

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660064

研究課題名(和文) DNA分子起源の解明による生命分子起源の検証

研究課題名(英文) Rewiring the origin of life by resurrecting an ancient pathway for DNA synthesis

研究代表者

小川 順 (Ogawa, Jun)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70281102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNAの分子起源に新しい知見を与えるべく、DNAの生合成機構を新たな側面から解析するとともに、得られた成果をDNA関連化合物の工業的生産へと応用した。具体的には、現在、リボヌクレオチドが基質とされているデオキシリボヌクレオチド生合成に関して、解糖系中間体、アセトアルデヒド、核酸塩基といった太古の自然環境にも存在し得た化合物からの生合成の可能性を、大腸菌の核酸生合成の人為的改変により実証した。また、核酸医薬の原料となる修飾ヌクレオチドの酵素合成法を確立した。

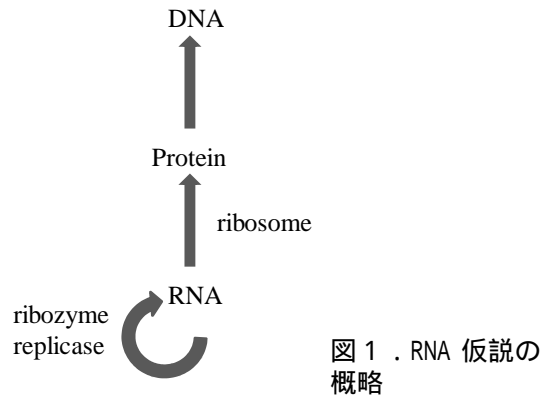
研究成果の概要(英文)：To obtain new knowledge on molecular origin of DNA, mechanism of DNA biosynthesis was investigated from new aspects, and the obtained results were applied for industrial production of DNA. As an example, by artificial modification of E. coli DNA biosynthetic pathway, deoxyribonucleotide synthesis, which is believed to be synthesized from ribonucleotide, was revealed to be synthesized from simple chemicals those existed in ancient earth environment, i.e., intermediates of glycolysis, acetaldehyde, and nucleobases. Furthermore, an enzymatic process for the production of modified nucleoside useful for DNA drug was established.

研究分野：応用微生物学

キーワード：進化 核酸 DNA RNA デオキシリボヌクレオチド 核酸医薬

1. 研究開始当初の背景

生命の起源つまり DNA の起源についての論争は未だに終結しないが、RNA が DNA の起源だと仮定する RNA 仮説が広く信じられている。RNA 仮説とは原始地球上に RNA が最初に存在したと仮定し、RNA からの自己複製系により現生物へ進化したという仮説である。つまり、RNA が遺伝情報を担い、かつ触媒としてはたらき、次いでタンパク質・DNA が誕生した、という説が現在、最も有力となっている (図 1)。



実際に、地球上のすべての生物はリボヌクレオチドの還元反応により DNA の構成分子としてデオキシリボヌクレオチドを酵素合成する。この反応を触媒するのは ribonucleotide reductase である。この ribonucleotide reductase が RNA 仮説における「DNA は RNA に由来する」とする説の中核を担うが、この RNA 起源説を証明する直接的な証拠は皆無であり、次に挙げる大きな問題点が指摘されている。

自己複製能力をもつ RNA 分子が見つかっていない。

ribonucleotide reductase によるリボヌクレオチドからデオキシリボヌクレオチドへの還元反応のメカニズムは多段階からなり、RNA からできるリボザイムがこの反応を触媒するのは化学的に不可能である。

従って、RNA 起源説に変わる新たな説の登場が待たれていた。

一方筆者らは、可逆的なヌクレオチド分解系として知られる代謝経路 (deo 経路; この代謝系は deo オペロンが担っている) の各酵素の機能を活用することで、グルコース、アセトアルデヒド、核酸塩基という単純な分子材料からデオキシリボヌクレオチド (DNA の構成単位) の生合成が可能となることを見いだした (図 1)。

この応用的に重要な知見は、「デオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチド以外の単純な分子材料から生合成されうる」という、基礎科学的にもこれまでにない重要な知見として取り上げられ (Poole AM* On

alternative biological scenarios for the evolutionary transitions to DNA and biological protein synthesis. In: Origins of Life. The Primal Self-Organization, R. Egel, A. Y. Mulikidjanian, D.-H. Lankenau, eds. Springer Verlag, Heidelberg, pp. 209-223 (2011).) RNA 仮説を含めた DNA 分子進化に関する包括的な研究に取り組んでいる各国の研究者に反響を呼んだ。このことが、筆者に DNA の分子起源を新たな角度から再検証する研究を想起させた。

