかにし, 機能を類推するアプローチが考えられる.¹⁵⁾⁻¹⁷⁾ 以下に, *T. thermophilus* HB8 の機能未知タンパク質の解析例を, いくつかの観点に分けて紹介する. 立体構造を機能類推に用いるアプローチは, 文献16) に詳しい.

4.1 解析実例

4.1.1 立体構造解析によりリガンドを発見

カルフォルニア大バークレー校・Sung-Hou Kim 博士ら¹⁸⁾ が, 機能未知タンパク質の立体構造に結合していた

図6 高度好熱菌由来の機能未知タンパク質の構造・機能解析例. (Structural and functional analyses of hypothetical proteins from *T. thermophilus* HB8.) (A) リガンドを発見できた例. ポリイソプレノイド分子がタンパク質に結合していることが立体構造解析から明らかになった. (B) 類似構造を発見できた例. TTHB192は、一本鎖RNAに対する結合能を有する Sex-lethal protein と構造類似性を示す. (C) 機能部位を発見できた例. 分子表面にあるキャビティが、進化的に保存されたアミノ酸残基 (空間充填モデルで表示) によって作られたヘム結合部位である. (D) 依然として機能未知である例. 当研究グループの例では、構造が得られた機能未知タンパク質の約6割に対し機能情報を得ることができた. 機能の手がかりは、A～Cの組み合わせで得られる場合も多い.

ATP分子の存在から新規のATP結合タンパク質を発見したように、アミノ酸配列だけでは予測できないリガンド分子の存在を、立体構造によって明らかにできることがある.

機能未知タンパク質 TTHA0802 は、真正細菌と古細菌で保存されたタンパク質ファミリーを形成する. その立体構造¹⁹⁾ (図6A) はベータバレル構造をもち、レチノール結合タンパク質と立体構造が類似していた (両者間にアミノ酸配列相同性はない). 興味深いことに、バレル構造中心部に存在する疎水性細孔に、タンパク質由来ではないリガンド分子の強い電子密度が観測された. 電子密度の形状と質量分析の結果からリガンド分子はオクタプレニル二リン酸と同定され、本タンパク質が新規のポリイソプレノイド結合タンパク質であると判明した. このリガンド分子は、大腸菌でのタンパク質発現および精製、結晶化の過程で添加されておらず、精製の過程を通して強固に結合していることから、TTHA0802の分子機能 (ポリイソプレノイド結合) が強く示唆された.

4.1.2 立体構造解析により類似構造を発見

アミノ酸配列の比較では検出できない進化的に類縁の

ファミリーは、立体構造の類似性から明らかにできる場合がある.

機能未知タンパク質 TTHB192 は、真正細菌のタンパク質ファミリーの一員で、機能推測できる配列モチーフは存在しない. TTHB192の立体構造²⁰⁾ (図6B) は、一本鎖RNA認識タンパク質と類似し、かつ分子表面に正に帯電した領域が存在することから、核酸結合タンパク質であると考えられる. 当グループの新海らは、ジーンチップシステムによる mRNA の発現量解析から、TTHB192を含めた機能未知タンパク質群の発現が、細胞内シグナル伝達因子の1つによって調節されることを明らかにした. 近年、これら機能未知タンパク質群が、原核生物特異的な DNA 反復配列に付随していることが報告され²¹⁾ 宿主の防御機構に関与する可能性²²⁾ も示唆されており、新しい細胞内システム理解の端緒となっている.

機能未知タンパク質 TTHA1899 は真正細菌と古細菌で保存されたタンパク質で、その立体構造²³⁾ は、スクニル CoA 合成酵素の CoA 結合ドメインと高い類似性を示した (両者のアミノ酸配列相同性は 14 % ときわめて低い).

CoA 結合能は等温滴定熱量測定で実験的に確かめられ、新規 CoA 結合タンパク質の同定に至った。

4.1.3 立体構造解析により機能部位を発見

酵素の活性部位や補因子・リガンドなどと相互作用する機能部位を構成するアミノ酸残基は、機能的に重要であるため、進化的に保存されていることが多い。推測された機能部位の特徴は、立体構造の視点から理解を深めることができる。

機能未知タンパク質 TTHA1714 は、真正細菌と古細菌のタンパク質ファミリーの一員である（アミノ酸配列相同性 20～50 %）。その立体構造²⁴⁾ (図 6C) は、糖質異性化酵素の 1 つと酷似していたが、同酵素の触媒残基が TTHA1714 とその仲間では保存されていなかった。われわれは、立体構造から分子表面に深い穴（キャビティ）があることに着目した。加えて、本タンパク質がヘム結合タンパク質の 1 つである亜塩素酸ジスムターゼと弱いアミノ酸配列類似性（相同性 15 %）を示すことに着目したところ、機能未知タンパク質群と同ヘム酵素間で保存されたアミノ酸残基がキャビティ周辺に集中して存在することを見出し、同キャビティがヒスチジン残基を配位子とするヘム結合部位であると推定した。その推定に基づいて生化学実験を行い、TTHA1714 を含むタンパク質ファミリーが新規ヘム結合タンパク質であることを示した。ヘム近位部位の特徴から、TTHA1714 はヘムペルオキシダーゼであると考えられる。

