

全生物の共通の祖先の実験的検証

— 過去のタンパク質を再現する —

山 岸 明 彦*

Experimental Test on the Last Common Ancestor: Reproduction of the Ancient Proteins

Akihiko YAMAGISHI *

Abstract

The results of an experimental test for verifying the hypothesis that the common ancestor of all living organisms (universal ancestor, commonote) was a hyperthermophile (Miyazaki, *et al.*, 2001) are explained. In the experiment, mutant enzymes with ancestral aminoacids were made using a gene engineering technique. The mutant enzymes were purified and tested for thermostability. The mutant enzymes with ancestral aminoacids showed higher thermostability than the contemporary hyperthermophile enzyme. The results suggest that the common ancestor of all living organisms was a hyperthermophile. The argument related to the hyperthermophilic common ancestor hypothesis was reviewed with respect to the experimental test.

Key words: universal ancestor, common ancestor, commonote, hyperthermophile, experimental test

キーワード: 全生物の共通の祖先, コモノート, 超好熱菌, 実験的検証

1. はじめに

生物の遺伝子には過去の祖先の記録が保存されている。それは遺伝子が、親から子、子から孫へと代々伝えられていき、遺伝子の情報が祖先から受け継がれているからである。映画ジュラシックパークでは、琥珀の中に閉じこめられた恐竜の遺伝子から恐竜を生き返らせた。この時代の化石にDNAが現在も残っている可能性は大変低いので、実際にはこの計画は難しい。また、シベリアの氷付けのマンモスからDNAを抽出して、ゾウを遺伝子操作することによりマンモスを生き返らそうという計画が報道されたが、これも実現は難しいか

もしれない。

筆者は、それらよりもはるかに古い、今から38億年前に生きていたと推定されている全生物の共通の祖先生物を再生できないかと考えている。もちろん、共通の祖先生物そのものの再生は難しいが、遺伝子を幾つか再生することならば充分可能と考えている。本稿では、その方法を説明し、祖先生物型遺伝子から得られた結果について解説する。その結果は祖先の生物は超好熱菌であったという説を支持するものであった。

この解説を理解していただくためには、ごく基礎的な遺伝子に関する知識が必要となるので、最初の幾つかの章でそれを解説する。しかし最近、

* 東京薬科大学生命科学部分子生命科学科

* Department of Molecular Biology, Tokyo University of Pharmacy and Life Science

遺伝子に関する一般的解説書や、テレビ番組も多い。すでに遺伝子に関する十分な知識を持つ読者は、遺伝子に関する基本的な解説を読み飛ばしてほしい。

II. 分子系統樹作成法

1) 遺伝子とは DNA に書かれた文章

生物の子供が親に似ているのは、遺伝子が親から子へと伝えられていくためであることは現在では広く知られている。遺伝子の本体は DNA と呼ばれる非常に長い分子である。その分子の上には、4 種類の塩基と呼ばれる化合物（アデニン、チミン、グアニン、シトシン：それぞれ A, T, G, C と略記される）で遺伝情報が書かれている。これは、DNA の長い分子の鎖の上に、4 つの異なった文字（塩基）が、文章のように意味を持って並んでいることを意味している。それぞれの遺伝子は 150 文字から 2000 文字程度で書かれた一つの文書に相当する。遺伝子の数は、大腸菌の様な単純な生物では数千個、ヒトでは数万個ある。これらの遺伝情報は、それぞれの細胞の中に大切に保存されている。

DNA にかかれた遺伝子の情報は子供へ受け継がれるが、その情報はそのままでは機能は持たない。遺伝子が機能を発揮するためにはタンパク質に翻訳される必要がある。遺伝子の DNA に 4 つの文字（塩基）でかかれた文章は、翻訳されてタンパク質になる。タンパク質はアミノ酸が 50 から数百個つながってできている。一つながりのアミノ酸からなるタンパク質は、自動的にある決まった形となり、ある決まった機能を持って生物の細胞中で活動を始める。

実際、生物の細胞を詳しく調べると、それぞれに数千から数万種類のタンパク質が含まれている。それぞれの種類のタンパク質は、それぞれ決まった機能を持っている。たとえば、あるタンパク質はデンプンを分解する。あるタンパク質はエネルギーを得るために働く。あるタンパク質は筋肉の中で力を発生する。あるタンパク質は神経細胞で隣の神経細胞へ信号を伝えるために働く。しかし、ここで非常に重要なことは、遺伝子にはアミノ酸

の並び順を決める情報が遺伝暗号で DNA に記録されているという点である。

2) 現存する生物の遺伝子を解析することから進化系統樹を作成することができる

さて、図 1A にはヒト、ウマ、コイの 3 種の生物のヘモグロビンというタンパク質の遺伝子の一部分が図示してある。遺伝子は DNA にかかれた 4 文字の暗号であるが、図 1A にはそれをアミノ酸配列に翻訳したものを書いてある。アミノ酸の並び順をアミノ酸配列と呼んでいる。ヘモグロビンというのは動物の赤血球の中にある赤い色をしたタンパク質の名前である。このタンパク質は酸素と結合したり離れたりする性質を持っている。肺の中で酸素と結合し、酸素を体の隅々まで運ぶ働きをしている。アルファベットの文字はそれぞれ 20 種類のアミノ酸のひとつひとつを表している。たとえば、ヒトのヘモグロビンはバリリン (V), ロイシン (L), セリン (S), プロリン (P) という名前のアミノ酸が順に結合しているということを表している。しかし、今はこれを単なる文字と考えてもらって全くかまわない。

