

氏名(本籍)	おお ぶく ゆう こ 大 福 裕 子 (兵 庫 県)
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	博 甲 第 3100 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Protein Evolution Based on Analysis of DNA Sequences (ゲノム情報に基づくタンパク質の進化に関する考察)
主査	筑波大学教授 工学博士 田 中 秀 夫
副査	筑波大学教授 農学博士 馬 場 忠
副査	筑波大学教授 農学博士 深 水 昭 吉
副査	筑波大学教授 理学博士 山 根 國 男

論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究は、塩基配列の解析に基づいたタンパク質の進化について行ったものである。タンパク質の進化に関する研究は、アミノ酸配列を用いた系統樹等を用いて解析されている。しかし、アミノ酸配列の断片の系統樹における位置やその由来(3生物界)を比較することによって進化の解析は行われ、立体構造との関連性を述べたものは少ない。一方、生物の設計図や進化が記録されているDNA配列に基づいて、タンパク質の立体構造との関連性やその進化について報告された例はない。したがって、ゲノムDNA配列が決定され、遺伝子のタンパク質の立体構造も数多く決定され、かつ多くの研究報告がなされている大腸菌の遺伝子のDNA配列を対象にして、DNA配列と立体構造の関連性を同定する方法を開発し、その立体構造の情報を持ったDNA配列によりタンパク質の進化を推定することが本研究の目的である。そこで、進化の過程で機能性タンパク質の立体構造はそれまでに存在していたタンパク質の立体構造部品(立体構造情報をもった領域)が集められて作られ、その結果として新しい機能を創り出したという仮説を立てた。この仮説を実証するために、(1)ゲノムDNA配列中に立体構造の情報をもった遺伝子が水平移動してきたことを明らかにし、(2)遺伝子のDNA配列を、マルコフモデル(確率モデル)を用いて確率に変換し、その確率に基づいてDNA配列が立体構造情報をもった領域に分けられる事例を示し、(3)その分けられた領域を用いて遺伝子に痕跡として残るタンパク質の進化について考察した。

(1) *Pyrococcus horikoshii* ゲノムDNA配列中に、他の種から、オルソログ遺伝子を含むゲノム領域が水平移動したことを示唆していることを明らかにした。(2) Flavin oxidoreductaseを除く5遺伝子 flavodoxin reductase, heat shock protein (*grpE*), integrase/recombinase *xerD*, endonuclease III, elongation factor Tu (*tufB*) は、マルコフモデルで得られた確率により領域に分けられた。その領域と、CATHの立体構造分類に基づいて分類されたドメインとよく対応していたことから、分けられた領域は立体構造情報をもっているといえる。(3) Flavodoxin reductaseの分けられた領域を用いて、核酸データベースに対してFASTA相同性検索を行った結果、Flavodoxin reductaseはFADドメインとして *Azotobacter vinelandii* 由来のNADPH:ferredoxin reductaseが移動し、NADPドメインとして、bacteriophage由来のtailタンパク質、プラスミド由来のカチオン排出遺伝子及び接合遺伝子が他の細菌の種から移動し、融合したものであると考えられる。また、Heat shock protein (*grpE*)の示す確率のパターンから、領域I+IIの一部と領域IIIの一部が似ており、領域I+IIと領域III-IVの間における同一塩基の割合は47%であった。大腸菌を含む10種のGrpEやGrpEホモログのアライメントから、C末端側がよく保存されていることがわかった。

したがって、大腸菌の GrpE は、C 末端側（領域Ⅲ－Ⅳ）の DNA 配列が、複製後、融合したものであると考えられる。

以上のことをもって、進化の過程で生じた機能性タンパク質の立体構造はそれまでに共存していた各立体構造部品が集められ、新しい機能を創り出したという仮説を、機能性タンパク質遺伝子の塩基配列を用いて立証するとともに、タンパク質の進化について新しい観点を開いた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、塩基配列を用いてタンパク質の進化について考察したものである。進化の過程で生じた機能性タンパク質の立体構造はそれまでに存在していた各立体構造部品が集められ、新しい機能を創り出したという仮説をたてた。また、タンパク質の情報や進化における変異は、クロモソームに記録されていることから、遺伝子の塩基配列を解析対象とした。遺伝子の塩基配列と遺伝子の示す立体構造の関連性を明らかにするため、塩基配列にマルコフモデルを応用し、遺伝子を領域にわけた。それらの領域と領域の示す立体構造を比較すると、領域と立体構造上のドメインが対応し、更にいえば、領域を 2 次構造の塊が対応していた。よって、この方法を用いると、塩基配列を立体構造をもつ領域に分けることができる。

大腸菌の 2 遺伝子、Flavodoxin reductase 及び Heat shock protein (*grpE*) について、塩基配列の領域を用いてタンパク質の進化について考察した。Flavodoxin reductase は、FAD ドメインとして *Azotobacter vinelandii* 由来の NADPH : ferredoxin reductase が移動し、NADP ドメインとして、bacteriophage 由来の tail タンパク質、プラスミド由来のカチオン排出遺伝子及び接合遺伝子が他の細菌の種から移動し、融合したものであると考えられる。Heat shock protein (*grpE*) は、C 末端側（領域Ⅲ－Ⅳ）の DNA 配列が、複製後、融合したものであると考えられる。

したがって、進化の過程で生じた機能性タンパク質の立体構造はそれまでに存在していた各立体構造部品が集められ、新しい機能を創り出したという仮説を実証することができた。

以上のことから、本研究において開発した方法は、遺伝子をタンパク質に発現させることなく、遺伝子中の外来性領域を同定し、その遺伝子の機能の推定し、その遺伝子やそのプロモーター領域に変異導入等を行うことが可能になる。また、遺伝子のアンチセンスつくることにより創薬することも可能であることから、産業における有用性もあると考えられることから本研究の成果の役割は大きいと判断する。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。