機能未知タンパク質 TTHA0252 は、配列モチーフの特徴から 2 つのドメインを有する。アミノ末端側は金属ベータラクタマーゼドメイン（活性部位に亜鉛イオンを配位）、カルボキシ末端側は RNA 分解酵素で特徴的に保存されたアミノ酸残基が存在するドメインである。結晶構造と活性測定の結果²⁵⁾ TTHA0252 は金属ベータラクタマーゼで共通の折り畳み構造を有する RNA 分解酵素であることが示された。両ドメイン間には正に荷電した溝（一本鎖 RNA が結合できる幅を有す）が形成され、一本鎖 RNA が活性部位へと導かれるのに適した特徴を有することから、カルボキシ末端のドメインが基質認識に関与していると考えられる。TTHA0252 の機能発見は、今後、*T. thermophilus* HB8 における RNA 分解システム解明の一端となる。

4.1.4 依然として機能未知の場合もある

機能未知タンパク質 TTHA0560 は、*T. thermophilus* HB8 以外に 3 つの生物種で保存されている。その立体構造²⁶⁾ は、多様な機能のタンパク質に類出する折り畳み単位であるフェレドキシン様フォールドを有する (図 6D)。

機能未知タンパク質 TTHA1013 は、*T. thermophilus* HB8 以外に 2 つの生物種で保存されている。その立体構造²⁷⁾ は、類似の構造が存在しない新規フォールドであった (図 6D)。

機能未知タンパク質 TTHA1732 は、機能既知タンパク質と構造類似性を示すものの、機能推測の手がかりを得る

のが難しかった²⁸⁾ (図 6D)。

4.2 機能未知タンパク質解析の重要性

機能未知タンパク質の立体構造解析は、新規の分子機能の発見のみならず、タンパク質ファミリーに対する代表構造（ときには新規フォールド）である確率がほかのタンパク質よりも高いので、タンパク質主鎖の立体構造予測に役立つ。²⁹⁾ また、立体構造から機能推測を行う試みはバイオインフォマティクス分野で注目を浴びており、立体構造の類似性検索や、機能部位の発見、タンパク質ファミリーまたは構造ファミリー分類などの技術は、日進月歩で進歩している。^{16),30)} 特に、いくつもの検索結果を統合して、多面的に機能推測するアプローチが有効である。¹⁶⁾ 構造ゲノム科学プロジェクトで得られる膨大な実験データ（立体構造）によって構造・機能比較が行われ、機能予測の精度は着実に向上しつつある。

4.3 今後の展開

機能未知タンパク質のうち、立体構造解析が可能であったタンパク質の約 6 割は、その構造的特徴から分子機能の推定が可能であった (図 6)。しかし、立体構造がわかっても、まだ機能不明のタンパク質が残されている。加えて、ゲノム解析で同定された一揃いのタンパク質から代謝経路の再構成を試みると、代謝系路上あるべき酵素が見つからないことがある。これら“見つからない酵素”は、機能未知タンパク質内に埋もれている場合がある。得られた立体構造とさまざまな機能情報を総合して、基本的生命活動に必要な機能未知タンパク質の機能発見を進めることが重要である。

5. システム生物学を目指して

細胞内システムの分子機能解析は、ゲノムワイドな研究が始まるはるか以前から、各研究者によって行われてきた“各論的”分子機能解析を含んでいる。今後は、これまでに精製したタンパク質（全体の 42 %）と得られた立体構造（全体の 18 %）を利用して、細胞内システムの反応過程に対する物理化学レベルでの理解が進展すると考えられる (図 7)。さらに、タンパク質のみならず核酸・糖質・脂質・その他すべての生体成分の物性を、“研究者間で共通した一定の条件下”で解析し、「どのような構造をした、どのような機能をもった」生体分子が「細胞内のどの場所に」「どれだけの分子数」存在するかなどを時間依存性ととともに調べ、最終段階の予測可能なシミュレーションに必要な各論的データを系統的に収集することになると考えられる。

一方で、新しいアプローチも必要となる。同じ活性をもつ酵素分子でも、一分子レベルで見ると、分子によって、さらに時刻によって、活性が変化することが知られている。また、高密度の細胞内では、生体分子が希薄溶液中と異なる挙動を示す。細胞内では平衡状態が成り立っていないので、非平衡の熱力学的取り扱いが必要と考えられる。

図7 高度好熱菌内の活性酸素種に対する防御系. (Cellular systems for protection from reactive oxygen species in *T. thermophilus* HB8.) *T. thermophilus* HB8 由来の9個の立体構造に†を付けた. †のない6個の立体構造はほかの生物種で構造決定されたものである. *T. thermophilus* HB8で精製標品が調製済のタンパク質には、タンパク質名に下線を引いた. *T. thermophilus* HB8で反応速度定数が測定されているタンパク質は、名前を太線で囲み、ほかの生物種で反応速度定数が測定されているタンパク質は名前を細線で囲んだ.

