

Title	多様性を有するRNAキナーゼの進化情報解析とその情報に基づいた酵素機能の改変
Sub Title	Molecular evolution of diverse RNA kinase family proteins and construction of mutant enzymes based on the evolutionary data
Author	金井, 昭夫(Kanai, Akio)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	RNAのリン酸化酵素としてClp1が知られている。Clp1の大規模分子進化解析の結果、計3,577件のClp1関連タンパク質を検出した。その多くは真核生物やアーキアに由来し、バクテリアには限られた種にしか存在しなかった。Clp1のキナーゼドメインは、全てのClp1関連タンパク質に共通であり、N末端やC末端領域には生物種やファミリーに特徴的なドメインが保存されていた。また、1,000アミノ酸残基以上の巨大なClp1関連タンパク質を122個検出した。さらに、<i>Thermus scotoductus</i> Clp1組換え体酵素を用いて、バクテリアClp1のリン酸化活性を世界で初めて実験科学的に検証した。 We conducted a large-scale molecular evolutionary analysis of the Clp1 family proteins, a polyribonucleotide 5'-hydroxyl kinases. In total, 3,557 Clp1 family proteins were detected in the three domains of life, Bacteria, Archaea, and Eukarya. Many were from Archaea and Eukarya, but a few were found in restricted, phylogenetically diverse bacterial species. The domain structures of the Clp1 family proteins also differed among the three domains of life. Although the proteins were, on average, 555 amino acids long (range, 196-2,728), 122 large proteins with > 1,000 amino acids were detected in eukaryotes. The polyribonucleotide kinase activity of <i>Thermus scotoductus</i> Clp1 was characterized experimentally. We propose a comprehensive assessment of the diversification of the Clp1 family proteins and the molecular evolution of their functional domains.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2017～2019 課題番号：17K07517 研究分野：分子進化学、分子生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K07517seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07517

研究課題名(和文) 多様性を有するRNAキナーゼの進化情報解析とその情報に基づいた酵素機能の改変

研究課題名(英文) Molecular Evolution of diverse RNA kinase family proteins and construction of mutant enzymes based on the evolutionary data

研究代表者

金井 昭夫 (KANAI, Akio)

慶應義塾大学・環境情報学部(藤沢)・教授

研究者番号：60260329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：RNAのリン酸化酵素としてClp1が知られている。Clp1の大規模分子進化解析の結果、計3,577件のClp1関連タンパク質を検出した。その多くは真核生物やアーキアに由来し、バクテリアには限られた種にしか存在しなかった。Clp1のキナーゼドメインは、全てのClp1関連タンパク質に共通であり、N末端やC末端領域には生物種やファミリーに特徴的なドメインが保存されていた。また、1,000アミノ酸残基以上の巨大なClp1関連タンパク質を122個検出した。さらに、*Thermus scotoductus* Clp1組換え体酵素を用いて、バクテリアClp1のリン酸化活性を世界で初めて実験科学的に検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAキナーゼであるClp1に関して、タンパク質のドメインレベルで、特に真核生物において機能の分担をしながら分子進化していく様相を明らかにできた。この研究過程で、Clp1のキナーゼドメインを有した巨大タンパク質(Clpl様タンパク質)を見出した。Clp1はヒトで遺伝病の原因遺伝子となっていることから、今回見出したClpl様タンパク質も遺伝病に関わる可能性がある。また、バクテリアで初めてとなるClp1分子を同定し、その生化学的な活性に関して検証した。

研究成果の概要(英文)：We conducted a large-scale molecular evolutionary analysis of the Clp1 family proteins, a polyribonucleotide 5'-hydroxyl kinases. In total, 3,557 Clp1 family proteins were detected in the three domains of life, Bacteria, Archaea, and Eukarya. Many were from Archaea and Eukarya, but a few were found in restricted, phylogenetically diverse bacterial species. The domain structures of the Clp1 family proteins also differed among the three domains of life. Although the proteins were, on average, 555 amino acids long (range, 196-2,728), 122 large proteins with > 1,000 amino acids were detected in eukaryotes. The polyribonucleotide kinase activity of *Thermus scotoductus* Clp1 was characterized experimentally. We propose a comprehensive assessment of the diversification of the Clp1 family proteins and the molecular evolution of their functional domains.