つぎに、ヒトの遺伝子とウマの遺伝子の比較をすると、二つの遺伝子で文字の並びかたは大変似ていることがわかる。これはヒトとウマのヘモグロビン遺伝子が、共通の祖先生物が持っていたヘモグロビン遺伝子に由来していることを示している。さらに、これらの遺伝子をコイのヘモグロビン遺伝子と比較すると、コイの遺伝子もヒトやウマの遺伝子に似ているが、似ている程度は低いことがわかる。これは、図 1B の様な進化系統樹を考えることによって理解できる。すなわち、コイがまず他の二つの生物と別れ、その後しばらくしてヒトとウマが分かれたと考えるのである。すると、コイが二つの生物と分かれてから時間がたっているので、ヒトとウマと間の違いに比べて、コイの配列の違いが大きくなっていると考えられる。このように、遺伝子上のアミノ酸の配列を比べて、生物の進化系統樹を作成することができる。実際には統計的手法を用いて遺伝子のアミノ酸配列から系統樹を作成する（根井, 1990; 山岸・横堀, 1998）。できあがった系統樹のことを分子系統樹

A

ヒト VLSPADKTNVKAAWGKVGAGHAGEYGAEALERMFAPPTTKTYFPHF
ウマ VLSAADKTNVKAAWSKVGGHAGEYGAEALERMLGFPTTKTYFPHF
コイ SLSDKSKAIVKIAWAKISPKADDIGAEALGRMLTVYPQTKTYFAHW

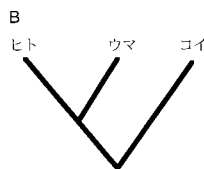


図 1 A) 3 種の生物のヘモグロビン遺伝子に記録されているアミノ酸配列 (並び順) の一部。
それぞれの文字は 20 種のアミノ酸の一つを表す。
B) 3 種の生物のヘモグロビン遺伝子のアミノ酸配列から予想される、生物の進化系統樹。

Fig. 1 A) Parts of amino acid sequences of hemoglobin genes from three organisms: Human, horse and carp form top to bottom.
B) A phylogenetic tree inferred from the sequences shown in panel A.

と呼ぶ。

どのような遺伝子でも、系統樹作成に用いることが可能であるが、リボソーマル RNA 遺伝子という遺伝子が最も頻りに系統樹の作成に用いられている。それは、以下のような理由によっている。すなわち、1) この遺伝子はタンパク質を細胞内で合成するという非常に重要な機能を担っていることで、すべての生物がこの遺伝子を持っていること、2) またすべての遺伝子で全く同じ機能を持っていること、3) 遺伝子の進化の速度が遅いので非常に古い時代に分岐した生物の系統解析にも用いることができる、というような理由である (Woese, 1987; 山岸, 1998)。

III. 全生物の共通の祖先

1) 全生物の進化系統樹

図 2 には、地球上で知られている全生物の進化系統樹を示した。この系統樹はリボソーマル RNA 遺伝子に基づいて作成された。図の一番下が生命の起原である。誕生した生命は、図でコモノート

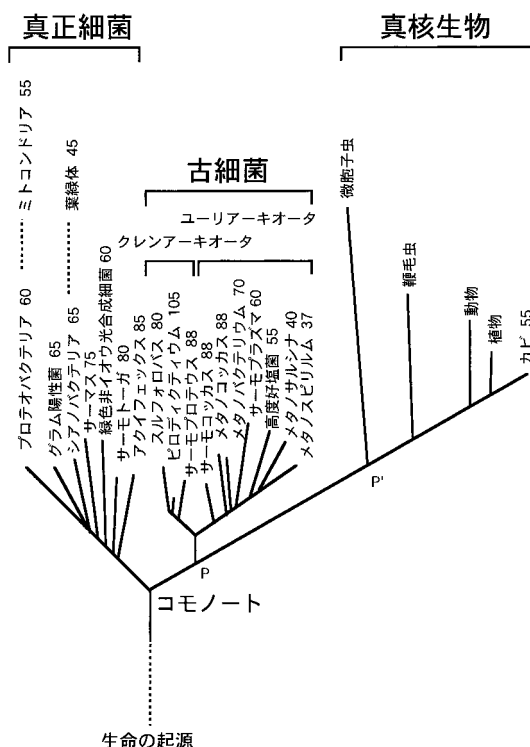


図 2 全生物の進化系統樹。

16SrRNA の配列に基づき基本的な系統樹が作製された (Woese *et al.*, 1990)。その系統樹にそれぞれの生物あるいは生物群の中で最も生育温度の高い生物の生育温度を記入した (Yamagishi *et al.*, 1998)。

Fig. 2 General phylogenetic tree inferred from 16SrRNA genes of all living organisms on the earth (Woese *et al.*, 1990). The figure after each species name represents the optimal growth temperature of the species. Alternatively, the figure after each species group represents the optimal growth temperature of the species with the highest growth temperature in the group (Yamagishi *et al.*, 1998).

