

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03934

研究課題名（和文）始原微生物における基盤生体分子の生合成機構の解明

研究課題名（英文）Understanding how fundamental biomolecules are synthesized in primordial microbes

研究代表者

跡見 晴幸（Atomi, Haruyuki）

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：90243047

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,400,000円

研究成果の概要（和文）：超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を対象とし、アミノ酸に関しては Pro, Met, Leu, Asn, Asp, Ser, Cys の代謝に関わる遺伝子・酵素を、Trp, Phe, Tyr, His の生合成制御に関わる遺伝子・因子を同定した。補酵素については、coenzyme A, lipoic acid, biotin の生合成に関わる遺伝子の探索を進め、coenzyme A, lipoic acid に関しては構造上新規な酵素を同定した。糖質に関しては細胞表層に局在している糖化合物の構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では第3の生物ドメインを構成するアーキアおよび進化的にルーツに近い始原細菌を対象に、ゲノム情報から判断してモデル代謝経路が存在しないケースに着目し、それらに代わる未同定の物質変換経路を明らかにした。特にアミノ酸・補酵素・糖類など基盤的生体分子の生合成経路に焦点を絞って研究を進めた。本研究の成果はいままで注目されてきた代謝の「共通性」から、代謝の「多様性」の概念を確立したものと期待している。

研究成果の概要（英文）：Enzymes involved in the metabolism of Pro, Met, Leu, Asn, Asp, Ser, Cys were identified in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. Factors involved in the regulation of biosynthesis of Trp, Phe, Tyr, His were identified. In addition, enzymes involved in the biosynthesis of coenzyme A and lipoic acid were identified.

研究分野：極限環境生物学

キーワード：アーキア 始原細菌 代謝 生合成 ゲノム

### 1. 研究開始当初の背景

代謝は細胞の生命維持に必要な生体分子の生合成および生命活動に必要なエネルギーを得るための物質変換プロセスであり、生命の基盤的機能の1つである。一般に前者を同化代謝、後者を異化代謝という。ヒト、植物、酵母などの真核生物および大腸菌などの細菌は古くから研究され、様々な代謝経路が明らかとなり、それらが現在の教科書に記述されている。代表的な例としては糖新生系 (gluconeogenesis)、トリカルボン酸回路 (TCA cycle)、ペントースリン酸経路 (pentose phosphate pathway) などが挙げられる。上記のモデル生物においてはこれらの代謝経路は高く保存されており、共通している。この「共通性」に基づいて我々が使用している教科書や代謝マップが構築されている。実際これらの経路における各反応を触媒する酵素の一次構造 (アミノ酸配列) の多くは相同性を示し、互いにホモログ (相同タンパク質・遺伝子) の関係にある。したがって、ある生物 X のゲノム情報が明らかになれば、特定の代謝経路 Y の各反応を触媒する酵素のホモログを検索し、その有無を判定することにより、生物 X が代謝経路 Y を保有するかどうかを予測できる。現在では多様かつ莫大な数の生物に関するゲノム情報が明らかとなっており、上記の手法により比較的簡単に各代謝経路の生物界における分布を評価することができる。

興味深いことにデータベース検索を行うと、モデル生物で同定された種々の代謝経路酵素のホモログを保有しない微生物が多数存在することが明らかとなった。これは特に第3の生物ドメインを構成するアーキアや細菌の中で進化系統樹の根に近い始原的な微生物に多く認められる。ホモログが存在しないことは、これらの微生物では (i) その機能を示さないか、(ii) 既存の酵素とは異なる一次構造をもつ酵素が同じ反応を触媒しているか、あるいは (iii) 異なるケミストリーで物質変換を進めているか、のいずれかということになる。寄生性のものを除いては、微生物は大半の基盤生体分子 (核酸・糖・脂質・アミノ酸・補酵素など) を合成する能力を示すと予想できるので、多くの微生物がいままで我々が普遍的と考えてきた代謝経路・代謝酵素 (モデル代謝経路・代謝酵素) とは異なるものを利用していることになる。モデル代謝経路・代謝酵素を利用しない微生物は如何なる代謝機構を利用するのか? それらを利用する生物は生物界でどの程度の割合を占めるのか? 本当に普遍的な代謝経路は存在するのか? 代謝経路はどのような進化経路を辿ってきたのか? 我々の代謝に関する理解は、モデル生物を中心としたごく少数の生物種の知見に基づいたものであり、地球上に存在する多様な生物の代謝を包括的に、正しく理解するにはこれら未同定の代謝機構を明らかにしなければならない。