研究分野：分子進化学、分子生物学

キーワード：分子進化 ポリヌクレオチドリリン酸化酵素 情報学的解析 実験検証 巨大タンパク質

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

RNA のリン酸化を行う酵素として、ポリヌクレオチドリリン酸化酵素 Clp1 が知られている。この酵素は、主に前駆体 tRNA のスプライシングや、mRNA 3'末端の形成に関わっている。Clp1 タンパク質ファミリーとして一部の真核生物では、Nol9 や Grc3 といった酵素があり、主に前駆体 tRNA プロセッシングに関与している。しかしながら、Clp1 タンパク質ファミリーの大規模な系統学的な分布や、その多様性は明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

Clp1 タンパク質ファミリーの大規模な系統学的分布や、その多様性を網羅的な分子進化解析を行うことによって明らかにする。この過程で得た、分子の構造と活性に関する知見に基づき新しい特異性をもったポリヌクレオチドキナーゼをデザインする。ここで、後半の目的である「キナーゼのデザイン」は、分子進化の研究過程で、バクテリアの単純化された Clp1 様分子を発見するに至って、同バクテリア分子の活性検証を当面の目的とし、部分修正を行った。「キナーゼのデザイン」は本申請研究を終了後に引き続き行っている。

3. 研究の方法

Clp1 の分子進化研究では、生物の三大ドメインであるバクテリア、アーキア、真核生物のタンパク質配列が登録された公共データベースを用いて、大規模な解析を行った。生物ドメインごとの存在比の計算には、完全長のゲノム配列を用いた。実験科学的な解析では、まず、*Thermus scotoductus* Clp1 (Ts-Clp1)のタンパク質コード領域のコドンで大腸菌のそれに最適化した合成遺伝子を構築した。これを用いて、Ts-Clp1 を大腸菌で発現させた後、これを SDS 存在下のポリアクリルアミドゲル電気泳動で主要なタンパク質となるまで精製した。精製した Ts-Clp1 の酵素学的なパラメータを測定した。

4. 研究成果

(1) 分子進化解析の結果、合計で 3,577 件の Clp1 関連タンパク質が検出され、その多くは真核生物やアーキアに存在したが、バクテリアには限られた種に少数しか存在しなかった。また、リン酸化に重

要な Clp1 のポリヌクレオチドリリン酸化ドメインは、すべての Clp1 関連タンパク質に共通であり、N 末端や C 末端には生物種やファミリーに特徴的なドメインが保存されていた (図 1)。

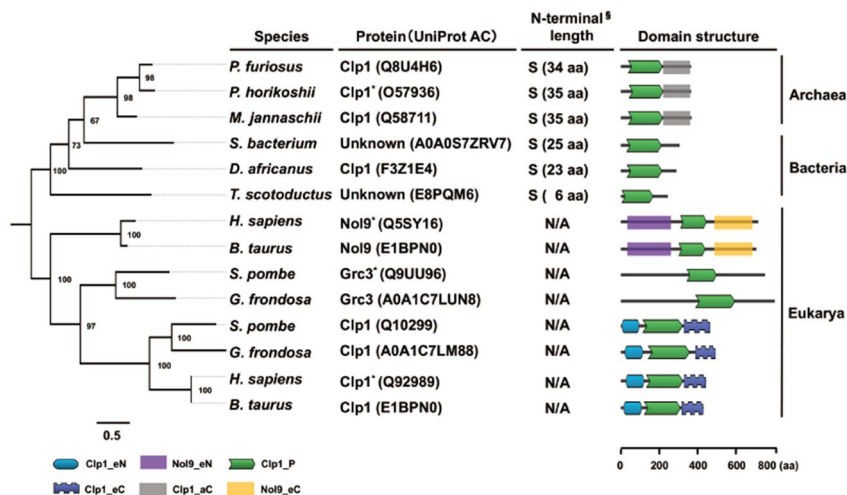


図 1 Clp1 タンパク質ファミリーのタンパク質ドメインレベルでの進化 (緑色は保存されたキナーゼドメインを示す。詳細は参考文献を参照)

様 式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

(2) Clp1 関連タンパク質のアミノ酸長を算出すると平均が 555 アミノ酸残基であったが、真核生物において 1,000 アミノ酸残基以上の巨大な Clp1 関連タンパク質 122 個検出された (図 2)。これらの新規タンパク質では、Clp1 のポリヌクレオチドリン酸化ドメインと様々な機能ドメインが保存されており、その 80%以上が真菌類や、前口動物由来のものであった。