と書いてある所までは、一種類であった。今日知られている全生物が共通の遺伝暗号と遺伝の仕組みを持つことから、全生物は一つの共通の祖先に由来していると考えられている。共通の祖先 (コモノート) から、生物は二つのグループに分かれた。その一方は、現在の真正細菌になった。真正細菌とは良く知られている細菌 (バクテリア) の仲間

のことである。たとえば、プロテオバクテリアというのはグラム陰性菌とも呼ばれ、大腸菌の仲間である。また、グラム陽性菌は、納豆をつくるのに使われる枯草菌という菌の仲間である。シアノバクテリアは光合成をする微生物で、あまりきれいでない湖の表面に浮いているアオコの仲間である。

全生物の他方の枝は点 P でさらに二つに分岐する。その一方は真核生物になった。真核生物は我々ヒトを含む最も見慣れた生物のグループである。一番右の端には動物、植物、カビの枝がある。全生物の進化の観点から見れば、これらの生物はごく近い親戚の生物であり、ほんの最近になって分かれたことがわかる。鞭毛虫や微孢子虫は単細胞の原生動物で、単細胞ではあるが立派な真核生物の仲間である。

さて、残った真ん中の枝は古細菌と呼ばれる生物群である(古賀・亀倉, 1998)。この生物群は 1977 年になってやっとその存在が明らかになった (Woese and Fox, 1977)。メタノコッカス、メタノバクテリウムなどの生物はメタン菌と呼ばれる生物である。メタン菌は腐った沼や池でメタンガスを発生する生物である。高度好塩菌は塩田など非常に高い塩濃度の環境に生育する生物である (亀倉, 2003)。これらの生物は古細菌の中でもユーリアーキオータと呼ばれている。残りのクレンアーキオータの生物は、温泉などのイオウに富

んだ高熱環境にすむ、イオウ依存性好熱菌と呼ばれる生物である。

2) 生物進化の分岐年代

生物の進化系統樹はどの生物がどの生物よりも早く分かれたか、という相対的な分岐年代を与えるが、絶対的な分岐年代は与えない。そこで、化石でわかっている生物の分岐年代を基準にして、遺伝子の進化の速度を推定して、それ以前に分岐年代の推定を行う。

しかし、遺伝子の進化の速度は生物によっても、遺伝子の種類によっても異なっている。たとえば、図 2 の系統樹のたくさんの枝の一番端が現在に相当する。それぞれの枝の長さは異なっているため、何となく奇妙ではあるが、これは遺伝子の進化の速度が生物によって異なっていることによっている。また、進化の速度は各遺伝子によっても異なっている。そこで、多数の遺伝子の系統樹を作成してそれを平均化することから、より信頼度の高い分岐年代の推定が行われた (Feng *et al.*, 1997)。表 1 にはこうして推定された生物の分岐年代がまとめられている。

たとえば、ウニの仲間(棘皮動物)が我々と分かれたのは今から 5.9 億年前である。カビ、植物、動物はほぼ同じ頃、今から約 12 億年前に分岐した。真核生物の誕生は今から 24 億年前であった。この推定でいくと、古細菌と真正細菌が分岐したのは今から約 38 億年前と推定された。この推定そのも

表 1 生物の分岐年代の推定値 (Feng *et al.*, 1997 より)。

Table 1 Divergence times from extrapolation and phylogeny (Feng *et al.*, 1997).

生物群	推定分岐年代 (億年)
棘皮動物 / 脊索動物	5.9
後口動物 / 前口動物	8.5
裂体腔動物 / 偽体腔動物	10.5
カビ / 動物	11.3-12.7
植物 / 動物	12.0-12.2
原生動物 / 後生動物	15.5
古細菌 / 真核生物	24.1
古細菌 / 真正細菌	37.8 (33-40)

の信頼度はそれほど高くなく、分岐年代は33–40億年前の範囲である。しかし、地球の誕生したのは今から45億5000万年前、地球最古の細胞の化石が約35億年前、生物に由来する炭素の同位体分析結果が38億年前の岩石から得られているので、地球誕生後5億年ほどで生命が誕生したと考えられている(山岸, 2002)。共通の祖先の分岐年代はこうした化石から得られた結果と矛盾しない。

3) 共通の祖先の性質

系統樹を遡ると、一番最初に真正細菌と古細菌が分岐する点が全生物の共通の祖先である。一番単純には真正細菌と古細菌の両方が持っている性質は共通の祖先も持っていたのではないかという考えかたが成り立つ。たとえば、この両者の生物が持っている共通の点をまとめて考えるならば以下のような共通の祖先の性質が浮かびあがる。すなわち、大きさは1 μ m程度の球形か棒状の単純な形を持ち、遺伝物質としてはDNAを持ち、それからタンパク質合成を行うという現在の遺伝子の仕組みをすでに持っていたと考えることが可能である(Yamagishi *et al.*, 1998)。

4) 全生物の共通の祖先超好熱菌説

また、何人かの研究者は共通の祖先は超好熱菌であったのではないかと考えている。好熱菌研究の草分け Brock は、その総説の中で「祖先型の生物が好熱菌かどうかはわからない」と記述することから、生物の祖先がひょっとすると好熱菌かもしれないという可能性をにおわせた(Brock, 1985)。Woese は様々な微生物のリボソーマル RNA の遺伝子の解析を精力的に進めた。かれは、系統樹の中で好熱菌の枝の長さが短いことから、好熱性は原核生物の祖先的性質であるという指摘を行った(Woese, 1987)。

その後、超好熱性の真正細菌のリボソーマル RNA の遺伝子が研究された。超好熱性の真正細菌の遺伝子が真正細菌の系統樹の根本から分岐していることがわかり、Pace らは全生物の共通の祖先は超好熱菌なのではないかという提案を行った(Pace, 1991)。Yamagishi らも、図2のように、根本付近の生物の生育至適温度は大変高いが、根本から遠ざかるに従ってだんだんと至適生育温度

が下がっていくことから、生物の共通の祖先超好熱菌説を支持した(Yamagishi *et al.*, 1998)。

5) 共通の祖先超好熱菌説を巡る議論

しかし、共通の祖先「超好熱菌説」には様々な立場からの反論がある。Millar らは、生体関連物質が高温では不安定であるために、少なくとも生命の起原は高温環境下ではあり得ないと主張している(Miller and Lazcano, 1995)。しかし、この議論は生命の起源に関するもので、Millar も書いているように、共通の祖先に関してはそれとは独立に議論できる。

