

機関番号：32663

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20780062

研究課題名（和文）アーキア特異的 tRNA 修飾システム（アーキオシン生合成経路）の解明

研究課題名（英文）Elucidation of archaea-specific archaeosine modification system

研究代表者

東端 啓貴 (HIGASHIBATA HIROKI)

東洋大学・生命科学部・准教授

研究者番号：20344864

研究成果の概要（和文）：*Thermococcus kodakaraensis* DAD 株を宿主株としてアーキオシン生合成関連遺伝子の破壊に成功した。 $\Delta queD$ 株、 Δtgt 株、 $\Delta arcS$ 株では85℃、93℃の両温度において、宿主株と同様な増殖特性を示したが、 $\Delta queE$ 株では両温度において宿主株に比べて増殖の悪化が認められ、 $\Delta queC$ 株では、93℃においてのみ増殖の悪化が観察された。以上の結果から、アーキオシンは tRNA の安定化には寄与していないことが考えられた。さらに、QueE、QueC はアーキオシン以外の未知の生合成経路にも関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The genes involving archaeosine biosynthesis were successfully disrupted, indicating that these genes are not essential for cell viability. The growth profiles of $\Delta queD$, Δtgt and $\Delta arcS$ mutants were almost identical with that of host strain at 85℃ (the optimum growth temperature) and 93℃ (the upper limit of growth temperature), suggesting that archaeosine could not contribute to stabilization the tertiary structure of tRNA. The *queE* gene disruptant showed poor cell growth at 85 and 93℃. The *queC* gene disruptant showed poor cell growth at 93℃.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物代謝、アーキア、tRNA、tRNA 修飾酵素

1. 研究開始当初の背景

tRNA は多種多様な修飾を受けることが知られており、これまでに80種類以上の tRNA 修飾ヌクレオシドの存在が確認されている。これら tRNA 修飾ヌクレオシドの中でもユニ

ークなものの一つはアーキアにおいて特異的に見いだされているアーキオシンである。アーキオシンは、その修飾が tRNA の15番目のヌクレオシドのグアニン (G15) で起こること、構造が7-デアザグアノシン誘導体であ

ること、tRNA 修飾過程に塩基置換反応を含む等、他の tRNA 修飾には見られない特異的な性質を数多く有していることに加え、構造の複雑さから“hyper-modified nucleoside”に分類される興味深い tRNA 修飾ヌクレオチドである。超好熱性アーキアにおいて、アーキオシン生合成経路の一部が明らかにされている [Ishitani R. *et al.*, *Cell*, 113, 383-394 (2003).]. それは、tRNA への塩基置換反応を触媒する tRNA グアニトラングリコシラーゼ (TGT) である (図 1)。アーキオシンは tRNA の構造維持の強化に重要であると考えられているが、*in vitro*, *in vivo* 実験での確認には至っていない。バクテリアにおいて、アーキオシンに対応する“hyper-modified nucleoside”がキューオシンである (図 1)。

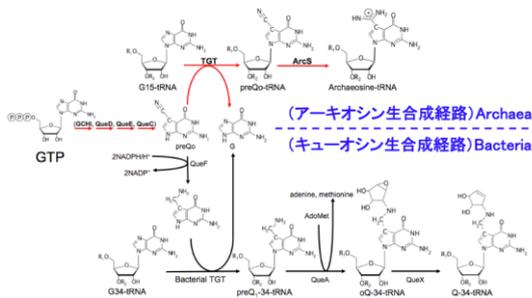


図 1 アーキオシン・キューオシン生合成経路

キューオシンは、アーキオシンと同じ 7-デアザグアノシン誘導体であるが、tRNA への修飾部位が 34 番目のヌクレオチドであることが異なっている。この部位が修飾されない変異株は一部のタンパク質の合成において正確性・伸長能が低下し、*Shigella* 属細菌 (赤痢菌) では病原性が低下する [Durand, J. M. *et al.*, *J. Bacteriol.*, 176, 4627-4634 (1994)]. このことから、キューオシン生合成に関する酵素が薬剤開発のターゲットとして注目され各種阻害剤が合成されている [Brenk, R. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 338, 55-75 (2004)]. キューオシン生合成経路には、*gchI*, *queD*, *queE*, *queC*, *queF*, *tgt*, *queA*, 未知遺伝子 *queX* に由来する酵素が関与すると考えられており、preQ₀ を合成するまでの経路に関する酵素 (GCHI, QueD, QueE, QueC) が、アーキオシン生合成経路の酵素群と共通していると考えられている [Reader, J. S. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 279, 6280-6285 (2004).]. しかしながら、バクテリア、アーキア共に QueD, QueE, QueC の酵素活性の確認には未だ至っていない。(2009 年にこれら酵素の活性が細菌において確認され [McCarty, R. M. *et al.*, *Biochemistry*, 48, 3847-3852 (2009)], さらに 2010 年に *arcX* 遺伝子が同定され、*arcS* と名付けられた

