

アメリカムラサキウニのアルギニンキナーゼの酵素活性と無細胞タンパク質合成
Enzyme activity and cell-free protein synthesis of arginine kinase
from *Stongylocentrotus purpuratus*.

土居 真侑子・丁野可愛・鈴木知彦
Mayuko Doi, Kaai Chouno and Tomohiko Suzuki

〒780-8520 高知市曙町 2-5-1
高知大学理工学部比較生化学研究室
Laboratory of Comparative Biochemistry, Faculty of Science and Technology, Kochi
University, Kochi 780-8520 Japan

Key Words; guanidino kinase, phosphagen kinase, arginine kinase, *Stongylocentrotus purpuratus*, cell-free protein synthesis.

要約

グアニジドキナーゼ (GuaK) は、ATP のリン酸基をグアニジド化合物に転移させ、ADP とリン酸化された高エネルギーグアニジド化合物 (フォスファゲン) を生成する反応を可逆的に触媒する酵素である。アメリカムラサキウニ (*Stongylocentrotus purpuratus*) は GuaK として、クレアチンキナーゼ (CK) と 2 種類のアルギニンキナーゼ (AK1, AK2) を発現している。この内、AK1 は、他の GuaK と比較すると C 末端側に 50 アミノ酸の伸長配列を持ち、その末端にはプレニル化シグナル配列を保有している。この特徴は、同じ棘皮動物のウミシダ AK にも見られる。本研究の目的は、アメリカムラサキウニ AK1 のリコンビナント酵素を発現させその活性を明らかにすることと、プレニル化反応が起こりうる条件下で AK1 を無細胞タンパク質合成系によって合成することである。

アメリカムラサキウニ AK1 のアミノ酸配列 (417 残基: 46 kDa) はデータベースから入手できるので、それを基に AK1 遺伝子の DNA 配列を Overlap extension PCR 法により合成した。次にその遺伝子を大腸菌 BL-21 株の中で発現させ、47 kDa の分子量を持つリコンビナント酵素を精製した。アメリカムラサキウニ AK1 は、その V_{max} が $0.91 \mu\text{ moles}/\text{min} \cdot \text{mg protein}$ 、アルギニンに対する K_m が 0.83 mM であった。 V_{max} 値が他の AK よりも低い理由の一つは、酵素精製のために N 末端に付加した Strep-tag 配列 (WSHPQFEK) が、この AK の活性発現に必要な二量体形成を妨げている可能性がある。

アメリカムラサキウニ AK1 の mRNA を大量に発現させ、昆虫由来の無細胞タンパク質合成系を使って AK1 を合成した。プレニル化に必要なグラニルグラニルニリン酸を加えずに合成すると、47 kDa と 41 kDa のタンパク質の両方が合成された。前者の分子量は、AK1 のリコンビナントの酵素のものと同じで、完全長のタンパク質と思われる。一方、グラニルグラニルニリン酸を加えて AK1 を合成すると、41 kDa のタンパク質のみが合成された。この分子量は、AK1 の C 末側 50 アミノ酸の伸長部分が切断されたものとほぼ一致した。今回使用した無細胞タンパク質合成系では、内在するタンパク質分解酵素により、合成された完全長のタンパク質 AK1 の C 末側 (6 kDa) が切断されると思われる。

Abstract

The guanidino kinase (GuaK) is the enzyme that catalyzes reversible transfer of high energy γ -phosphate group of ATP to various guanidine substrates such as creatine and arginine. The phosphorylated guanidines are referred to phosphagen. The sea urchin *Stongylocentrotus purpuratus* expresses two types of GuaKs, creatine kinases (CKs) and arginine kinases (AKs). One of the AKs, the AK1, has an unusual C-terminal extension of 50 amino acid residues with a prenylation signal sequence at C-terminus. This significant feature has been found first in the AK from the feather star *Tropiometra afra macrodiscus*. The purpose of this work is to express the recombinant enzyme of *S. purpuratus* AK1 in *E. coli* and determine the enzymatic parameter, and to synthesize the AK using cell-free protein synthesis system in which prenylation reaction occurs.

