

氏名	おかむらひでゆき 岡村英幸
学位(専攻分野)	博士(人間・環境学)
学位記番号	人博第347号
学位授与の日付	平成18年11月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	人間・環境学研究科人間・環境学専攻
学位論文題目	P型ATPaseスーパーファミリーの分子進化と生物のマクロ進化の相関
論文調査委員	(主査) 教授 津田 謹 輔 助教授 林 達 也 教授 竹安 邦 夫

論 文 内 容 の 要 旨

本研究は膜たんぱく質イオンポンプP型ATPaseスーパーファミリーの分子進化を明らかにし、もって真核生物誕生のシナリオについての新たな知見と仮説を提示した。

第一章

これは本論文のイントロダクションであり、ここで現在の進化生物学における本論文研究主題の位置づけを明らかにした。共生による一部のオルガネラの起源を除き、真核生物の起源に関して、これまでの系統解析では真正細菌・古細菌・真核生物の3超界間の近縁性は論じられてきた。だが遺伝子ごとに結果が矛盾し、明確な結論は出ていない。このことが、真核生物が真正細菌と古細菌の融合によって生じたとする考えの基盤ともなっている。一方、融合に加わった生物の詳細については、3超界それぞれが単系統になるため、2つの原核生物内のどの分類群なのかまでは特定できず、依然として類推の域を出ない。

本研究で着目したイオンポンプ・P型ATPaseスーパーファミリーは、基質や細胞内局在、あるいは保有する生物の分類群単位の特異性に合致する5ファミリー・11サブファミリーからなる。あらゆる生物に普遍的に存在するので、生物界全体の系統解析に利用可能であり、同時に特定の生物ゲノム中における各サブファミリーの保有状況が、各生物群間の近縁性に関する情報を与えてくれる。つまり二つの異なる視点から、系統進化に関する情報を得ることができる材料であり、このような特徴は他の機能タンパク質の分子ファミリーには見出されていない。

第二章

P型ATPaseにはスーパーファミリー全体を通じて保たれている構造上・配列上の特徴がある。例えば、センターループには自己リン酸化されるアスパラギン酸を含むモチーフがあり、これがスーパーファミリー全体で高度に保存されている。一方、サブファミリーごとの特異的なモチーフも存在する。主に後生動物に分布するタイプ2C(Na^+/K^+ -ATPase)では、P型ATPase中でも唯一、酵素活性を担う本体(α サブユニット)以外に、一回膜貫通型タンパク質の β サブユニットが存在し、 α サブユニット上の膜貫通領域M7—M8間にある[S-Y-G-Q/E]モチーフは両サブユニット間の会合部位で、脊椎動物では高度に保存されている。また α サブユニットのM1—M2間には、保存性の高いアミノ酸残基が複数存在し、ウバインなどの強心配糖体が結合して機能阻害を起こす。

本章では、線虫とショウジョウバエのアイソフォームを中心に、タイプ2C α サブユニットの分子系統解析と配列比較を行い、この2つの保存領域の獲得過程を推定した。結論として、タイプ2Cサブファミリーの祖先型酵素はこれらの領域を持っておらず、サブファミリー分岐後、後生動物の進化過程ではじめてそれらを獲得したと推定した。また、 β サブユニットの解析も行い、無脊椎動物には一部に進化速度の速いアイソフォームがあることや、脊椎動物においてサブユニット会合に必要とされるジスルフィド結合を欠く β サブユニットがショウジョウバエに存在することを見出した。これらの発見から本章では、一部の無脊椎動物型 β サブユニットが、会合を行わない別の機能タンパク質に進化している可能性を指摘し

た。

第三章

本章では真核生物の出現過程について、古細菌の P 型 ATPase に注目し、分子系統解析を行った。特に各サブファミリーごとの系統解析と、真正細菌・古細菌、真核生物の各分類群のサブファミリー分布の比較を通じて、P 型 ATPase の分子進化と真核生物の初期進化について、結論として以下のことを明らかにした。(1) P 型 ATPase スーパーファミリーの原型は、超好熱性始原菌も保有する重金属イオントランスポーター・タイプ 1B である。(2) 原核生物には無いと考えられてきた真核生物細胞膜型カルシウムポンプ・タイプ 2B は、一部の真正細菌にその起源をさかのぼることができる。一方、オルガネラ局在型カルシウムポンプ・タイプ 2A は小胞体局在型とゴルジ局在型の二つに別れ、その分岐は真核生物の成立前に完了していた。(3) 真核生物に特有のタイプ 4/5 は、やはり目下のところ原核生物における祖先型が一切見出されず、その起源が真正細菌と古細菌の分岐に近い辺りまでさかのぼることができる。(4) これまで後生動物に特有とみなされてきたタイプ 2C、植物・真菌等に特有とみられたタイプ 3A は、いずれも原核生物にその起源が見出され、特に一部のメタン生成古細菌がこれらサブファミリーに関して真核生物と近縁関係にある。以上の結果から、現生の真核生物は、真正細菌要素（タイプ 2B）、メタン生成古細菌要素（タイプ 2C/3A）、そのどちらでもない第 3 の要素（タイプ 4/5）の三つが融合して始めて成立すると結論付けた。特に第 3 の要素は、Pre-LECA と名づけた。