[Phillips, G. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 285, 12706-12713 (2010)]). 酵素 GCHI は、アーキオシンとキューオシン生合成経路の最初のステップであるが、葉酸の合成などにも関与する。超好熱菌由来のタンパク質は一般的に安定であり結晶化しやすい性質を持つ。*T. kodakaraensis* 由来 QueD, QueE, QueC の結晶化を試み立体構造を明らかにし、その情報を基に酵素阻害剤をデザインすることで、赤痢菌など病原菌に対する有効な薬剤が開発できると思われる。

2. 研究の目的

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* ゲノム情報からキューオシン生合成に関する遺伝子群を詳細に検索したところ、GTP から preQ₀ への合成に関与している遺伝子群 *queD*, *queE*, *queC* を見だし、さらに、tRNA 修飾酵素に広く保存されているモチーフを基にアーキアのデータベース上を検索したところ、中間体 preQ₀-tRNA からアーキオシン-tRNA への修飾反応に関与する未知の tRNA 修飾酵素の極めて有力な候補遺伝子 (*arcX*) を見いだした (2010 年の Phillips, G. らの報告と同じく、この遺伝子が *arcS* 遺伝子であった)。そこで、本研究では、アーキオシン生合成関連遺伝子 (*queD*, *queE*, *queC*) の取得及び酵素学的諸性質の解明を目指し、さらに、アーキオシンは tRNA の構造維持の強化に重要な役割を果たしていると考えられているが、未だ証明されていないことから、アーキオシン生合成関連遺伝子 (*queD*, *queE*, *queC*, *tgt*, *arcS*) 破壊株を構築しその表現型 (増殖速度、至適生育温度、酸素ストレスなど) を評価することでアーキオシンの生理的意義について考察することを目的とした。

3. 研究の方法

超好熱菌由来のタンパク質は非常に安定であり、一般的に結晶化が容易である。キューオシン生合成に関する酵素が薬剤開発のターゲットとして注目され各種阻害剤が合成されているが、アーキオシン生合成経路のうち、キューオシン生合成経路と共通して用いられている酵素群 (GCHI, QueC, QueD, QueE) を超好熱性アーキアから単離し、それらを結晶化、立体構造が解明できれば、新規な抗菌薬を開発できると思われる。アーキオシンの生合成には、特異的な 5 つの遺伝子 (*queD*, *queE*, *queC*, *tgt*, *arcS*) が必要であると考えられている。そのうちの 3 つの遺伝子 (*queD*, *queE*, *queC*) を取得するためのプライマーを作製し遺伝子断片を増幅後、発現用プラスミド pET-11a に組み込んだ (残り 2 遺伝子 (*tgt*, *arcS*) については既に取得済み)。シークエンスにより正しく組み込まれていることを

確認した。大腸菌 BL21 (DE3) CodonPlusRIL を宿主に、それぞれの組換えタンパク質の誘導発現を試みた (OD₆₆₀=0.4 で、IPTG(終濃度 0.1mM) 添加)。誘導開始 4 時間後、遠心分離により菌体を集菌した。超音波破碎後の細胞抽出液を熱処理 (85°C、15min) し、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー (HiTrapQ、ResourceQ) に供した。