First we synthesized the gene for *S. purpuratus* AK1 by the method of overlap extension PCR, based on the amino acid sequence (417 residues) available on the database. The gene was expressed in *E. coli* BL-21, and the recombinant enzyme with molecular mass of 47 kDa was purified with Strep-tag affinity chromatography. *S. purpuratus* AK1 had a lower V_{\max} value of 0.91 μ moles/min/mg protein, compared with other AKs, and a normal K_m value of 0.83 mM for arginine. The lower V_{\max} value might be caused by the strep-tag sequence (WSHPQFEK) at N-terminus, which is likely to disturb the dimeric formation of the AK1.

Next we prepared a large amount of mRNA for *S. purpuratus* AK1, and synthesized the AK1 with a cell-free protein synthesis system using the mRNA. When we synthesized the AK1 in the absence of geranylgeranyl diphosphate, which is necessary for prenylation reaction, two proteins were observed with molecular masses of 47 and 41 kDa, of which the former is consistent with the mass for the recombinant AK1. On the other hand, when synthesized in the presence of geranylgeranyl diphosphate, only the 41 kDa protein was observed. Since the molecular mass of 41 kDa protein corresponds to the mass for the AK1 lacking the C-terminal extension of 50 residues (6 kDa), it is likely that the cell-free protein synthesis system contains an intrinsic proteinase, and the C-terminal part of 50 residues of *S. purpuratus* AK1 has been cleaved from the synthesized AK with full length, during protein synthesis.

序論

グアニジドキナーゼ (GuaK) は、ATP のリン酸基をグアニジド化合物に転移させ、ADP とリン酸化された高エネルギーグアニジド化合物 (フォスファゲン) を生成する反応を可逆的に触媒する酵素である。この酵素群は、主に ATP のエネルギーを大量に使用する細胞において、フォスファゲンを緩衝させて ATP 濃度を一定に保つという役割を担っている [Ellington, 2001]。GuaK は、使用する基質の違いにより、アルギニンキナーゼ (AK)、クレアチンキナーゼ (CK)、ロンブリシンキナーゼ (LK)、タウロシアミンキナーゼ (TK)、グリコシアミンキナーゼ (GK)、ハイポタウロシアミンキナーゼ (HTK)、サラセミンキナーゼ (ThaK) オフェリンキナーゼ (OK) 等に分類される [Van Thoai, 1968]。アミノ酸配列を使った分子系統解析の結果、GuaK は AK グループと CK グループに分かれ [Suzuki et al., 1997; Suzuki et al.,

2004], 前者には主に非脊椎動物に分布する AK と星口動物特有の酵素である HTK が含まれ, 後者には脊椎及び無脊椎動物に広く分布する CK に加え, 環形動物において放散的に進化した LK, TK, GK, ThaK, OK などが含まれている。

棘皮動物に含まれる AK も特異な進化を遂げている。この AK は上記の AK グループには含まれず, 二次的に CK 遺伝子から進化したことがわかっている [Suzuki et al., 1999 and 2000]. このため, 通常の AK が単量体として機能するのに対して, CK グループの酵素同様, 棘皮動物の AK は二量体として機能する特徴も有する [Watts, 1971].

加えて, 棘皮動物オオウミシダの AK には, 他の GuaK と比べて, C 末端側に 50 残基のアミノ酸配列の伸長を持つものがある [Chouno et al., 2015]. この伸長領域の C 末端にはプレニル化シグナル配列が存在し, この AK が膜成分と結合して機能している可能性を示唆している。プレニル化は, C 末端から 4 番目のシステインの側鎖にイソプレノイドが転移する翻訳後修飾の一つであり, そのシグナル配列 (C-a-a-X) に依存して, ファルネシル化とゲラニルゲラニル化の二種類が存在する [Glomset et al., 1990].

アメリカムラサキウニ (*Stongylocentrotus purpuratus*) は CK と AK の両方を持っており, その生体内分布や機能が比較的良く分かっている。最近我々は, 遺伝子配列のデータベース検索から, アメリカムラサキウニの AK1 が, オオウミシダ AK と同様に, C 末端側に 50 アミノ酸の伸長配列を持ち, さらに, プレニル化 (ゲラニルゲラニル化) のシグナル配列を持っていることを見出した。本研究の目的は, アメリカムラサキウニ AK1 の遺伝子を合成し, そのリコンビナント酵素を発現させること, 及びこの酵素のプレニル化を実証するために, 無細胞タンパク質合成系によって AK1 を合成することである。