Forterre は別の立場から議論をしている。つまり、全生物の系統樹を書いて、その根元に超好熱菌がきたとしても、そのことは必ずしも共通の祖先が超好熱菌だということを意味しないという主張である(Forterre, 1996)。それは、生物が分岐してその後に超好熱菌が選択されたとすれば、分岐の根本付近に超好熱菌が多いことが説明できるというのである。つまり、根本付近の生物が分岐してその当時までに超好熱菌が誕生してればよいので、その元となる共通の祖先は常温菌であってもかまわないという指摘である。

もっとはっきりとした反論は Galtier によってなされた。かれは、全生物の共通の祖先のリボソーマル RNA 遺伝子の G + C 含量を推定した。遺伝子の中には GC の組み合わせと、AT の組み合わせがあるが、GC の組み合わせの比率は生物によって異なっている。そして、リボソーマル RNA 遺伝子の G + C の含量が生物の生育温度と良い相関関係を持っていることが知られている。Galtier がある進化モデルに従って推定した共通の祖先のリボソーマル RNA 遺伝子の G + C の含量は大変低く、共通の祖先が超好熱菌とは考えられないという結果であった(Galtier *et al.*, 1999)。

IV. 全生物の共通の祖先超好熱菌説の実験的検証

1) 共通の祖先のアミノ酸推定法

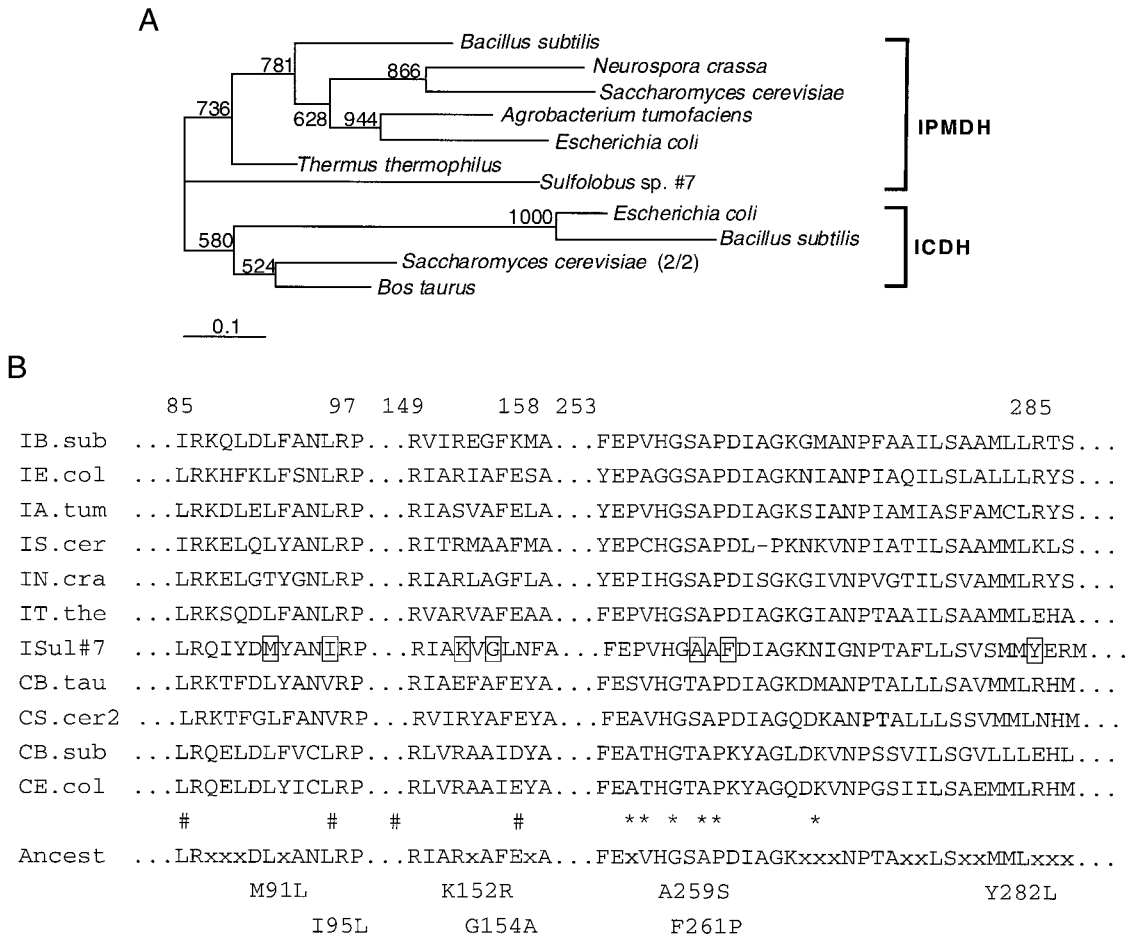
以上のような議論はいずれも、現存する生物の遺伝子の情報からの類推にすぎない。そこで、「共通の祖先が超好熱菌」かどうかを実験的に検証す

ることを考え、筆者らのグループはその方法を考案した (Miyazaki *et al.*, 2001)。この方法では、まず研究対象とする遺伝子を決め、その遺伝子の系統樹を作成する。次いで、その系統樹に基づいて共通の祖先が持っていた遺伝子の配列を推定する。その後、その配列を部分的に持つ遺伝子を合成して、その遺伝子からできる酵素タンパク質の性質を調べるという方法である。ここで以下で研究に用いたタンパク質は酵素タンパク質であるが、生体内での反応触媒に関与しているタンパク質を酵素タンパク質あるいは単に酵素と呼んでいる。