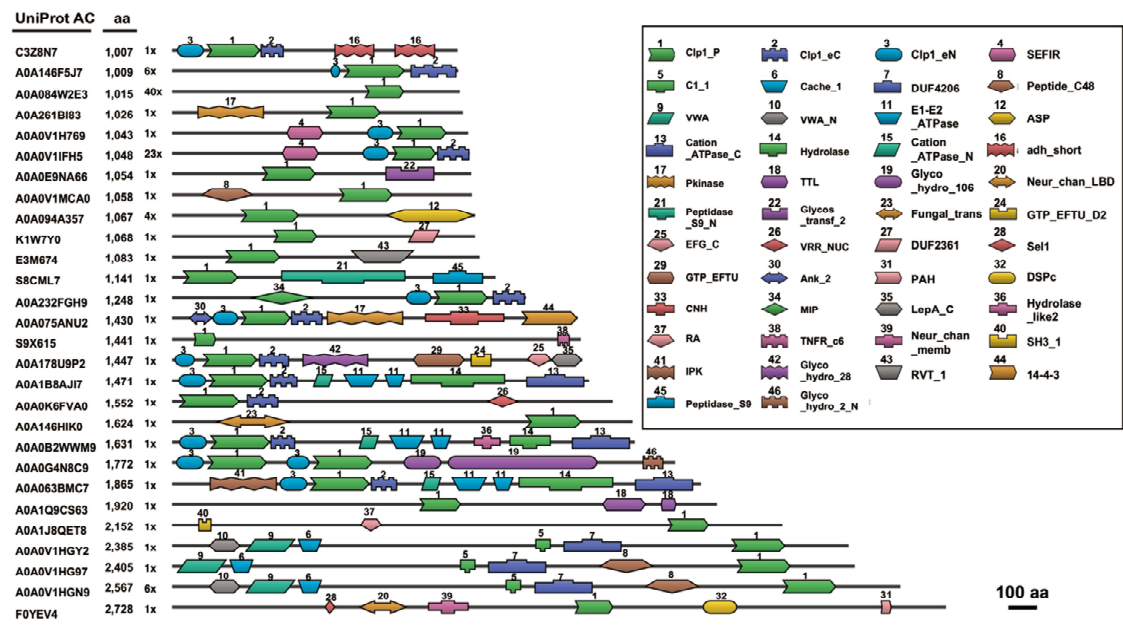


図 2 マルチドメインを有する巨大な Clp1 関連タンパク質の例

ドメイン番号 1 (Clp1_P)で表された緑のシンボルが Clp1 のキナーゼドメインに対応する。aa は各タンパク質を構成するアミノ酸の数。1 x、6 x 等は同じ構造を有する遺伝子が今回解析したデータベース上に幾つ存在するかを表している。

(3) Ts-Clp1 組換え体タンパク質を用いて、バクテリア Clp1 のリン酸化活性を世界で初めて実験科学的に検証した。Ts-Clp1 は一本鎖 RNA をリン酸化し (ATP に対する K_m 値、2.5 μ M)、高濃度の酵素を添加することで一本鎖 DNA のリン酸化も促進した。

参考文献：

Saito, M., Sato, A., Nagata, S., Tamaki, S., Tomita, M., Suzuki, H., and Kanai, A. (2019) Large-scale Molecular Evolutionary Analysis Uncovers a Variety of Polynucleotide Kinase Clp1 Family Proteins in the Three Domains of Life. *Genome Biology and Evolution* 11(10): 2713-2726.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saito Motofumi, Sato Asako, Nagata Shohei, Tamaki Satoshi, Tomita Masaru, Suzuki Haruo, Kanai Akio	4. 巻 11
2. 論文標題 Large-Scale Molecular Evolutionary Analysis Uncovers a Variety of Polynucleotide Kinase Clp1 Family Proteins in the Three Domains of Life	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genome Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 2713～2726
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/gbe/evz195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