アーキアにおいて、遺伝子導入法が確立されている種は非常に限られている。*T. kodakaraensis* は遺伝子破壊系が確立されている数少ない株である。*T. kodakaraensis* をモデル微生物として用い、アーキオシン生合成経路の遺伝子破壊株を構築することにした。*Thermococcus kodakaraensis* DAD [$\Delta pyrF$, Δpda] 株を宿主株とし、遺伝子破壊株の取得を試みた。アーキオシン生合成関連遺伝子 (*queD*, *queE*, *queC*, *tgt*, *arcS*) を破壊するため、それらの標的遺伝子の周辺領域 (1kbp) を取得した。各標的遺伝子の上流下流それぞれ約 1kbp を含む領域を取得するためのプライマーを作製し、PCR 法により DNA 断片を増幅、クローン化した。標的遺伝子の上流領域と下流領域を含む DNA 断片を連結することで、標的遺伝子を含まない DNA 断片を構築し、遺伝子破壊用プラスミド pUD3 へ組み込んだ。これらのプラスミドを用い、相同組換えを利用して遺伝子破壊株を作製した。マーカーには、pUD3 に存在するウラシル合成関連遺伝子 (*pyrF*) を用いた。得られたそれぞれのアーキオシン生合成遺伝子破壊候補株から染色体 DNA を抽出し PCR 法およびサザン解析により標的遺伝子が破壊されたかどうか確認した。

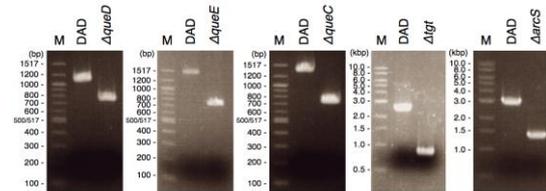
すべてのアーキオシン生合成遺伝子破壊株について、17 時間の前培養の後、本培養 (1% 植菌) を行った。OD₆₆₀ を 2 時間おきにモニターすることでそれらの増殖特性 (85°C (至適温度)、93°C) を調べた。

4. 研究成果

それぞれの組換えタンパク質 (QueD, QueE, QueC) を誘導発現させた菌体を SDS-PAGE に供したところ、推定される分子量に相当するバンドが確認できた。超音波破碎後の細胞抽出液を熱処理 (85°C、15min) したところ、大腸菌由来の夾雑タンパク質は除去され、目的の組換えタンパク質が熱処理後の上清に残ったことから、これらの組換えタンパク質は耐熱性を保持していると考えられた。次に、2 種の陰イオン交換カラムクロマトグラフィー (HiTrapQ、ResourceQ) に供することで、SDS-PAGE (CBB 染色) 上で単一になるまで精製することができた (data not shown)。

Thermococcus kodakaraensis DAD [$\Delta pyrF$, Δpda] 株を宿主株としてアーキオシン生合成関連遺伝子 (*queD*, *queE*, *queC*, *tgt*,

arcS) の破壊を試みたところ、*queD* 破壊株 11 株、*queE* 破壊株 10 株、*queC* 破壊株 6 株、*tgt* 破壊株 21 株、*arcS* 破壊株 4 株を取得できた。得られた破壊株から染色体 DNA を抽出し、PCR 法およびサザン解析により標的遺伝子の破壊を確認した (図 2、3)。



DAD 宿主株と各変異株の *queD*, *queE*, *queC*, *tgt*, *arcS* 遺伝子領域をそれぞれ増幅した。M はサイズマーカーを示す。

図 2 アーキオシン生合成遺伝子の破壊 (PCR 法による確認)

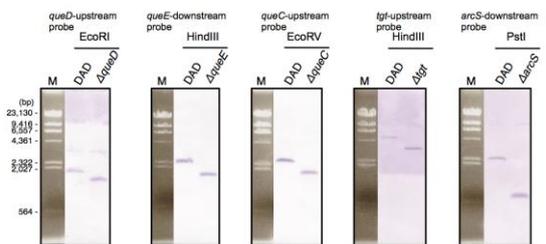


図 3 アーキオシン生合成遺伝子の破壊 (サザンプロット解析による確認)

すべての破壊株を得ることができたので、次に、それらの増殖特性を評価した。最適生育温度である 85°C と生育可能上限温度の 93°C における増殖特性を調べた (図 4 ~ 6)。