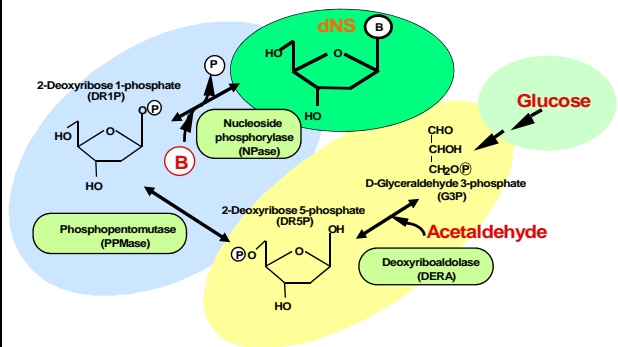


図 1 . deo 経路での酵素的デオキシリボヌクレオチド逆合成

2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、「生命の設計図を担う DNA の分子起源の解明に新しい知見を与えること」である。また、その研究過程を通して、「DNA の生合成機構に関して新たな知見を得ること」ならびに、これらの情報を「DNA の工業的生産法の開発」へと応用することを目的としている。具体的には、現在、RNA / リボヌクレオチドが基質とされている DNA / デオキシリボヌクレオチド生合成に関して、解糖系中間体 (D-glyceraldehyde 3-phosphate) アセトアルデヒド、核酸塩基といった、太古の自然環境にも存在し得た化合物からの生合成の可能性を大腸菌の核酸生合成の人為的改変により検証し、RNA 生物起源説に対しての DNA 生物起源説を検証する。

3. 研究の方法

deo 経路による酵素的デオキシリボヌクレオチド逆合成が生細胞内で行われる環境を見いだす。方法としては、大腸菌 *Escherichia coli* をモデルとして、ribonucleotide reductase 機能が欠損した条件下にて deo 経路 (deo operon、表 1) による酵素的デオキシリボヌクレオチド逆合成の検証を試みる。欠損酵素のターゲットとしては 3 種の ribonucleotide reductase (nrdAB、nrdEF、nrdDG) とする (表 1)。

Gene	Enzyme	Class	operation	Essential or not
<i>nrdA</i>	Ribonucleoside-diphosphate reductase α -subunit	Ia	Aerobic	E
<i>nrdB</i>	Ribonucleoside-diphosphate reductase β -subunit			E
<i>nrdE</i>	Ribonucleoside-diphosphate reductase α -subunit	Ib	Aerobic	N
<i>nrdF</i>	Ribonucleoside-diphosphate reductase β -subunit			N
<i>nrdD</i>	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	III	Strict anaerobic	N
<i>nrdG</i>	Anaerobic ribonucleotide reductase-activating protein			N
<i>deo</i> operon	<i>deoC</i>	Deoxyribose phosphate aldolase (DERA)		N
	<i>deoA</i>	Thymidine phosphorylase (TP)		N
	<i>deoB</i>	Phosphopentomutase (PPM)		N
	<i>deoD</i>	Purine nucleoside phosphorylase (PNP)		N

表 1 .対象とした遺伝子群

これらをコードする遺伝子を相同組換え法で破壊し、得られた多重遺伝子欠損株を用い、最小培地にて本菌が生育できる条件を見いだす。これにより生育中の *E. coli* において *deo* 経路による酵素的逆合成によりデオキシリボヌクレオシドが生合成される事の実証を試みる。

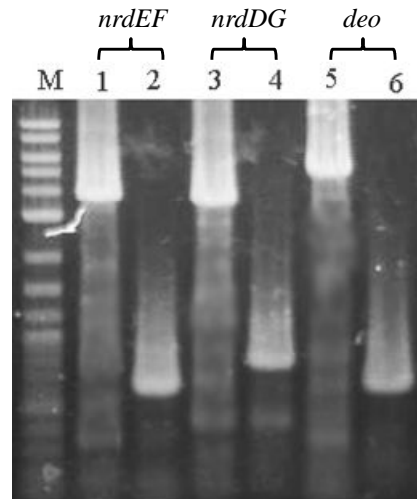
4 . 研究成果

本研究では、*deo* 経路による酵素的デオキシリボヌクレオシド逆合成が生細胞内で行われる環境を見いだすべく、大腸菌をモデルとして、ribonucleotide reductase 機能が欠損した条件下にて *deo* 経路による酵素的デオキシリボヌクレオシド逆合成が機能するかどうかの検証を試みる。その端緒として、大腸菌 (BW38029 株) が有する 3 種の ribonucleotide reductase (*nrdAB*、*nrdEF*、*nrdDG*) のうち、必須遺伝子とはされていない 2 種の ribonucleotide reductase (*nrdEF*、*nrdDG*) の破壊株の構築を行った。すなわち、*nrdEF*、*nrdDG* をコードする遺伝子を相同組換え法で破壊することで、二重遺伝子欠損株 (*nrdEF nrdDG*) を得た。続いて、*nrdEF nrdDG* 株を対象に、ゲノム上の *deo* 遺伝子を除去した三重遺伝子欠損株 3 株 (*nrdEF nrdDG deo*) を構築し (図 2)、この三重遺伝子欠損株 (3 株) に *deo* 遺伝子をプラスミドで導入することで、*deo* 遺伝子の発現を人為的に制御できる株 (3/pBRdeo) を構築した。