まず、実験材料とする酵素タンパク質の系統樹を作成した (図 3A)。この系統樹は互いに似た二つの酵素タンパク質の系統樹である。図 3A の系

統樹の上半分はイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH)、下半分はイソクエン酸脱水素酵素 (ICDH) という酵素についての系統樹である。これら二つの酵素タンパク質は、配列が似ており、共通の祖先の酵素タンパク質から分岐進化したと考えられている。図 3A の一番左が、共通の祖先の酵素に対応している。つまり、この系統樹の一番左の遺伝子のアミノ酸配列が全生物の共通の祖先の持っていた酵素タンパク質のアミノ酸配列ということになる。

図 3B には図 3A の系統樹作成に用いた、いろいろな生物の持つ酵素タンパク質のアミノ酸配列を並べてある。これらの配列を比較することによって、共通の祖先のタンパク質が持っていた配列を



推定することができる。たとえば、97 番目のアミノ酸のように、すべての生物が同じアミノ酸を持っているときには、共通の祖先のタンパク質もそのアミノ酸を 97 番目に持っていたと推定できる。しかし、生物によってアミノ酸が異なっている場合には図 4 のような方法でその祖先型アミノ酸を推定できる。図 4 の枝の右側に書いてあるのは、現存する酵素タンパク質で 152 番目の位置にあるアミノ酸である。二つの隣あった枝のアミノ酸が同じアミノ酸（たとえば R と R）を持つ場合にはその二つの共通の祖先が持つアミノ酸も同じ（R）であろうと推定できる。もし二つが別々（R と S）のアミノ酸を持っているときにはどちらが祖先型であるのか決定できない。しかし、さらに

枝をたぐって第 3 の枝の生物が R を持っている場合には、その祖先は R を持っていたのでであろうと推定できる。こうして、この図 4 の一番左の位置の祖先型生物が持っていたアミノ酸は R である、と推定できることになる。このように、系統樹の枝をトーナメント方式で遡っていくことによって、全生物の共通の祖先の持っていた酵素タンパク質のアミノ酸配列を推定できる。こうして推定されたアミノ酸配列が、図 3B の配列の最も下の行に書いてある。この配列を現存する生物の酵素と比較すると、祖先型のアミノ酸配列が現存する酵素にも保存されていることがわかる。しかし、すべてではなく、それぞれの酵素で、祖先型アミノ酸と異なっているものももちろんある。

図 3 A) 二つの酵素タンパク質 (IPMDH, イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素; ICDH, イソクエン酸脱水素酵素) の進化系統樹 (Miyazaki *et al.*, 2001)。

系統樹の左端が全生物の共通の祖先が持っていた祖先型酵素タンパク質に相当する。祖先型酵素から酵素は二つ (IPMDH と ICDH) に分かれた。その後、種々の生物に分岐した。個々の生物種については B の注参照。

B) 各種の生物の酵素タンパク質のアミノ酸配列の比較 (Miyazaki *et al.*, 2001)。

それぞれの行が酵素タンパク質のアミノ酸配列を示す。上の 7 行 (先頭の文字が I) はイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素、下の 4 行 (先頭の文字が C) はイソクエン酸脱水素酵素。その後の 4 文字で生物種を表している。真正細菌 (B. sub, *Bacillus subtilis*, 枯草菌; E. col, *Escherichia coli*, 大腸菌; A. tum, *Agrobacterium tumefaciens*, アグロバクテリア; T. the, *Thermus thermophilus*, 好熱菌), 真核生物 (S. cer, *Saccharomyces cerevisiae*, 酵母; N. cra, *Neurospora crassa*, 粘菌; B. tau, *Bos taurus*, ウシ), 古細菌 (Sul #7, *Sulfolobus* sp. #7, 超好熱菌)。一番上の行の数字は最初から何番目のアミノ酸かということを示す。# や * 印は触媒反応に重要なアミノ酸を表す。Ancest の行は推定された全生物の共通の祖先が持つ祖先型酵素のアミノ酸配列。X で示したところは正確な推定ができなかったアミノ酸。一番下の 2 行は ISul #7 のアミノ酸配列を祖先型にするときに変化させたアミノ酸で、ISul #7 の配列中では四角で囲んである。

分岐点の 3 桁の数字はブートストラップ確率で、用いられたデータの一部分をランダムにサンプリングして 1000 回計算したときに同じ分岐点を得られる確率、すなわち系統樹の分岐点の確かさを表す。

0.1 のスケールはアミノ酸部位あたりの変異度を現す。

Fig. 3 A) A phylogenetic tree of two enzymes (IPMDH isopropylmalate dehydrogenase, and ICDH isocitrate dehydrogenase) (Miyazaki *et al.*, 2001).

The far left node represents the ancestral enzyme of the common ancestor. Two enzymes (IPMDH and ICDH) were derived from the common ancestral enzyme. The enzymes of contemporary species were diverged from the ancestral enzyme. Abbreviations of the species names are shown in the legend to panel B.

B) Comparison of partial amino acid sequences of enzymes of several species (Miyazaki *et al.*, 2001).