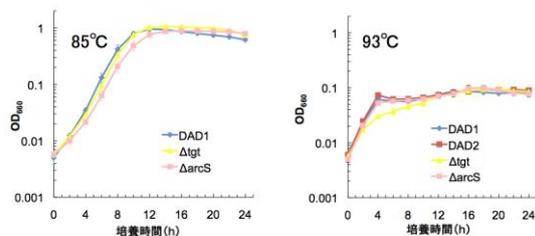


図 4 Δtgt 株、 $\Delta arcS$ 株の増殖特性

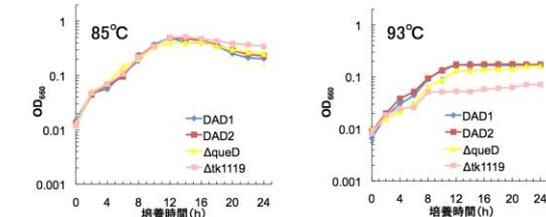
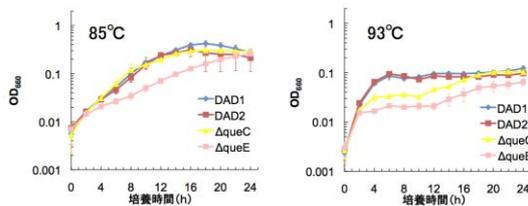


図 5 $\Delta queD$ 株、 $\Delta tk1119$ 株の増殖特性

図6 $\Delta queE$ 株、 $\Delta queC$ 株の増殖特性



$\Delta queD$ 株、 Δtgt 株、 $\Delta arcS$ 株では両温度において、ホスト株 (DAD1 及び DAD2) と同様な増殖特性を示した (図4、5)。しかし、 $\Delta queE$ 株では両温度においてホスト株に比べて増殖の悪化が認められ、 $\Delta queC$ 株では、93°Cにおいてのみ増殖の悪化が観察された (図6)。以上の結果から、アーキオシンは tRNA の安定化には寄与していないことが考えられた。さらに *queE* と *queC* 遺伝子をそれぞれ欠失させた場合に、増殖の悪化が観察され、*queD* 遺伝子を欠失させた場合の増殖特性はホスト株と同様であったことから、QueE と QueC はアーキオシン以外の未知の生合成経路にも関与しているのではないかと推測した。図5の $\Delta tk1119$ 株は、QueD ホモログである *tk1119* 遺伝子を破壊したものである。どちらが真の *queD* 遺伝子であるか tRNA を抽出し tRNA 内のアーキオシンの有無を確認する必要がある。全ての遺伝子破壊株も同様に tRNA を抽出し tRNA 内のアーキオシンの有無を確認する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① 東端啓貴、アーキアの核酸安定化戦略、*極限環境微生物学会誌*、査読有、8巻2号、2010年、69-76

[学会発表] (計9件)

- ① 東端啓貴 他2名、*Thermococcus kodakarensis* のアーキオシン生合成関連遺伝子破壊株の増殖特性、第12回極限環境微生物学会年会、2011年11月28日、良順会館 (長崎大学)
- ② Hiroki, HIGASHIBATA 他1名、Disruption of genes involved in archaeosine biosynthesis in hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis.*, *Thermophiles2011*, 2011年9月13日、Huntley Lodge Bigsky, Montana, America
- ③ 東端啓貴 他2名、アーキオシン生合成

遺伝子破壊株の増殖特性、日本農芸化学会2011年度 (平成23年度) 大会 (震災により中止したが、要旨集の発行を以て開催したとみなす)、2011年3月26日、京都女子大学 (京都)

- ④ Hiroki, HIGASHIBATA 他1名、Disruption of genes involved in archaeosine biosynthetic pathway in hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis.*, *Pacificchem2010*, 2010年12月18日、Hawai'i Convention Center, Honolulu, Hawaii, America
- ⑤ 東端啓貴 他1名、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* のアーキオシン生合成経路、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月8日、神戸ポートアイランド
- ⑥ 馬渡麻未、東端啓貴 他1名、超好熱菌由来のアーキオシン生合成遺伝子の解析、第11回極限環境微生物学会年会、2010年11月16日、京都大学化学研究所 (京都)
- ⑦ 東端啓貴、Archaeosine biosynthetic pathway in hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis.*, 東洋大学バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター・国際シンポジウム、2009年11月20日、東洋大学 (東京)
- ⑧ 東端啓貴、アーキオシン生合成遺伝子の解析、第10回極限環境微生物学会年会、2009年10月29日、明治大学 (東京)
- ⑨ 東端啓貴、超好熱性アーキアの核酸関連酵素の解析、極限環境微生物学会第10回シンポジウム、2009年6月9日、東京大学 (東京)

[その他]

ホームページ等

http://ris.toyo.ac.jp/details/index.php?user_id=790

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東端 啓貴 (HIGASHIBATA HIROKI)

東洋大学・生命科学部・准教授

研究者番号：20344864

(2) 研究分担者 (0)

(3) 連携研究者 (0)