材料と方法

1. Overlap extension PCR によるアメリカムラサキウニ AK1 の DNA 合成, 及びリコンビナント酵素の発現

アメリカムラサキウニ AK1 のアミノ酸配列データを基に Web 上のプログラム(DNAWorks v3)を用い, 32 本のオリゴマーを設計した。尚, オリゴマー1 には NdeI 配列と Strep-tag 配列が, オリゴマー32 には HindIII 配列が付加されている。オリゴマー配列は付録 (Table1) に記載した。設計した 32 本のオリゴマー (各 50 μ M) を 1 μ L ずつ混合し, 水 48 μ L を加えて, 各オリゴマー濃度が 625 nM になるようなオリゴマー混合液(Template)を作製した。

上記の Template を 1 μ L 用い, 10x KOD⁺ Neo Buffer : 2.5 μ L, 2 mM dNTP : 2.5 μ L, 25mM MgSO₄ : 1 μ L, DMSO : 1.25 μ L, 水 : 15.75 μ L, KOD⁺ Neo DNA Polymerase : 0.5 μ L を加えて First PCR を行った。PCR は, DNA の変性 (95°C, 30 sec), アニーリング (65°C→55°C, 30 sec), DNA 鎖の伸長 (68°C, 2 min) の条件で 20 cycle 行い, Annealing の温度は, 1 Cycle ごとに 0.5°C下がるように設定した。

First PCR 産物 1 μ L を Template として, 10x KOD⁺ Neo Buffer : 2.5 μ L, 2 mM dNTP : 2.5 μ L, 25mM MgSO₄ : 1 μ L, DMSO : 1.25 μ L, Primer-1 : 1 μ L, Primer-32 : 1 μ L, 水 : 13.75 μ L, KOD⁺ Neo DNA Polymerase : 0.5 μ L を加えて Second PCR を行った。PCR は, DNA の変性 (95°C, 30 sec), アニーリング (60°C, 30 sec), DNA 鎖の伸長 (68°C, 1.5 min) の条件で 35 cycle 行った。

次に, Second PCR 産物 (1200 bp) の 3'末端に dNTP 存在下で Normal Taq Polymerase を用いて dA を付加し, pGEM-T easy ベクターに組み込んだ。塩基配列を確認した後, インサート DNA を切り出し, pET-30b プラスミドの NdeI / HindIII サイトに組み換えた。このプラスミドで, 大腸菌 BL-21 をトランスフォームし, アメリカムラサキウニ AK1 のリコンビナント酵素は, 0.5 mM IPTG 存在下, 16°C, 48 時間発現させた。発現大腸菌は, Bug Buster または超音波により細胞を破碎し, 可溶性のリコンビナント酵素は, Strep-tag を用いたアフィニティクロマトグラフィー

(Strep-tag® /Strep-Tactin®protein purification system, IBA, Germany) によって精製した。

AKの酵素活性測定は、グアニジノキナーゼの反応にピルビン酸キナーゼ、乳酸脱水素酵素の反応をリンクさせ、最終的に NADH が NAD⁺ に変化する反応に置き換えて、340 nm で追跡した[Morrison and James, 1965]。

2. 昆虫由来無細胞タンパク質合成系を用いたアメリカムラサキウニ AK1 の合成

アメリカムラサキウニ AK1 の DNA の 3'側に XbaI サイトを付加し、これを無細胞タンパク質合成用に最適化された pTD1 ベクターの EcoRV / XbaI サイトに再クローニングした。それを鋳型として、T7 プロモーター、ポリヘドリン 5'UTR 及び AK1 インサートを含む領域を増幅し、およそ 5 µg 以上の DNA を回収した。これに、T7 RNA polymerase : 10 µL, Ribo MAX Express T7 2×Buffer : 50 µL を加え全量を 100 µL とし、T7 RiboMAX Express Large Scale RNA Production System (Promega)を用いて、アメリカムラサキウニ AK1 に対する mRNA を合成した。mRNA は、illustra NICK Columns (GE Healthcare) を用いて精製した。