### 2. 研究の目的

上記のような学術的背景のもと、我々は始原微生物を中心に、基盤生体分子の生合成に関わるモデル代謝酵素・経路をもたない微生物においてそれらに代わる未知代謝経路の解明と制御機構の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を中心に、ゲノム情報を精査し、アミノ酸・補酵素・糖などの基盤生体分子の代謝、特に生合成に関与する可能性のある遺伝子を探索した。一次構造の相同性に基づく BLAST 解析をはじめ、ゲノム上での連動性 (co-occurrence)、相補性 (complementation)、ゲノム上の遺伝子の配置、遺伝子間の融合等を指標に候補遺伝子の探索を進めた。

### 4. 研究成果

*T. kodakarensis* を対象とし、アミノ酸に関しては Pro, Met, Leu, Asn, Asp, Ser, Cys の代謝に関わる遺伝子・酵素を同定することができた。また Trp, Phe, Tyr, His の生合成制御に関わる遺伝子・因子を同定し、制御機構を明らかにした。補酵素については、coenzyme A, lipoic acid, biotin の生合成に関わる遺伝子の探索を進め、coenzyme A, lipoic acid に関しては構造上新規な酵素を同定し、biotin に関しては *T. kodakarensis* には生合成経路が存在しない可能性が示唆された。糖質に関しては細胞表層に局在している糖化合物の構造を明らかにした。ここでは生合成経路の解明に関する成果として coenzyme A 生合成経路について、制御系の解明に関する成果として芳香族アミノ酸の生合成を制御する因子の同定について詳細を報告する。

#### ○ *T. kodakarensis* における coenzyme A 生合成経路の解明

Coenzyme A (CoA) は生体内の様々な代謝経路に関与し、生物に必須の補酵素である (図 1)。これまでに真核生物やバクテリアにおいて CoA 生合成に関与する酵素の解析がおこなわれ、CoA 生合成経路が明らかとなった。アーキアにおいても CoA 生合成酵素の解析がおこなわれ、pantoate kinase (PoK) や 4'-phosphopantothenate synthetase (PPS) など、アーキア特異的な酵素も発見されている (図 2)。アーキアにおいて唯一同定されていなかった CoA 生

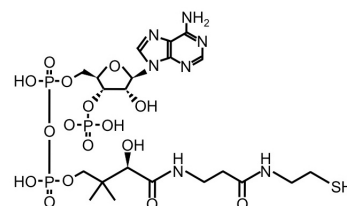


図 1. Coenzyme A の構造

合成酵素が dephospho-CoA kinase (DPCK) であり、アーキアにおける CoA 生合成の全容解明には DPCK の同定が必要であった。DPCK は CoA 生合成の最終段階を触媒し、dephospho-CoA かつ ATP 依存的に CoA が生成する。

*T. kodakarensis* は、バクテリア由来 DPCK に相同性を示す 2 つの遺伝子 (TK1334, TK2192) を有する。これら 2 つの遺伝子を用いて大腸菌を用いて発現させ、組換え型タンパク質を精製した。精製タンパク質を用いて DPCK 活性を測定したところ、DPCK 活性が観察されなかった。そこで *T. kodakarensis* が一次構造上

新規な DPCK を有すると考え、遺伝子の探索を進めた。メタゲノムデータベースの中には、数種のアーキア由来配列において arCOG04076 に属する遺伝子と phosphopantetheine adenylyltransferase (PPAT) 遺伝子が融合していることが見出された。PPAT は CoA 生合成経路において、DPCK が触媒する反応の一段階前の反応を触媒する酵素であることから、arCOG04076 に属する遺伝子が新規 DPCK 遺伝子である可能性が示唆された。