Each line represents the amino acid sequence of each enzyme. The seven upper sequences with a name starting with the letter I represent isopropylmalate dehydrogenase. The lower four sequences with a name starting with the letter C represent isocitrate dehydrogenase. Abbreviations of the species names are as follows: Eubacteria (B. sub, *Bacillus subtilis*; E. col, *Escherichia coli*; A. tum, *Agrobacterium tumefaciens*; T. the, *Thermus thermophilus*), Eukaryotes (S. cer, *Saccharomyces cerevisiae*; N. cra, *Neurospora crassa*; B. tau, *Bos taurus*), Archaeon (Sul #7, *Sulfolobus* sp. #7). The figures at the top represent positions in the sequences. The marks, # and *, represent amino acids that are important for catalytic activity. The sequence denoted by Ancest represents the sequence of the ancestral enzyme possessed by the common ancestor. The letter "x" represents the ancestral amino acid residue which could not be inferred. Two lines at the bottom represent the mutations introduced to the ISul #7 sequence, which are also boxed in the ISul #7 sequence.

Figures at branching points represent bootstrap values estimated by calculating for 1000 repetitions of resampling. The scale bar represents 0.1 substitutions per amino acid position.

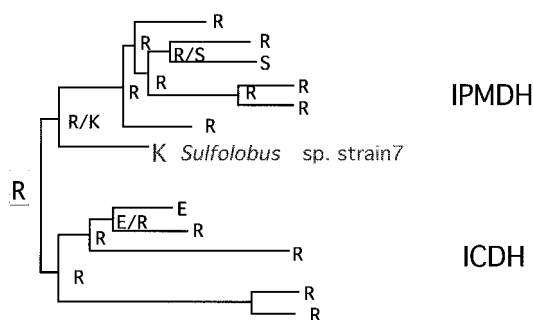


図 4 図 3A の系統樹を用いた 152 番目のアミノ酸の祖先型の推定法 (Miyazaki *et al.*, 2001). 系統樹の枝の右端が現存する生物に対応しているが、その位置にそれぞれの生物が持つ酵素の 152 番目のアミノ酸を記してある。右端からトーナメント方式で共通の祖先が持つアミノ酸を左へ向けて順次推定していく。左端で表される位置が全生物の共通の祖先で、祖先の酵素タンパク質の 152 番目が R であると推定される。

Fig. 4 Method of inferring the ancestral amino acid at the position 152 using the phylogenetic tree shown in Fig. 3A (Miyazaki *et al.*, 2001). Letters at the far right position of respective branches represent the amino acids at the position 152 in the enzymes of respective species of the corresponding branches shown in Fig. 3A. The ancestral residues were inferred from right to left following the branches. The far left node represents the common ancestor of all living organisms, and the ancestral amino acid at the position 152 in the ancestral enzyme was inferred to be R.

2) 共通の祖先のアミノ酸配列を持つタンパク質の作成法

さて、共通の祖先「超好熱菌説」を検討するために、筆者らのグループは超好熱性の古細菌 *Sulfolobus tokodaii* の酵素 (イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素) を出発材料として用いることにした (Miyazaki *et al.*, 2001)。この古細菌の酵素は系統樹の根本から枝分れしている。すなわち、もともと共通の祖先に近いタンパク質と考えられる。また、これまで、その耐熱性が確かめられたイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の中で最も高い耐熱性を持つ酵素である (Suzuki *et al.*, 1997)。この

ような理由から、この酵素タンパク質を土台として、祖先型アミノ酸の影響を調べることにした。

この超好熱菌の酵素の配列を祖先型のアミノ酸と比較すると、大部分のアミノ酸は保存されているが、幾つかのアミノ酸が祖先型とは異なっていることがわかる。そこで、超好熱菌のタンパク質のアミノ酸で祖先型と異なっているものを祖先型へ人為的に変化させた。一番下の欄の記号は、どのアミノ酸を何のアミノ酸に変換するのかを記載している。たとえば、M91L は最初のアミノ酸から数えて第 91 番目のアミノ酸はメチオニン (M) なのだが、それをロイシン (L) に変換するということを示す表し方である。同様に、I95L, K152R, G154A, A259S, F261P, Y282L は、最初のアミノ酸から数えて数字で示した位置のアミノ酸 (そのアミノ酸の種類を最初のアルファベットで表している) を最後のアルファベットのアミノ酸に変換するということを意味している。ただし、互いに近い位置にあるアミノ酸 (たとえば、91 番目のアミノ酸と 95 番目のアミノ酸) はお互いに影響を与えあうことが知られているので、二つを同時に変えることにした。同様に、152 番目と 154 番目、259 番目と 261 番目の二つのアミノ酸はそれぞれ同時に変換した。

実際には、こうした変換は遺伝子上の DNA の塩基を遺伝子操作技術を用いて変換することによって行う。次いで、遺伝子工学的に作成した変異型の遺伝子を大腸菌の中へ導入し、大腸菌を操作することによって、大腸菌内で遺伝子からタンパク質を作らせることができる。遺伝子操作によって作成した祖先型アミノ酸を含むタンパク質も大腸菌の中で作らせる。大腸菌の中にはもちろん、大腸菌そのもののタンパク質が大量に含まれているので、カラムクロマトグラフィーという技術を用いて、目的のタンパク質だけを精製する。

3) 共通の祖先のアミノ酸配列を持つタンパク質の性質

次いで、精製したタンパク質の性質を調べた。酵素タンパク質は温度が低いときには、本来の構造を持って、酵素活性を示す。しかし、卵の白身や黄身、魚を熱すると白く変色して固まるように、

表 2 超好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* の野生型イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素と祖先型のアミノ酸を含む変異型の酵素の耐熱性の比較 (Miyazaki *et al.*, 2001)