無細胞タンパク質合成は、Transdirect insect cell (Shimadzu Biotech) を用いて行なった [Ezure et al., 2010]。mRNA 320 µg に、Insect Cell Extract : 500 µL, Reaction Buffer : 300 µL, 4 mM Methionine : 20 µL, 2.5 mM Geranylgeranyl diphosphate : 21 µL を加え総量 1000 µL とし、25°C で 5 時間反応させた。合成された AK1 は付加した Strep-tag を用いて精製し、Amicon Ultra 0.5 centrifuge で濃縮後、SDS-PAGE 用のサンプルとした。

結果と考察

1. アメリカムラサキウニ AK1 の DNA 合成と発現ベクターへのクローニング

Overlap extension PCR により、Table1 に示すオリゴマーを用いて、アメリカムラサキウニ AK1 の DNA (約 1,200 bp) を合成した。First PCR 及び Second PCR の結果を Figure 1 に示した。1,200 bp の DNA を抽出して 3'末端に dA 付加を行なった後、pGEM にクローニングし、適切な塩基配列を持つクローンを選び出した。さらに、インサート DNA を制限酵素処理を行なって切り出し、pET ベクターの NdeI / HindIII サイトに組み込んだ。再度、AK1 の DNA 配列に変異が起こっていないことを確認した (Figure 2)。

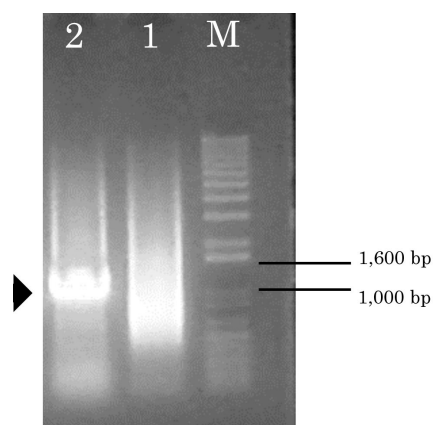


Figure 1 Overlap extension PCR の結果. 1 : First PCR, 2 : Second PCR. 矢頭は 1200 bp の DNA を示す.

```

atgtggtctcatcgcagtttgagaaggcgaacccaacaactgaattttgacgcttct
M W S H P Q F E K A N L K Q L N F D A S
gaagattaccagaattcgggtcaccactctctgctggcgaacactgcaccaagaagaa
E D Y P E F A G H H S L L A K H C T K E
atctacgcgaactccgtgacgttcaaaccccgctggttacaccatcgaccgtcgatt
I Y A K L R D V Q T P S G Y T I D R A I
caaacgggtgtgacaaccggacttccagctggcatcctggcgggtgacgaggaatgc
Q N G V D N P D F H V G I L A G D E E C
tataccgtgttcgggaactgttcgacaaagtattcgaggagtaccacaacggttcaag
Y T V F A E L F D K V I E E Y H N G F K
accaaccgacaaccataaacgcactggatccgaccaagctggaaggtgtoaactggac
T T D N H K T D L D P T K L E G G Q L D
gaagactacgtgtttcttcccgatccgtaccgctcgaacatcaaaagttatcgcgctg
D D Y V V S S R I R T G R N I K G I A L
tccccgcacatcgcgcttgcgaacgtctcaggttgaaaaactggctccgaagctcg
S P H I A R C E R R Q V E K L V S E A L
tgctctctgtcgaatttgaagtaataactaccgatcccaaacatgacccggag
C S L S D E F E G K Y Y P I P N M T P E
gaaccagcagcgtgattgatgaccacttctctcgaagaacgggtctctgctatttc
D Q Q Q L I D D H F L F E K P V S R H F
cagagcggcggtatggcggctgacttccggcagcgtctggtatctggcacaactctaac
Q S G G M A R D F P D G R G I W H N S N
aaaaacttctgttggatcaatgaagaagaccagaccgcacatctctatgcagcag
K T F L V W I N E E D Q T R I I S M Q Q
gggtgtaacatgaaagcagttttcagcgtttctgttctggcctgctaaagttgaagaa
G G N M K A V F E R F C S G L S K V E E
aaaatcaaaagaacagggtaaagaatttatgtggaacgagcacctgggtttcattctgacg
K I K E Q G K E F M W N E H L G F I L T
tgccctacgaacctggcgaagggttctgtctgttcaagttctgataccctaacctg
C P T N L G T G V R C S V H V R I P N L
ggcaaggcagcgtgtaagcagatcaggtgcgctgcgootgcagatgogtggatcc
A K D E R C K A I M G A L R L Q M R G T
ctgggtgaatttaccgaaggttgggtgtttacgacatctccaacctggaccgtctc
S G E F T E G V G G V Y D I S N L D R L
ggcaacctggaagtacagcagggtacagtcgcttatcaatggcgttacgacaatcagac
G T S E V Q Q V Q C V I N G V T N I I D
atgaaaaaagaaactggaaaaagtgaaaccgatcgaacacctctgcgggttaacaccgcg
M E K K L E K G E P I D D L L P G N T A
gaagttcagcggcaacagggaatctgaaaaaaaggcgtgaagagaagaccgctcgg
E V Q A E Q E E S E K K A A E E K A A A
aaagcggcgtcttctgagggtgcggcttctggttctgacaaaaccgaaaaaagaagtctct
K A A S S E G A A S G S D K P K K K S S
Acctgcaacctgctc
T C N L L

