

## Euglenozoa 生物におけるピリミジン生合成第 5, 第 6 酵素の高次構造と多様性

伊藤 清香 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 橋本 哲男 (筑波大学 生命環境系)

### 導入

ピリミジンは DNA や RNA の前駆体として必須の生体成分であり、サルベージ経路と生合成経路によって供給される。ピリミジン生合成経路は 6 段階の酵素反応を介してウリジル酸 (UMP) を生成する経路である。真核生物では本経路の初段 3 酵素および最終 2 酵素に遺伝子融合が認められ、生じた融合酵素は基質のチャネリング等に有利に機能すると考えられる。

第 5 酵素 orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) , 第 6 酵素 orotidine 5'-monophosphate decarboxylase (OMPDC) の分子進化に関するこれまでの研究から, OPRT-OMPDC 融合は真核生物の共通祖先で生じ, その後個々の生物系統で独立に遺伝子再編成が起きた結果, 独立型酵素や逆融合 (OMPDC-OPRT) が二次的に生じたことが明らかとなった<sup>1</sup>。また, 融合遺伝子の再編成は全て遺伝子水平転移 (LGT) を伴うことから遺伝子融合の進化の原動力として LGT がクローズアップされている。

真核生物のスーパーグループ Excavata は単系統の生物群 Euglenozoa を含み, これは分岐順にユーグレナ類, ディプロネマ類, およびキネトプラスチダ類で構成される (図)。Euglenozoa における OMPDC, OPRT 遺伝子の構造は著しく多様性に富み, ユーグレナ類では OPRT-OMPDC が, ディプロネマ類では独立型 OMPDC が, キネトプラスチダ類では逆融合 OMPDC-OPRT が存在する<sup>2</sup>。そこで本研究では, これまで未同定であったディプロネマ類の OPRT をクローニングしその起原を明らかにするとともに, 融合酵素成立の前段階として複合体構造をとる可能性について検討した。

RAxML プログラムを使用し最尤法による系統解析を行った。10 個の最節約系統樹を初期樹形として探索し, 尤度が最大となるものを最尤系統樹として採用した。アミノ酸置換モデルとしては LG+Γ+F を用いた。最尤系統樹の信頼性を評価するために, 100 回分のリサンプリングデータにもとづくブートストラップ解析を行った。

### 免疫沈降を用いたタンパク質相互作用の検出

*D. papillatum* OPRT cDNA を発現用プラスミド pET28a (Novagen) に, *D. papillatum* OMPDC cDNA を pET151 (Invitrogen) にそれぞれ組換え, 両プラスミドを用いて大腸菌 BL21 (DE3) Star を形質転換し二重発現系を構築した。発現誘導は 37°C で OD<sub>600</sub>=1.0 まで培養した菌液に IPTG を終濃度 0.5mM で加え, 25°C で 1 時間行なった。集菌後, 超音波処理を行なって得られた上清 (可溶性画分) について, 組換え OPRT に付加された T7・tag に特異的なマウスモノクローナル抗体またはウサギ抗 OMPDC 抗体を反応させ, プロテイン G 結合磁気ビーズを用いて抗体複合体を回収した。回収されたタンパク質を SDS-PAGE で分離し, 特異抗体を用いてウエスタンブロットを行った<sup>3</sup>。

### 結果および考察

OPRT の分子系統解析の結果, ディプロネマ類とキネトプラスチダ類が異なる系統群に位置し, ディプロネマ OPRT が LGT 起原であることが強く示唆された。ディプロネマ OMPDC がユーグレナ類 OPRT-OMPDC の OMPDC ドメインと単系統を形成する<sup>2</sup>ことと合わせると, ディプロネマ類の分岐後に LGT を介して OPRT を獲得し, その後 OPRT-OMPDC の分離および OPRT の置換が起きたと考えられる。また, キネトプラスチダ類は BP 値の高いサポートを受けて原核生物である *Chloroflexi* と姉妹群であることが示され, *Chloroflexi* からキネトプラスチダ類に OMPDC-OPRT の LGT が起きた可能性が示唆された。

大腸菌で共発現させたディプロネマ両酵素の相互作用について, 各酵素の特異抗体を用いてウエスタンブロットを行なったところ OPRT の免疫沈降物中に OMPDC が検出された。また, OMPDC の沈降物中に OPRT が検出された。OPRT および OMPDC の予想分子量はそれぞれ 24kDa および 44kDa であり, 免疫沈降物の SDS-PAGE においても両タンパクに相当する分子量のバンドが確認できた。これらの結果は, 独立型酵素である *D. papillatum* の OPRT および OMPDC が複合体として機能していることを強く示唆している。独立型のピリミジン生合成初段 3 酵素も相互作用を持つ<sup>3</sup>ことを合わせて考えると, 遺伝子融合の進化において独立型酵素間の機能的な複合体形成が融合酵素の成立の必要条件となっている可能性が示唆された。

### 参考文献

1. Makiuchi T, et al., *Gene* 394: 78–86, 2007
2. Makiuchi T, et al., *Protist* 159: 459–470, 2008
3. Nara T, et al., *BBRC* 418: 140–143, 2012

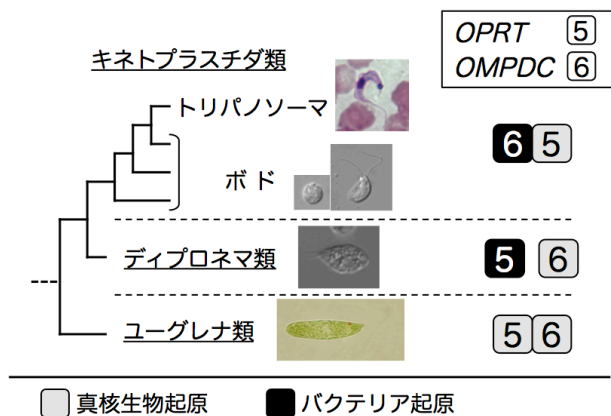


図. Euglenozoa 生物とピリミジン生合成第 5, 第 6 酵素の構造。

### 材料および方法

#### *Diplonema papillatum* の OPRT 遺伝子の同定

ディプロネマ *Diplonema papillatum* のドラフトゲノムに対して BLAST 検索を行ない, OPRT 遺伝子を得た。無菌培養した *D. papillatum* より TRIZOL® 試薬を用いて RNA を抽出し, cDNA を合成後, ゲノム配列を元に設計した 5'-端および 3'-端特異的なプライマーを用いて PCR を行ない, cDNA の全長を得た。

#### 分子系統解析

*D. papillatum* OPRT のアミノ酸配列をクエリとして BLAST 検索を実施し, 得られた配列のアライメントを MUSCLE プログラム及び手動で行ないデータセットを作成した。これをもとに