Table 2 Thermal stability of the wild type and mutants of *Sulfolobus tokodaii* isopropylmalate dehydrogenase (Miyazaki *et al.*, 2001)

	蛋白質が変性する温度 ()
野生型の酵素蛋白質	96.0 (0.0)
変異型-a (M91L/I95L)	99.2 (+ 3.2)
変異型-b (K152R/G154A)	97.2 (+ 1.2)
変異型-b' (K152R)	95.6 (- 0.4)
変異型-b' (G154A)	97.9 (+ 1.9)
変異型-c (A259S/F261P)	97.1 (+ 1.1)
変異型-d (Y282L)	94.7 (- 1.3)
変異型-abcd (M91L/I95L/K152R/G154A/A259S/ F261P/Y252L)	96.4 (+ 0.4)

普通のタンパク質は熱を加えられると本来の構造を失ってしまう。この現象は、変性と呼ばれている。表 2 には、酵素タンパク質が変性する温度を示してある。括弧内はもとのタンパク質の変性温度との差を示してある。もとの超好熱菌の酵素タンパク質は 96 で変性するのに対して、変異型-b (K152R/G154A), 変異型-b' (G154A), 変異型-c (A259S/F261P), 変異型-abcd (M91L/I95L/K152R/G154A/A259S/F261P/Y282L), の 5 つの変異型タンパク質は変性温度が上昇しており、耐熱性があがったことがわかる。つまり祖先型のアミノ酸は、現存する超好熱菌酵素の耐熱性をさらにあげる効果を持っていた。この結果は、祖先型の酵素タンパク質の耐熱性が現在の超好熱菌よりも高かったことを示している。従って、「全生物の共通の祖先が超好熱菌である」という仮説を支持している (Miyazaki *et al.*, 2001)。

V. まだ残る共通の祖先を巡る様々な問題点

さて、それではこの結果に基づけば、以前の「共通の祖先超好熱菌説」に対して提案されていた様々な反論はどう考えたら良いだろう。まず、Miller の主張 (Miller and Lazcano, 1995) は生

命の起原に関する事なので、今回の結果とは全く矛盾しない。すなわち、生命の起原が低温であっても、その後、高温に適応した種が誕生して、それが共通の祖先になったと考えれば良いわけである。そんな都合の良いことがあるのか、という反論もまたあり得る。しかし、地球が誕生した今から 45.5 億年前からまだ間もない時期にはまだ隕石が地球への衝突を繰り返していた可能性が高い。大きな隕石の衝突によって地球表面の温度が高くなりすぎれば、いったん誕生した生命もすべて死滅してしまう。しかし、最後の隕石の衝突後の高温の地球を超好熱菌だけが生きながらえたと考えれば、低温の生命の起源 (低温に限定する必要はなく、べつに議論すべきではあるが) と、高温の共通の祖先は矛盾しないことになる。こうした、超好熱性の共通の祖先が隕石の衝突により選択されたという考えは、Gogarten らによって提案されている (Gogarten-Boekels *et al.*, 1995)。

つぎに、好熱性の超好熱菌は非好熱性の共通の祖先から生物が分化した後で選択された可能性を指摘した Forterre (1996) の考えはどうだろうか。我々の実験結果は、共通の祖先非好熱菌説に対してははっきりと否定している。すなわち、もし、

共通の祖先が非好熱性であるならば、系統樹上の異なった生物に保存されているアミノ酸は（偶然一致したのでなければ）もとの共通の祖先生物の持っていたアミノ酸であるので、そのアミノ酸を酵素に導入すれば耐熱性はむしろ低下することが予想される。今回、それと全く逆の結果が得られたのである。

Gartier の G + C 含量の推定結果 (Galtier *et al.*, 1999) に関しては、そもそもの祖先型リボソーム RNA の推定法に問題がある可能性が高い。彼らの推定に従うならば、超好熱性の生物のほうが rRNA の遺伝子はむしろ大きく変化していなければならない。しかし、図 2 の系統樹を見ると明らかなように超好熱菌の rRNA の遺伝子は系統樹の根本にある、つまり、配列的にはあまり共通の祖先から変化していないことを意味している。そもそも、彼らが採用した共通の祖先の rRNA 遺伝子の G + C 含量の推定法の妥当性の検討が必要なのではないかと思う。

さらに、全生物の共通の祖先は実際にいたのかという反論も出されている。たとえば、Doolittle は一種類の共通の祖先というのは考えられないのではないかと主張している (Doolittle, 1999)。図 1 に示したような系統樹はリボソーム RNA という遺伝子の系統解析から得られたものであるが、それ以外の遺伝子を解析すると異なった系統樹がたくさんできてしまうからである。つまり、共通の祖先は複数いたのではないかという考えである。また関連した指摘で、進化の初期において遺伝子の水平移動が頻繁におきたので、現在の遺伝子を解析してもそのころのことをきちんと理解することはできないのではないかという指摘も同時に行われている。

こうした指摘に対してまず、今回の結果は研究に用いた一つのタンパク質に関する結果であるという点を確認する必要がある。従って、今回材料として用いたタンパク質を持っていた祖先生物はおそらく超好熱菌であったと推定できる。しかし、もし複数の共通の祖先生物がいたのだとすると、現存の様々な遺伝子は異なった祖先生物に由来している可能性を持つことになる。従って、今回の

結果は研究に用いたタンパク質を持っていた共通の祖先は超好熱菌であったということはいえるが、他のタンパク質に関してはまた別に確かめるための実験が必要になる。そこで現在、ほかの祖先生物がどうであったのかという検証を、他のタンパク質を材料として実験を進めることによって行っている。