最後に、主に真菌内部の各門と後生動物・緑色植物、ならびにメタン生成古細菌のタイプ 2C・3A 保有の状況を比較して、真核生物の各大系統の起源と分岐について、二つの仮説の可能性を考察した。異なるメタン生成古細菌による同時並行的細胞融合が後の真核生物各系統の元となった可能性と、ただ一回の融合から全ての真核生物が始まった可能性、それぞれの是非を、今後の課題として提起した。

論文審査の結果の要旨

本論文は三つの章から構成され、主に系統解析データを元に、細胞融合による真核生物の誕生過程を解き明かすことを主題とした。第一章ではこの主題に関するこれまでの先行研究を整理し、著者の研究の意義付けを行った。真核生物の起源については、一部のオルガネラが細菌の共生体由来であることは明らかになったが、共生体を受け入れた細胞本体の由来が未解決である。この問題について、これまでの系統解析では真正細菌・古細菌・真核生物の 3 超界間の近縁性は論じることができても、その結果は遺伝子ごとに矛盾している。また 3 超界それぞれが単系統になるため、真正細菌あるいは古細菌の中の、どの系統が真核生物に近いのかまでは決定できない。

この問題点に有効な解答を与えうる材料として、本研究では P 型 ATPase スーパーファミリーを取り上げた。この分子ファミリーは、基質や細胞内局在、あるいは保有する生物の分類群単位の特異性に合致する 5 ファミリー・11 サブファミリーからなる。あらゆる生物に普遍的に存在するので、生物界全体の系統解析に利用可能であり、同時に、ゲノム中の各サブファミリー分布の比較からも、各生物群間の近縁性に関する情報が得られる。このような特徴は、今のところ他の機能タンパク質の分子ファミリーには見出されておらず、着眼点に相応の独創性が認められる。

第二章では、主題に先立ち、著者の行った P 型 ATPase の進化研究の一例を取り上げた。すなわち、後生動物に分布するタイプ 2C (Na^+/K^+ -ATPase) に特異的な形質であるサブユニット会合と阻害剤感受性の進化過程の解析である。著者は、線虫とショウジョウバエを中心としたタイプ 2C α サブユニットの系統解析と配列比較から、タイプ 2C の祖先型酵素はこれらの形質を持っておらず、サブファミリー分岐後、後生動物の進化過程ではじめてそれらの形質を獲得したと推定した。また β サブユニットの解析からは、無脊椎動物には一部に進化速度の速いアイソフォームが存在することを見出した。さらに、脊椎動物においてサブユニット会合に必要とされるジスルフィド結合を欠く β サブユニットがショウジョウバエに存在することから、一部の無脊椎動物型 β サブユニットが、会合を行わない別の機能タンパク質に進化している可能性を指摘した。これらは従来の生化学・分子生物学的なアプローチでは得られないユニークな結論であり、主題となる次章への発想の土台としても重要な意味を持つものと評価される。また本章の内容は、既に *The Journal of Membrane Biology* 第 191 巻第 1 号 13-24 頁 (2003 年) に論文として発表された。

第三章は本論文の主題である真核生物の起源と P 型 ATPase の進化を取り扱った。真核生物の出現過程について、古細

菌の P 型 ATPase を中心に、その他多くの真正細菌や真核生物もあわせて行われた系統解析と、真正細菌・古細菌・真核生物の各分類群のサブファミリー分布の比較から、P 型 ATPase スーパーファミリーの分子進化と、真核生物の初期進化について多くのデータを積み重ね、現生の真核生物は真正細菌要素（タイプ 2B）、メタン生成古細菌要素（タイプ 2C / 3A）、そのどちらでもない、Pre-LECA と名づけた第 3 の要素（タイプ 4 / 5）の三つが細胞融合して始めて成立すると結論付けた。

これまで提出されている仮説と比較して、古細菌要素がメタン生成菌であることを系統学的データで明確に絞り込んだ点、また、真正細菌でも古細菌でもない祖先型生物が存在した可能性を、同じく系統学的データで示した点は新しく、今後の同分野の研究に資するところは大きいものと考えられる。3 章の内容については、2004 年の *Genomes and Evolution*, 2006 年の 20th *IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology* といった国際学会で段階的に発表された。

一部にタイプ 2B を持つ真正細菌が確認されたという点をもとに、真正細菌と Pre-LECA の融合を論じるのは性急であるように感じる。しかし岡村氏は、データに基づけば今のところそのような解釈をせざるを得ず、またタイプ 2A も含めてカルシウムポンプが真核生物以前に分岐していたという可能性はありうると主張している。この議論は、岡村氏が独立した一人の研究者として、自ら問題を設定し、解析を行い、その結果に基づき論理を展開できる能力を、これまでの研究活動を通じて相応に身に着けた一つの例であり、本論文の全体を通じて、このことは遺憾なく発揮されている。他者の先行研究の報告を踏まえつつ、同時に、必要以上にそれらにとらわれることなく、独自の発想で研究を進めてきたことが、最終章やその後の問題提起などからも十分に認められ、博士の学位を取得するに足る資質を身に着けたものと考えている。

以上のように、本論文は多くのデータ解析と、その結果に裏打ちされた論理の積み重ねにより、この分野における極めて大きな命題について、独創的な仮説を提唱するものである。

よって本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また平成 18 年 6 月 26 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。