*T. kodakarensis* においては、arCOG04076 に対応する遺伝子は TK1697 であり、本遺伝子は PPAT 遺伝子とは融合していない。TK1697 遺伝子を用いて大腸菌を用いて発現させ、組換え型タンパク質を精製した。TK1697 タンパク質の DPCK 活性を測定したところ、微弱ながら ATP 依存的な DPCK 活性が観察された。リン酸基供与体を検討した結果、本酵素は GTP 依存的な DPCK であることがわかった (図 3)。続いて TK1697 遺伝子破壊株を作製し、*T. kodakarensis* における TK1697 遺伝子の生理的役割を検討した。TK1697 遺伝子破壊株が CoA 要求性を示したことから、TK1697 遺伝子の CoA 生合成への寄与が示唆された。TK1697 ホモログは真核生物やバクテリアには存在しない一方、Nanoarchaeota を除く全てのアーキアに分布しており、TK1697 はアーキア特異的な新規 DPCK であると考えられる。

我々はこれまでに、*T. kodakarensis* において CoA の生合成に関与する ketopantoate hydroxymethyltransferase (TK0363)、ketopantoate reductase (TK1968)、PoK (TK2141)、PPS (TK1686)、aspartate decarboxylase (TK1814) を同定し、酵素学的特性を明らかにしてきた。そこで未だ特性解析が行われていない phosphopantetheinoylcysteine synthetase (PPCS)、phosphopantetheinoylcysteine decarboxylase (PPCDC) および PPAT の解析を進めた。配列の相同性から PPCS と PPCDC は融合タンパク質として TK0517 が、PPAT は TK2128 がコードすると推測されている。そこで、TK0517 遺伝子破壊株と TK2128 遺伝子破壊株を作製した。両破壊株ともに CoA 要求性を示したことから、各遺伝子の CoA 生合成への寄与が示唆された。これまでの研究成果と合わせて、本研究により *T. kodakarensis* における CoA 生合成の全容が明らかとなった。

Identification of dephospho-coenzyme A (dephospho-CoA) kinase in *Thermococcus kodakarensis* and elucidation of the entire CoA biosynthesis pathway in Archaea.

Shimosaka T, Makarova KS, Koonin EV, Atomi H.

*mBio*. 2019 10(4):e01146-19. doi: 10.1128/mBio.01146-19

### ○*T. kodakarensis* における芳香族アミノ酸生合成経路の制御機構

超好熱菌は進化の源流に近い生物であり、非常にコンパクトなゲノムをもちながらも自然界の様々な環境変化に適応する能力を有している。*T. kodakarensis* のゲノム上には転写制御因子と推定される遺伝子が 87 種存在する。ここでは、*T. kodakarensis* の環境応答において転写制御因子が果たす役割の解明を目的として、本菌の全転写制御因子のタンパク質ライブラリーの作製、これを用いた特定遺伝子を制御する転写制御因子の網羅的スクリーニング系の構築および本系で同定できた新規転写制御因子の機能解析を行った。