ごく最近 Philippe らは、系統樹の作成法そのものに対して疑問を投げかけている (Brochier and Philippe, 2002)。遺伝子の配列には進化速度の速いところと遅いところがあることは良く知られている。彼らは、それを考慮した系統樹を作成した。すると超好熱菌は系統樹の根本にはこないという結果を出している。しかし、彼らは特殊な計算法を用いて系統樹を推定しているので、今後その方法による系統樹推定の妥当性が検討されるまではその結果の信頼度は未定である。

VI. 最 後 に

本稿では、現存する生物の持つ遺伝子の情報を解析することから、分子進化系統樹を作成する方法、その系統樹に基づいて、全生物の共通の祖先が持っていた遺伝子の性質を推定する方法について紹介した (Miyazaki *et al.*, 2001)。ある一つの遺伝子を材料として祖先型のアミノ酸の効果を検討した結果、共通の祖先生物が超好熱菌であるという仮説を強く支持する結果が得られた。しかし、生物の共通の祖先に関しては、その性質に関する議論だけでなく、そもそも一種類の共通の祖先に反対する主張など多くの議論が続いている。我々は、今回開発した方法を用いて、まだ未解決の共通の祖先を巡る諸問題を実験的に検討していく予定である。また、この方法は、全生物の共通の祖先だけではなく、それ以降の様々な時代の生物の遺伝子を推定して、実験的に検証する方法でもある。ちなみに、全生物の共通の祖先生物に関する実験的検証を行ったのは我々が最初であるが、ごく最近の時代の祖先生物に関しては、すでに幾つかのグループが実験結果を提出していることを付記しておく (Malcolm *et al.*, 1990; Jermann *et al.*, 1995; Stewart, 1995)。

文 献

- Brochier, C. and Philippe, H. (2002) A non-hyperthermophilic ancestor for Bacteria. *Nature*, **417**, 244.
- Brock, T.D. (1985) Life at high temperatures. *Science*, **230**, 132–138.
- Doolittle, W.F. (1999) Phylogenetic classification and the universal tree. *Science*, **284**, 2124–2128.
- Feng, D.-F., Cho, G. and Doolittle, R.F. (1997) Determining divergence times with a protein clock: Update and reevaluation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13028–13033.
- Forterre, P. (1996) A hot topic: The origin of hyperthermophiles. *Cell*, **85**, 789–792.
- Galtier, N., Taurasse, N. and Gouy, M. (1999) A nonhyperthermophilic common ancestor to extant life forms. *Science*, **283**, 220–221.
- Gogarten-Boekels, M., Hilario, E. and Gogarten, J.P. (1995) The effects of heavy meteorite bombardment on the early evolution—The emergence of the three domains of life. *Ori. Life Evol. Biosphere*, **25**, 251–264.
- Jermann, T.M., Opitz, J.G., Stackhouse, J. and Benner, S.A. (1995) Reconstructing the evolutionary history of the artiodactyl ribonuclease superfamily. *Nature*, **374**, 57–59.
- 亀倉正博 (2003) 地下岩塩中の微生物. 地学雑誌, **112**, 262–276.
- 古賀洋介・亀山正博編 (1998) 古細菌の生物学. 東京大学出版会.
- Malcolm, B.A., Wilson, K.P., Matthews, B.W., Kirsch, J.F. and Wilson, A.C. (1990) Ancestral lysozymes reconstructed, neutrality tested, and thermostability linked to hydrocarbon packing. *Nature*, **345**, 86–89.
- Miller, S.L. and Lazcano, A. (1995) The origin of life—Did it occur at high temperature? *J. Mol. Evol.*, **41**, 689–692.
- Miyazaki, J., Nakaya, S., Suzuki, T., Tamakoshi, M., Oshima, T. and Yamagishi, A. (2001) Ancestral residues stabilizing 3-isopropylmalate dehydrogenase of an extreme thermophile: Experimental evidence supporting the thermophilic common ancestor hypothesis. *J. Biochem.*, **129**, 777–782.
- 根井正利著, 五條堀孝・斎藤成也共訳 (1990) 分子進化遺伝学. 培風館.
- Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press.
- Pace, N.R. (1991) Origin of life: Facing up to the physical setting. *Cell*, **65**, 531–533.
- Stewart, C.-B. (1995) Active ancestral molecules. *Nature*, **374**, 12–13.
- Suzuki, T., Inoki, Y., Yamagishi, A., Iwasaki, T., Wakagi, T. and Oshima, T. (1997) Molecular and phylogenetic characterization of isopropylmalate dehydrogenase of a thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. *J. Bacteriol.*, **179**, 1174–1179.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, **51**, 221–271.
- Woese, C.R. and Fox, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5088–5090.
- Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4576–4579.
- 山岸明彦 (1998) 生物の系統関係と共通の祖先. 古賀洋介・亀倉正博編: 古細菌の生物学. 東京大学出版会, 16–39.
- 山岸明彦 (2002) 原始地球環境と化学進化. 石川統編: 生命環境科学 環境と生物進化. 日本放送出版協会, 17–26.
- 山岸明彦・横堀伸一 (1998) 遺伝子分析による脂質合成系進化の解析. 日本油化学会誌, **47**, 997–1003.
- Yamagishi, A., Kon, T., Takahashi, G. and Oshima, T. (1998) From the common ancestor of all living organisms to protoeukaryotic cell. In Wiegell, J. and Adams, M.W.W. eds.: *Thermophiles: The Keys to Molecular Evolution and the Origin of Life?* Taylor & Francis Ltd., 287–295.

(2003年2月14日受付, 2003年4月5日受理)