```

Figure 2 アメリカムラサキウニ AK1 の合成 DNA 配列とアミノ酸配列 (417 残基, Strep tag 配列 8 残基を除く)。N 末の青の部分は Strep-tag 配列, C 末の黄色の部分は棘皮動物 AK に特徴的な 48 アミノ酸の伸長部分, 赤の下線はプレニル化シグナル配列を示す。四角で囲んだ部分はマスペクトルで所在が確認された部分。

2. リコンビナント酵素の発現と酵素活性

pET ベクターに組み込んだアメリカムラサキウニ AK1 を, 大腸菌 BL21 株中で発現させた。リコンビナント酵素は, 0.05 mM IPTG 存在下, 16°C で 48 時間発現させ, Strep-tag を用いたアフィニティカラムで精製した。精製のそれぞれの段階の SDS-PAGE を Figure 3 に示す。レーン 5 の 48 kDa のバンドが精製された AK1 である。

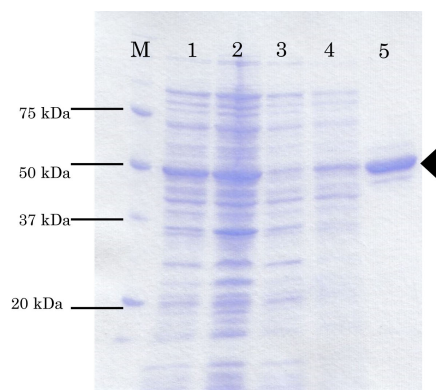


Figure 3 アメリカムラサキウニ AK1 の精製過程の SDS-PAGE. 1: 可溶性画分, 2: 不溶性画分, 3: アフィニティカラムの未吸着画分, 4: Buffer W 溶出画分, 5: Buffer E 溶出画分 (精製された酵素)。矢頭は分子量 47 kDa を示す。

大腸菌からのリコンビナント酵素の抽出には, 当初 Bug Buster を使用していたが, 大腸菌ゲノム由来の強い粘性が見

られたために、超音波破碎に変更した。この変更は、その後のリコンビナント酵素の精製を容易にした。

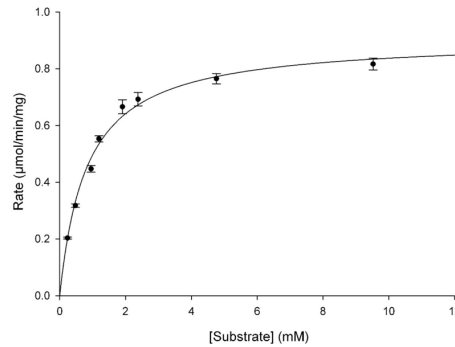


Figure 4 アメリカムラサキウニ AK1 の酵素活性. 25°C, 4.76 mM ATP 存在下, 8 点の異なるアルギニン濃度において, 各 3 回ずつ酵素活性を測定した. 酵素パラメータは SigmaPlot を使って算出した.