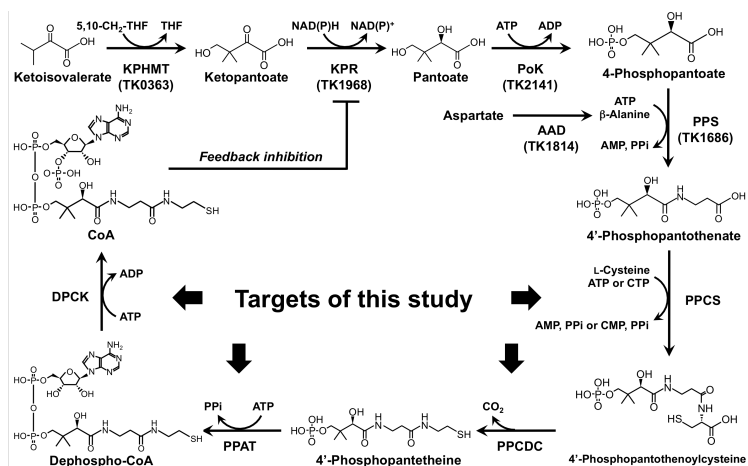


図 2. *T. kodakarensis* における CoA 生合成経路

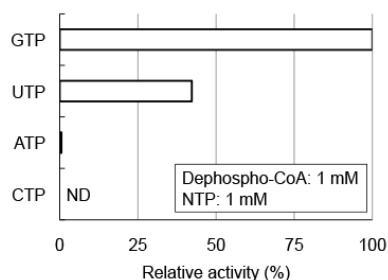


図 3. TK1697 タンパク質の NTP 特異性

*T. kodakarensis* 転写制御因子のタンパク質ライブラリーの構築には、大腸菌抽出物を用いた *in vitro* タンパク質合成系を用いた。転写制御因子をコードする全 87 種類の遺伝子に対し、二段階 PCR によりタンパク質合成に必要な配列を結合させたテンプレート DNA を作製した。これを用いてタンパク質合成反応を行った後、70°C での熱処理により大腸菌に由来するタンパク質を除去し、*T. kodakarensis* の転写制御因子ライブラリーを得た。転写制御因子と DNA の結合性は、ビオチン化 DNA を用いた electrophoretic mobility shift assay (EMSA) で評価した。スクリーニングに用いる promoter DNA には *T. kodakarensis* の Trp 生合成、酸化ストレス応答、核酸代謝、熱ショック応答、遺伝子組換えに関わる 5 種の遺伝子のものを選択した。これらの promoter DNA と作製したライブラリーを用いて合計 435 通りの組合せでスクリーニングを行った (図 4)。その結果、100 組以上の組合せで複合体形成によるバンドシフトが観察された。結合が見られた転写制御因子の中から、標的配列特異的に結合している可能性が高い転写制御因子を 7 種 (TK0271, TK1246, TK1261, TK1494, TK2110, TK2259, TK2273) 選択した。

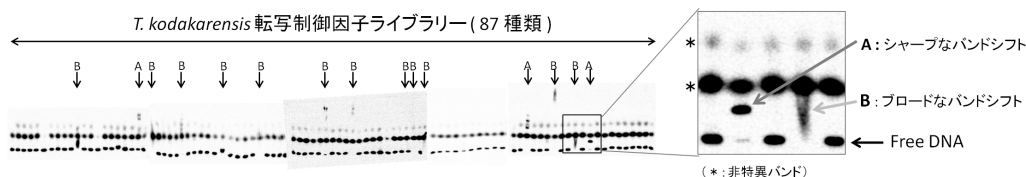


図 4. 転写制御因子ライブラリーのスクリーニングの結果 (*trp* promoter)

Trp 生合成遺伝子の promoter (*trp* promoter) に結合する転写制御因子 TK0271 について詳細な生化学的解析を進めた。*T. kodakarensis* の芳香族アミノ酸生合成に関わる 3 つの経路の遺伝子群はそれぞれオペロンを構成しており、更にこの 3 つのオペロンはゲノム上で隣接している (図 5)。また、転写制御因子である TK0271 自身も *aro* オペロンの先頭に位置している。これら 3 つのオペロンの promoter 配列内には、共通して TATA-box の上流に回文配列 (TGGACA-N<sub>8</sub>-TGTCCA) が存在することから、TK0271 はこの回文配列に結合し、芳香族アミノ酸生合成経路遺伝子全体を制御していることが予想された。