このような現象を理解するための新たな学問基盤の確立や分子・細胞機能解析法の開発に挑戦したい。

以上のような研究を通して、高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8でシステム生物学の学問基盤が整備でき、シミュレーションが生命現象の単なる説明ではなく、生命現象を予測できる段階に達すれば、われわれは生命現象を理解できたと言える段階に近づくと思われる。

6. おわりに

「高度好熱菌 丸ごと一匹 プロジェクト」では、さまざまな分野の研究者との交流・連携を通して、新しい研究分野を開拓したいと考えている。その一環として、当研究グループが保有する発現プラスミドと遺伝子破壊株用プラスミドは理研バイオリソースセンターなどから配布予定であり、研究者が自由に利用できる環境を整備しつつある。毎年8月に理研播磨研で研究会を開いており (<http://www.thermus.org/>)、このような機会を通して、将来へつながる学問基盤構築に向けて、多くの研究者が参画できるオープンな研究プロジェクトにしたいと考えている。

謝 辞

ここで紹介した研究の多くは、理化学研究所播磨研究所における放射光利用連携研究の一環で行われたものです。 *T. thermophilus* HB8のタンパク質構造・機能解析に参画していただいた国内外の諸先生方、研究を遂行するうえで必要な技術などを快く提供して下さいました先生方、な

日本結晶学会誌 第48巻 第6号 (2006)

らびに研究室スタッフ一同に対し、この場をお借りして、深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) S. Kuramitsu, S. Kawaguchi and Y. Hiramatsu: *Protein Eng.* **8**, 964 (1995).
- 2) T. Oshima and K. Imahori: *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**, 102 (1974).
- 3) S. Yokoyama, H. Hirota, T. Kigawa, T. Yabuki, M. Shirouzu, T. Terada, Y. Ito, Y. Matsuo, Y. Kuroda, Y. Nishimura, Y. Kyogoku, K. Miki, R. Masui and S. Kuramitsu: *Nat. Struct. Biol.* **7 Suppl.** 943 (2000).
- 4) N. Ohtani, N. Nakagawa, J. Hoseki, A. Ebihara, S. Satoh, Y. Agari, S. Kobayashi, K. Agari, N. Maoka, R. Masui, K. Miki, S. Yokoyama and S. Kuramitsu: *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **47**, 1009 (2002).
- 5) H. Miyatake, S. H. Kim, I. Motegi, H. Matsuzaki, H. Kitahara, A. Higuchi and K. Miki: *Acta Crystallogr. D* **61**, 658 (2005).
- 6) G. Ueno, R. Hirose, K. Ida, T. Kumasaka and M. Yamamoto: *J. Appl. Cryst.* **37**, 867 (2004).
- 7) M. Yamamoto: *J. Cryst. Soc. Jpn.* **48**, 199 (2006).
- 8) Y. Yasutake, M. Yao and I. Tanaka: *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **47**, 1033 (2002).
- 9) A. E. Todd, R. L. Marsden, J. M. Thornton and C. A. Orengo: *J. Mol. Biol.* **348**, 1235 (2005).
- 10) J. Hoseki, T. Yano, Y. Koyama, S. Kuramitsu and H. Kagamiyama: *J. Biochem.* **126**, 951 (1999).
- 11) Y. Hashimoto, T. Yano, S. Kuramitsu and H. Kagamiyama: *FEBS Lett.* **506**, 231 (2001).
- 12) Y. Shen, N. Tolic, C. Masselon, L. Pasa-Tolic, D. G. Camp, 2nd, K. K. Hixson, R. Zhao, G. A. Anderson and R. D. Smith: *Anal. Chem.* **76**, 144 (2004).
- 13) N. Saito, M. Robert, S. Kitamura, R. Baran, T. Soga, H. Mori, T. Nishioka and M. Tomita: *J. Proteome Res.* **5**, 1979 (2006).
- 14) C. Chothia and A. M. Lesk: *EMBO J.* **5**, 823 (1986).