精製したリコンビナント酵素を用いて, その酵素特性を明らかにした. アメリカムラサキウニ AK1 の V_{max} は, 0.91 μ moles/min/mg protein, アルギニンに対する K_m は 0.83 mM と決定された (Figure 4). この V_{max} 値は, 棘皮動物マナマコ AK の 30 分の 1 以下である [Suzuki et al., 1999]. アメリカムラサキウニなどの棘皮動物の AK は, CK 遺伝子から二次的に進化してきたために, CK と同様に二量体構造を取るが, この構造はタンパク質の N 末同士が向かい合って形成される [Wu et al., 2010]. 今回のアメリカムラサキウニ AK1 のサンプルでは, N 末端に Strep-tag 配列 (WSHPQFEK) が付加されているためにその二量体形成が妨げられ, 結果として酵素の活性発現を低下させている可能性が高い.

3. AK1 遺伝子の pTD1 ベクターへのクローニング

pTD1 は無細胞タンパク質合成系専用のベクターであり, T7 プロモーター配列, タンパク質合成反応を促進するポリヘドリン 5' 非翻訳領域, マルチクローニングサイト等, mRNA 合成からタンパク質合成に必要な全ての要素を含んでいる. pET ベクターの AK1 インサートを, pTD1 ベクターの EcoRV / XbaI サイトにクローニングし, 必要領域を PCR 増幅した. これを鋳型にして, T7 RiboMAX Express Large Scale RNA Production System により大量の mRNA を合成した. 合成された mRNA の濃度は, 1.93 - 3.12 μ g/ μ L であり, 無細胞タンパク質合成には 320 μ g 以上の mRNA を使用した. タンパク質合成は, プレニル化反応に必須なグラニルグラニルニリン酸の存在下, 及び非存在下において行い, 合成されたタンパク質はアフィニティカラムで精製し, Amicon で濃縮後, SDS-PAGE にかけた.

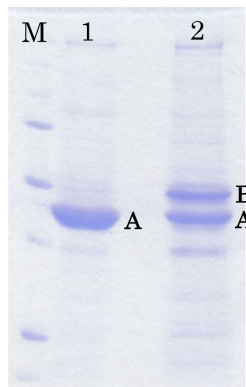


Figure 5 無細胞タンパク質合成系で合成したアメリカムラサキウニ AK1 の SDS-PAGE. 1 : 合成系にグラニルグラニルニリン酸を添加した場合, 2 : 非添加の場合. 合成タンパク質 B の分子量はリコンビナント AK1 のそれに等しく (47 kDa), 合成タンパク質 A は前者より約 6 kDa 小さい (41 kDa).

Figure 5 に示したように、プレニル化に必要なグラニルグラニルニリン酸を加えて AK1 を合成すると 41 kDa のタンパク質が合成された。この分子量は、AK1 の C 末側 50 アミノ酸の伸長が切断されたものとほぼ一致した。一方、グラニルグラニルニリン酸を加えずに合成すると、47 kDa と 41 kDa のタンパク質の両方が合成された。前者の分子量は AK1 のリコンビナントの酵素のものと同じで、完全長のタンパク質と思われる。

両方のタンパク質は N 末の Strep-tag を用いて精製されていることから、今回使用した無細胞タンパク質合成系では、完全長の合成タンパク質がその C 末側 50 アミノ酸が内在性のタンパク質分解酵素によって切断され、これは、グラニルグラニルニリン酸の添加により加速されるものと推定される。

尚、Figure 5 の合成タンパク質 A 及び B に対する予備的な Peptide Mass Fingerprinting (PMF) 分析によると、数カ所のトリプシン消化ペプチドが検出されていることから (Figure 1 の四角で囲った部分)、無細胞タンパク質合成系で確かにアメリカムラサキウニ AK1 が合成されていることが分かった。ただし、今回使用した系において AK1 の C 末端部分が切断されやすいことから、この方法では実際に AK1 がプレニル化されているのかどうかは確認できなかった。

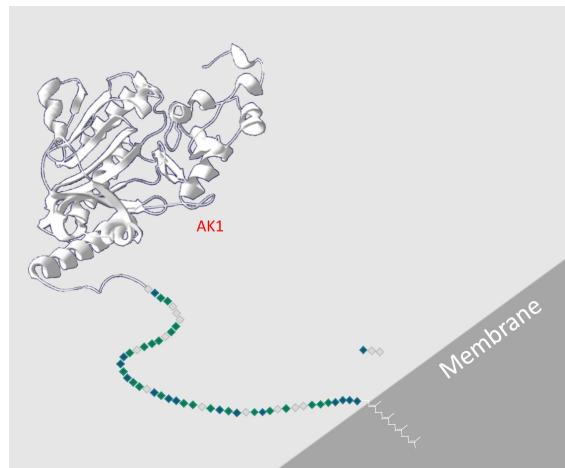


Figure 6 棘皮動物のプレニル化シグナル配列を持つ AK の細胞内での予想図。C 末端のプレニル基が細胞膜へ結合し、50 アミノ酸の伸長部分は、親水性のアミノ酸（緑または青）が多くを占めている [Chouno et al., 2015] ことから、この部分は風の糸のように揺らいでいると想像される。