本 3/pBRdeo 株において、*deo* 遺伝子の人為的高発現のもと、必須遺伝子とされる *nrdAB* の脱落が実現できれば、*deo* 経路による酵素的デオキシリボヌクレオシド逆合成が生細胞内で機能する可能性を示すことができると考えられた。そこで、アラビノース誘導性温度感受性発現ベクター (pKD46) に必須遺伝子である *nrdAB* をクローニングし 3/pBRdeo 株に導入した株 (3/pBRdeo/ pKD46*nrdAB*) について、*nrdAB* 誘導発現条件下 (アラビノース含有培地) でのゲノム上の *nrdAB* の破壊を試みた。破壊操作後、薬剤耐性を保持して生育可能な菌株が得られた。この菌株は、ゲノム上の *nrdAB* が破壊された株

(3/pBRdeo/ pKD46*nrdAB*/ *nrdAB*) である可能性がある。

この 3/pBRdeo/ pKD46*nrdAB*/ *nrdAB* 株を 37 にて培養することで、pKD46*nrdAB* の脱落を誘導し、最終的に 37 にて生育した菌株におけるゲノム上の *nrdAB* の破壊と pKD46*nrdAB* の脱落を検証したが、必須遺伝子である *nrdAB* の破壊株は得られなかった。



Results of disruption of *nrdEF*, *nrdDG* and *deo* operon of *E. coli*
In lane 1, 3, 5, the total DNA of BW38029 (WT) was used as template
In lane 2, 4, 6, the total DNA of $\Delta nrdEF/\Delta nrdDG/\Delta deo$ was used as template.

図 2 . 三重遺伝子欠損株 3 株 (*nrdEF nrdDG deo*) における遺伝子欠損の確認

上述のように、3/pBRdeo 株における *nrdAB* の破壊を試みたが、必須遺伝子である *nrdAB* の破壊株は得られなかった。

そこで、3/pBRdeo 株に残存する *nrdAB* 由来のデオキシリボヌクレオシド合成活性を ribonucleotide reductase 阻害剤であるヒドロキシウレアにて阻害する条件下で、デオキシリボヌクレオシド逆合成系が実際に機能して 3/pBRdeo 株の生育を担保できるかを検証した。

まず、3/pBRdeo 株が、生育を阻害する濃度のヒドロキシウレア存在下 (表 2) にてデオキシリボース要求性を示すことを確認した (表 3)。

No.	Strain	OD600 HU (mM)					
		0	30	50	60	75	100
1	$\Delta nrdEF/\Delta nrdDG$	1.910	1.881	0.010	0.004	0.005	0.006
2	$\Delta nrdEF/\Delta nrdDG/\Delta deo$	1.886	1.857	0.005	0.005	0.005	0.005
3	$\Delta nrdEF/\Delta nrdDG/\Delta deo$ (pBR-deo)	1.841	1.640	0.011	0.004	0.007	0.005
4	$\Delta nrdEF/\Delta nrdDG/\Delta nrdAB$ (pKD- <i>nrdAB</i>)	1.800	/	0.055	/	0.008	0.006

表 2 . 各種形質転換大腸菌におけるヒドロキシウレア (HU) による生育阻害

No.	Strain	OD600				
		0	Supplements (w/v)			
			0.1% dR	0.5% dR	0.2% dNS	0.5% dNS
1	$\Delta nrdEF/\Delta nrdDG$	0.003	1.934	1.773	0.011	0.013
2	$\Delta nrdEF/\Delta nrdDG/\Delta deo$	0.003	0.010	0.10	0.013	0.011
3	$\Delta nrdEF/\Delta nrdDG/\Delta deo(pBR-deo)$	0.010	1.755	1.678	0.011	0.009
4	$\Delta nrdEF/\Delta nrdDG/\Delta nrdAB(pKD-nrdAB)$	0.009	1.842		1.897	