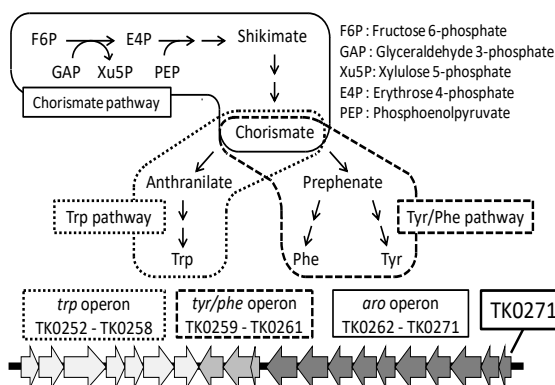


図 5. 芳香族アミノ酸生合成経路と生合成遺伝子群

上記の仮説を検証するため、TK0271 組換え型タンパク質を大腸菌を用いて調製し、精製後のタンパク質を用いて上記の 3 種の promoter DNA に対して EMSA を行った。その結果、いずれの promoter DNA に対しても複合体形成が観察された (図 6)。更に、これらの promoter に含まれる回文配列に変異を導入したところ、複合体が形成されなくなったことから、TK0271 はこの回文配列を特異的に認識していることが明らかになった。また転写制御因子の DNA に対する結合性は、関連する代謝産物の存在により変化することがあるため、TK0271 の結合状態を変化させる低分子を探索した。その結果、erythrose 4-phosphate を添加した場合に TK0271 タンパク質の DNA からの解離が観察された。一方、Trp, Phe, Tyr 等の添加では特に変化は見られなかった。さらに *T. kodakarensis* の基本転写因子から構成される *in vitro* 転写系に TK0271 を添加し、転写反応に与える影響を調べた。その結果、*trp* promoter の転写産物量は TK0271 の添加により増加した。最後に TK0271 の機能を遺伝学的に検証した。TK0271 遺伝子破壊株を作製し、培地中の Trp がその生育に与える影響を調べた。その結果、宿主株の生育は Trp 添加/非添加により変化しない一方で、TK0271 破壊株の生育は

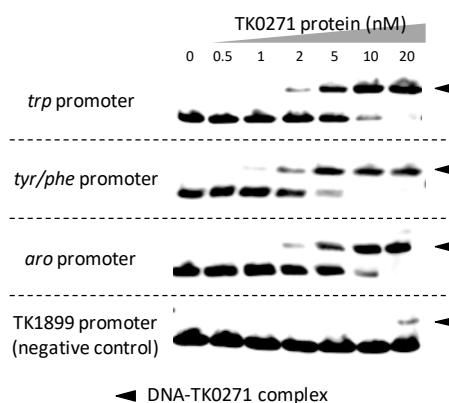


図 6. TK0271 を用いた EMSA

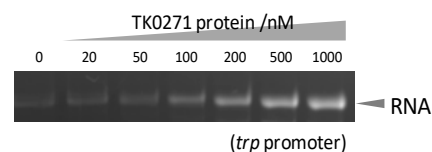


図 7. *In vitro* 転写反応に対する TK0271 タンパク質の添加効果

その立ち上がりが Trp 非存在下で有意に悪化した。したがって TK0271 タンパク質は、*T. kodakarensis* が Trp 非存在下で *trp* operon の転写を活性化することで、細胞内 Trp の濃度を安定に維持している機構が示唆された。また TK0271 タンパク質が *aro*, *tyr/phe* operon の promoter にも結合することから、芳香族アミノ酸合成に関わる代謝経路全体の転写を活性化する転写制御因子 (activator) であることが強く示唆された。

The TK0271 protein activates transcription of aromatic amino acid biosynthesis genes in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*.

Yamamoto Y, Kanai T, Kaneseki T, Atomi H.

*mBio*. 2019 10(5):e01213-19. doi: 10.1128/mBio.01213-19.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shimosaka Takahiro, Makarova Kira S., Koonin Eugene V., Atomi Haruyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of Dephospho-Coenzyme A (Dephospho-CoA) Kinase in Thermococcus kodakarensis and Elucidation of the Entire CoA Biosynthesis Pathway in Archaea	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e01146-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.01146-19	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 該当する
1. 著者名 Kita Akiko, Kishimoto Asako, Shimosaka Takahiro, Tomita Hiroya, Yokooji Yuusuke, Imanaka Tadayuki, Atomi Haruyuki, Miki Kunio	4. 巻 88
2. 論文標題 Crystal structure of pantoate kinase from Thermococcus kodakarensis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 718-724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prot.25852	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Yasuyuki, Kanai Tamotsu, Kaneseiki Tsuyoshi, Atomi Haruyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 The TK0271 Protein Activates Transcription of Aromatic Amino Acid Biosynthesis Genes in the Hyperthermophilic Archaeon Thermococcus kodakarensis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e01213-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.01213-19	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 Atomi Haruyuki, Reeve John	4. 巻 165
2. 論文標題 Thermococcus kodakarensis: the model hyperthermophilic archaeon	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology	6. 最初と最後の頁 1166-1168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/mic.0.000839	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 該当する