- 15) S. H. Kim, D. H. Shin, I. G. Choi, U. Schulze-Gahmen, S. Chen and R. Kim: *J. Struct. Funct. Genomics* **4**, 129 (2003).
- 16) J. D. Watson, R. A. Laskowski and J. M. Thornton: *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 275 (2005).
- 17) D. J. Rigden: *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 457 (2006).
- 18) T. I. Zarembinski, L. W. Hung, H. J. Mueller-Dieckmann, K. K. Kim, H. Yokota, R. Kim and S. H. Kim: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 15189 (1998).
- 19) N. Handa, T. Terada, Y. Doi-Katayama, H. Hirota, J. R. Tame, S. Y. Park, S. Kuramitsu, M. Shirouzu and S. Yokoyama: *Protein Sci.* **14**, 1004 (2005).
- 20) A. Ebihara, M. Yao, R. Masui, I. Tanaka, S. Yokoyama and S. Kuramitsu: *Protein Sci.* **15**, 1494 (2006).
- 21) R. Jansen, J. D. Embden, W. Gaastra and L. M. Schouls: *Mol. Microbiol.* **43**, 1565 (2002).
- 22) K. S. Makarova, N. V. Grishin, S. A. Shabalina, Y. I. Wolf and E. V. Koonin: *Biol. Direct* **1**, 7 (2006).
- 23) T. Wada, M. Shirouzu, T. Terada, Y. Ishizuka, T. Matsuda, T. Kigawa, S. Kuramitsu, S. Y. Park, J. R. Tame and S. Yokoyama: *Acta Crystallogr. D* **59**, 1213 (2003).
- 24) A. Ebihara, A. Okamoto, Y. Kousumi, H. Yamamoto, R. Masui, N. Ueyama, S. Yokoyama and S. Kuramitsu: *J. Struct. Funct. Genomics* **6**, 21 (2005).
- 25) H. Ishikawa, N. Nakagawa, S. Kuramitsu and R. Masui: *J. Biochem.* **140**, 535 (2006).
- 26) A. Seto, M. Shirouzu, T. Terada, K. Murayama, S. Kuramitsu and S. Yokoyama: *Proteins* **53**, 768 (2003).
- 27) M. Hattori, E. Mizohata, M. Manzoku, Y. Bessho, K. Murayama, T. Terada, S. Kuramitsu, M. Shirouzu and S. Yokoyama: *Proteins* **61**, 1117 (2005).
- 28) S. Kishishita, A. Tatsuguchi, R. Ushikoshi-Nakayama, T. Terada, S. Kuramitsu, S. Y. Park, J. R. Tame, M. Shirouzu and S. Yokoyama: *Proteins* **57**, 883 (2004).
- 29) P. Bradley, K. M. Misura and D. Baker: *Science* **309**, 1868 (2005).
- 30) C. A. Orengo and J. M. Thornton: *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 867 (2005).

プロフィール

海老原章郎 Akio EBIHARA
理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター
RIKEN SPring-8 Center, RIKEN Harima Institute
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148, Japan
e-mail: ebihara@spring8.or.jp
最終学歴：筑波大学大学院農学研究科博士課程修了
専門分野：生化学

新海暁男 Akeo SHINKAI
理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター
RIKEN SPring-8 Center, RIKEN Harima Institute
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148, Japan
e-mail: ashinkai@spring8.or.jp
最終学歴：東京大学大学院農学系研究科博士課程修了
専門分野：分子生物学, 微生物学

中川紀子 Noriko NAKAGAWA
大阪大学大学院理学研究科
Graduate School of Science, Osaka University
〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1
1-1 Machikaneyama-cho, Osaka 560-0043, Japan
e-mail: naka5@bio.sci.osaka-u.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院理学研究科博士課程修了
専門分野：生化学

増井良治 Ryoji MASUI
大阪大学大学院理学研究科
Graduate School of Science, Osaka University
〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1
1-1 Machikaneyama-cho, Osaka 560-0043, Japan
e-mail: rmasui@bio.sci.osaka-u.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院理学研究科博士課程修了
専門分野：蛋白質化学

三木邦夫 Kunio MIKI
京都大学大学院理学研究科
Graduate School of Science, University of Kyoto
〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町
Kitashirakawa-Oiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan
e-mail: miki@kuchem.kyoto-u.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院工学研究科, 工学博士
専門分野：構造生物学

横山茂之 Shigeyuki YOKOYAMA
東京大学大学院理学系研究科
Graduate School of Science, University of Tokyo
〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan
e-mail: yokoyama@biochem.s.u-tokyo.ac.jp
最終学歴：東京大学大学院理学系研究科博士課程単位取得退学, 理学博士
専門分野：生化学, 構造生物学

倉光成紀 Seiki KURAMITSU
大阪大学大学院理学研究科
Graduate School of Science, Osaka University
〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1
1-1 Machikaneyama-cho, Osaka 560-0043, Japan
e-mail: kuramitsu@bio.sci.osaka-u.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院理学研究科博士課程修了
専門分野：生化学, 蛋白工学