棘皮動物の AK でプレニル化シグナル配列を持つオオウミシダ AK1 については、無細胞タンパク質合成系による合成タンパク質の PMF 分析から、実際にグラニルグラニル化された C 末端ペプチド断片が検出されている (未発表)。残念ながら、アメリカムラサキウニ AK1 においてはプレニル化の証拠は得ることができなかったが、C 末に特異的な伸長を持つ棘皮動物の AK は細胞内で膜成分に局在して機能している可能性が高いと思われる (Figure 6)。一方で、今回の研究からこの伸長部分が切断されやすいことが示されたので、この局在様式が安定であるかどうかは分からない。尚、伸長部分の 50 アミノ酸をコードしているエキソンの由来は不明である [Chouno et al., 2015]。

謝辞

この研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金の助成 (15K07151) により行われた。

引用文献

- Chouno, K., Yano, D., Uda, K., Fujita, T., Iwasaki, N., Suzuki, T. (2015) Arginine kinases from the marine feather star *Tropiometra afra macrodiscus*: The first finding of a prenylation signal sequence in metazoan phosphagen kinases, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 187, 55-61.
- Ezure, T., Suzuki, T., Shikata, M., Ito, M., Ando, E. (2010) A cell-free protein synthesis system from insect cells. *Methods. Mol. Biol.* 607, 31-42.
- Glomset, J.A., Gelb, M.H., Farnsworth, C.C. (1990) Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. *Trends Biochem. Sci.* 15, 139-142.
- Morrison, J. F., James, E. (1965) The mechanism of the reaction catalyzed by adenosine triphosphate-creatine phosphotransferase. *Biochem. J.* 97, 37-52.
- Suzuki, T., Kamidochi, M., Inoue, N., Kawamichi, H., Yazawa, Y., Furukohri, T., Ellington, W.R. (1999) Arginine kinase evolved twice: Evidence that echinoderm arginine kinase originated from creatine kinase. *Biochem. J.* 340, 371-375.
- Suzuki, T., Yamamoto, Y., Umekawa, M. (2000) *Stichopus japonicus* arginine kinase: gene structure and unique substrate recognition system. *Biochem. J.* 351, 579-585.
- Suzuki, T., Mizuta, C., Uda, K., Ishida, K., Mizuta, K., Sona, S., Compaan, D.M., Ellington, W.R. (2004) Evolution and divergence of the genes for cytoplasmic, mitochondrial, and flagellar creatine kinases. *J. Mol. Evol.* 59, 218-226.
- Van Thoai, N. (1968) Homologous phosphagen phosphokinases In : *Homologous Enzymes and Biochemical Evolution* (van Thoai, N., Roche, J. (Eds.)). Gordon and Breach, New York, pp. 199-299.
- Watts, D.C. (1971) Evolution of phosphagen kinases. In: *Biochemical evolution and the origin of life* (Schoffeniels, E. (ed)). North-Holland, Amsterdam, pp. 150-173.
- Wu, X., Ye, S., Guo, S., Yan, W., Bartlam, M., Rao, Z. (2010) Structural basis for a reciprocating mechanism of negative cooperativity in dimeric phosphagen kinase activity. *FASEB J.* 24, 242-252.

(付録)

Table 1 アメリカムラサキウニ AK1 の DNA 合成に用いたオリゴマーの配列.