1. 著者名 Aziz I, Bibi T, Rashid N, Aono R, Atomi H, Akhtar M	4. 巻 200(16)
2. 論文標題 A Phosphofructokinase Homolog from <i>Pyrobaculum calidifontis</i> Displays Kinase Activity towards Pyrimidine Nucleosides and Ribose 1-Phosphate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 pii: e00284-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JB.00284-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Jin Jian-qiang, Hachisuka Shin-ichi, Sato Takaaki, Fujiwara Tsuyoshi, Atomi Haruyuki	4. 巻 86
2. 論文標題 A Structurally Novel Lipoyl Synthase in the Hyperthermophilic Archaeon <i>Thermococcus kodakarensis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01359-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.01359-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zheng Ren-Chao, Lu Xia-Feng, Tomita Hiroya, Hachisuka Shin-ichi, Zheng Yu-Guo, Atomi Haruyuki	4. 巻 203
2. 論文標題 TK1211 Encodes an Amino Acid Racemase towards Leucine and Methionine in the Hyperthermophilic Archaeon <i>Thermococcus kodakarensis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00617-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JB.00617-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirao Kohtaro, Ono Risako, Manabe Yoshiyuki, Masui Seiji, Atomi Haruyuki, Fukase Koichi	4. 巻 85
2. 論文標題 Total Syntheses of C60- and C100-Dolichols	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 11549-11559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.0c01327	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Atomi Haruyuki
2. 発表標題 Coenzyme A Biosynthesis in Archaea
3. 学会等名 The 14th Asian Congress on Biotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atomi Haruyuki
2. 発表標題 The unique metabolism in Archaea
3. 学会等名 2019 International Congress on Metabolic Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atomi Haruyuki
2. 発表標題 Elucidation of the entire CoA biosynthesis pathway in Archaea
3. 学会等名 1st Japan-Germany-Switzerland Workshop for Enzyme Technology and Bioprocess Development (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 Central carbon metabolism in <i>Thermococcus kodakarensis</i>
3. 学会等名 Extremophiles2018 Italy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 The unique metabolism in Archaea
3. 学会等名 Archaea GDR2018 France (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 Understanding and applying the metabolism of archaea
3. 学会等名 International Meeting of the Microbiological Society of Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 Metabolic Engineering in Hyperthermophilic Archaea
3. 学会等名 Asian Synthetic Biology Association (ASBA2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 跡見晴幸
2. 発表標題 第3の生物アーキアの特異な代謝
3. 学会等名 第16回京都大学福井謙一記念研究センターシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 跡見晴幸
2. 発表標題 Unique metabolism in Archaea
3. 学会等名 農芸化学会2019年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jin Jian-qiang, Hachisuka Shin-ichi, Sato Takaaki, Fujiwara Tsuyoshi, Atomi Haruyuki
2. 発表標題 Studies on coenzyme biosynthesis
3. 学会等名 Molecular Biology of Archaea 7 Zoom (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 Coenzyme biosynthesis in Archaea
3. 学会等名 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Research interests  <a href="http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/atomi-lab/en/index.php?content">http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/atomi-lab/en/index.php?content</a>  The Extremes of Life: Microbes and Their Diversity  <a href="https://www.edx.org/course/the-extremes-of-life-microbes-and-their-diversity">https://www.edx.org/course/the-extremes-of-life-microbes-and-their-diversity</a></p>
---

## 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
研究 分 担 者	真鍋 良幸  (Manabe Yoshiyuki)  (00632093)	大阪大学・理学研究科・助教    (14401)	

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

## 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	National Institute of Health (NIH)			
米国	Ohio State University			
パキスタン	University of the Punjab			
中国	Zhejiang University of Technology			