1. 著者名 Kanai Akio, Yoshihisa Tohru	4. 巻 10
2. 論文標題 Editorial: Current Advances in the Research of RNA Regulatory Enzymes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 1～2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fgene.2019.00973	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 4件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 M. Saito, A. Sato, and A. Kanai
2. 発表標題 Characterization of the polynucleotide kinase Clp1 family proteins in Prokaryotes
3. 学会等名 RNA 2020: The 25th Annual Meeting of the RNA Society, Online Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 M. Saito, A. Sato, S. Nagata, S. Tamaki, M. Tomita, H. Suzuki, and A. Kanai
2. 発表標題 A large-scale molecular evolutionary analysis uncovers a variety of polynucleotide kinase Clp1 family proteins in the three domains of life
3. 学会等名 RNA 2019: The 24th Annual Meeting of the RNA Society, Poland (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金井昭夫
2. 発表標題 バクテリアのシステム生物学及び合成生物学的解析から考える生命科学
3. 学会等名 山形大学医学部セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Saito, A. Sato, S. Nagata, S. Tamaki, M. Tomita, H. Suzuki, and A. Kanai
2. 発表標題 Large-scale molecular evolutionary analysis uncovers a diversity of polynucleotide kinase ClpI family proteins in the three domains of life.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Saito, A. Sato, S. Nagata, M. Tomita, S. Tamaki, H. Suzuki, and A. Kanai
2. 発表標題 Large-scale phylogenetic analysis and diversity of ClpI polynucleotide kinase family protein
3. 学会等名 RNA 2018: The 23rd Annual Meeting of the RNA Society, University of California Berkley, USA. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金井昭夫
2. 発表標題 生命の起源と原始生命に関わる研究戦略
3. 学会等名 日本進化学会年会シンポジウム 「地球の歴史と生命の起源、生命を構成する分子の進化」日本進化学会第20回大会 東京
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金井昭夫
2. 発表標題 “ 群体 ” の変化としてとらえる分子進化研究の重要性
3. 学会等名 ゲノム未来会議3.0 鶴岡
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤元文、佐藤朝子、永田祥平、玉木聡志、富田勝、鈴木治夫、金井昭夫
2. 発表標題 RNAキナーゼClp1の大規模分子進化解析から予測された新規バクテリアClp1の機能検証
3. 学会等名 第2回 慶應ライフサイエンスシンポジウム 日吉
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Saito, A. Sato, S. Nagata, M. Tomita, S. Tamaki, H. Suzuki, and A. Kanai
2. 発表標題 Biochemical characterization of a novel and thermostable polynucleotide kinase Clp1 in the thermophilic bacterium <i>Thermus scotoductus</i> .
3. 学会等名 International workshop on “ 50th anniversary of <i>Thermus thermophilus</i> discovery ” Izu, Japan (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤元文、佐藤朝子、永田祥平、富田勝、玉木聡志、鈴木治夫、金井昭夫
2. 発表標題 好熱性バクテリア <i>Thermus scotoductus</i> 由来新規ポリヌクレオチドカイネースClp1の生化学的な特徴解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 横浜
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Saito, S. Nagata, M. Tomita, H. Suzuki and A. Kanai
2. 発表標題 Large-scale molecular evolutionary analysis of the ClpI polynucleotide kinase family that is involved in pre-tRNA splicing
3. 学会等名 RNA 2017: The 22nd Annual Meeting of the RNA Society, Prague, Czech Republic (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金井昭夫
2. 発表標題 超好熱性アーキアPyrococcus furiosusの熱ショック時におけるRNAプロセッシング制御
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 神戸（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤元文、永田祥平、富田勝、玉木聡志、鈴木治夫、金井昭夫
2. 発表標題 tRNA前駆体スプライシングに関わるClpIタンパク質の大規模分子進化解析
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 神戸
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金井昭夫
2. 発表標題 アーキア及び真核生物における変則型tRNA遺伝子の発見とその進化
3. 学会等名 九州大学大学院 生物資源環境科学府 生命機能科学専攻 「生物機能分子化学セミナー」福岡（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金井昭夫
2. 発表標題 機能性RNAの性状と進化の解析 --- 古典的ノンコーディングRNAから人工低分子RNAまで
3. 学会等名 近畿大学薬学研究科 大学院特別講義（創薬選択セミナー）大阪（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Akio Kanai and Tohru Yoshihisa ed.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Frontiers Media SA	5. 総ページ数 131
3. 書名 Current Advances in the Research of RNA Regulatory Enzymes	

1. 著者名 金井昭夫（日本Archaea研究会、石野 良純、跡見 晴幸編集）	4. 発行年 2017年
2. 出版社 共立出版	5. 総ページ数 212
3. 書名 アーキア生物学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----