AK1 1	AACATATGGTCTCATCCGAGTTTGAGAAGGC
AK1 2	GGGTAATCTTCAGAAGCGTCAAATTCAGTTGTTGAGGTTCCGCTTCTCAAACGCGGA
AK1 3	TGACGCTTCTGAAGATTACCCAGAATTCGGGGTCCACTCTCTGCTGGCGAAACACTG
AK1 4	GGGGTTGAACGTCACGGAGTTTCGGTAGATTCTTTGGTGCAGTTTCGCGACGAGA
AK1 5	CCGTGACGTTCAAACCCGCTGCGTTACACCATCGACCGTGCAGTCAAACCGGTGTGA
AK1 6	CTGTCACCGGCCAGGATGCCAACGTGGAAGTCCGGGTTGTCAACACCGTTTGAATCGC
AK1 7	CCTGGCCGGTGACGAGGAATGCTATACCGTGTTCGCGGAAGTTCGACAAAGTTATCGA
AK1 8	ATGGTTGTCGGTGGTCTTGAACCGTTGTTGTTACTCCTCGATAACTTGTGCAACAGTTC
AK1 9	CAAGACCACGACAACATAAAACCGACTGGATCCGACCAAGCTGGAAGGTGGTCAACT
AK1 10	GACCGGTACGGATACGGGAAGAAACAACGTAGTCGTCTCAGTTGACCACTTCCAGCT
AK1 11	CCCCTATCCGTACCGGTCCGAACATCAAAGGTATCGCGTGTCCCGCACATCGCGCGTT
AK1 12	AGCACAGAGCTTCGGAGACCAAGTTTCAACTGACGAGTTCGCAACGCGGATGTGGC
AK1 13	TCTCCGAAGCTCTGTGCTCTGTCTGACGAAATTTGAAGTAAACTACCCGATCCCAA
AK1 14	GTCATCAATCAGTCTGCTGGTCTCCGGGTCATGTTGGGATCGGGTAGTATTACC
AK1 15	AGCAGCAGCTGATTGATGACCACTTCTCTTCGAAAAGCCGGTGTCTGTCATTCCAGA
AK1 16	ATACCACGACCGTCCGGGAAGTCACGCGCCATACCGCCGCTTGAAATGACGAGACACC
AK1 17	CCGGACGGTCGTGGTATCTGGCACAACCTAAACAAAACCTTCTGGTTGGATCAATGAA
AK1 18	CCACCCTGTCATAGAGATGATGCGGGTCTGGTCTTCTTATTGATCCAACACAGGAAG
AK1 19	TCTCTATGCAGCAGGGTGGTAACATGAAAGCAGTTTTCGAGCGTTTCTGTTCTGGCCTGT
AK1 20	AAATCTTACCTGTCTTTGATTTTTCTTCAACTTACAGAGCCAGAACAGAAAACG
AK1 21	AAATCAAAGAACAGGGTAAAGAAATTTATGTGGAACGAGCACCTGGGTTTCTTCTGACGT
AK1 22	TGAACAGAGCAACGAACCCGTTGCCAGGTTCTGATAGGCACGTCAGAATGAAACCCAGG
AK1 23	GGTGTCTGTTGCTGTTCAGTTCTGATATCCCTAACCTGGCCAAGGACGAGCGTGTAAA
AK1 24	GAGGTACCACGCATCTGACGGCGCAGCGACCCATGATCGTTTACAGCGCTCGTCTTGG
AK1 25	GCAGATGCGTGGTACCTCTGGTGAATTTACCGAAGGTTGGTGGTGTTTACGACATCTC
AK1 26	ACCTGCTGACTTACAGAGGTCCGAGACGCGTCCAGGTTGGAGATGTCGTAACACACCCA
AK1 27	ACCTCTGAAGTACAGCAGGTACAGTGCCTTATCAATGGCGTTACGAAACATCATGACATG
AK1 28	AGGTCGTGATCGGTTACCTTTTCCAGTTCTTTCCATGTCGATGATGTTGTTGTAACG
AK1 29	TGAACCGATCGACACTCTCCGGGTAACACCGCGGAAGTTCAGCGGAACAGGAGGA
AK1 30	CGCTTTCGACGCGGTTTCTCTCAGCCGCTTTTTTTCAGATTCTCTGTTCCGCGCTG
AK1 31	GCCCGTCGAAAGCGCGTCTCTGAGGGTCCGCGTCTGGTCTGACAAACCGAAAAAG
AK1 33	TTAAGCTTTTAGAGCAGGTGACAGGTAGAAGACTCTTTTCGGTTGTCAGAACCA