表3. 各種形質転換大腸菌におけるヒドロキシウレア存在下でのデオキシリボース、デオキシリボヌクレオシド要求性

続いて、デオキシリボヌクレオシド逆合成系の基質となるグルコース、アセトアルデヒドの添加を検討したが、アセトアルデヒドの毒性が高く生育を確認できなかった(表4)。

No.	Strains	OD600		
		Acetaldehyde (w/v)		
		0%	0.1%	0.2% AA
1	$\Delta nrdEF/\Delta nrdDG$	0.009	0.009	0.010
2	$\Delta nrdEF/\Delta nrdDG/\Delta deo$	0.007	0.013	0.013
3	$\Delta nrdEF/\Delta nrdDG/\Delta deo(pBR-deo)$	0.007	0.010	0.010
4	$\Delta nrdEF/\Delta nrdDG/\Delta nrdAB(pKD-nrdAB)$	0.010	0.137	0.286

表4. 各種形質転換大腸菌におけるヒドロキシウレア存在下でのアセトアルデヒド添加の生育に対する影響

これを回避すべく、ピルビン酸デカルボキシラーゼを共発現し、ピルビン酸添加による間接的なアセトアルデヒド供給系を3/pBRdeo株に組み入れた $\Delta EF/\Delta DG/\Delta deo(pACYC-pdc/pBR-deo)$ 株を構築した。本菌株は、3/pBRdeo株の生育を阻害する濃度のヒドロキシウレア存在下、グルコース、ピルビン酸のみを炭素源とする完全合成培地にて生育可能であったことから(図3)デオキシリボヌクレオシド逆合成が生細胞内でribonucleotide reductaseの機能を代替しうる可能性が示された。

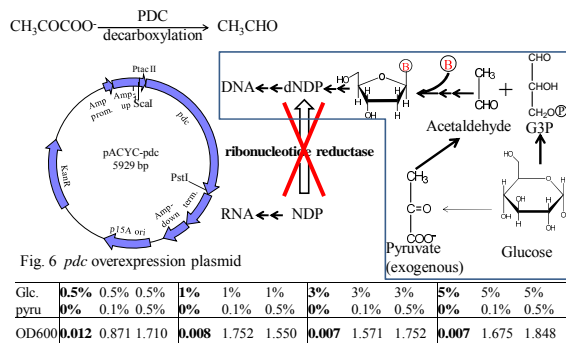


図3. $\Delta EF/\Delta DG/\Delta deo(pACYC-pdc/pBR-deo)$ 株におけるピルビン酸添加による生育促進

もうひとつの目的である「DNAの工業的生産法の開発」へと応用に関しては、核酸医薬の合成原料となる修飾型ヌクレオシドアナログの合成に有用な微生物反応の探索を行った。

核酸医薬は低分子医薬や抗体医薬に続く新たな分子標的医薬であり、その高い標的的特異性と低い抗原性に期待が集まる一方、ヌクレアーゼなどによる積極的な分解を受けることから患者体内での安定性に課題が残っている。この解決策として考えられているのが、2'-O-methylribonucleosideをはじめとした修飾型ヌクレオシドアナログのRNA鎖への導入による酵素耐性の付与である。ただ、こうしたヌクレオシドアナログ、特にプリンヌクレオシドアナログの有機化学合成には多段階の反応・精製ステップが必要となり、コストおよび環境負荷が産業生産上の大きな課題となっている。そこで本研究室では酵素法による温和かつ効率的なプリンアナログ合成法の開発、および利用可能なヌクレオシドアナログのバリエーションの拡大を目指し、産業的に有用な微生物触媒の探索を行った。

研究室保存菌株および土壌分離菌のスクリーニングより2'-O-methyluridineに活性を持つ微生物として乳酸菌*Lactobacillus buchneri* LBK78と放線菌*Agromyces* sp. MM-1を得た。また、これらの菌株よりそれぞれ新規なnucleoside hydrolaseとしてLbNHとAgNHを単離、同定した。これらの酵素は2'-O-methylribonucleosideに対する加水分解活性に加えて糖転移活性も保有しており、2'-O-methyluridineとAdenineを基質とすることで2'-O-methyladenosineの酵素的合成が初めて可能となった(図4)。

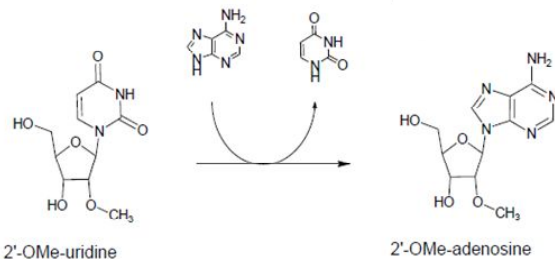


図4. 2'-O-methyluridineとAdenineを基質とする2'-O-methyladenosineの酵素的合成

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2件)

Anthony M. Poole, Nobuyuki Horinouchi, Ryan J. Catchpole, Dayong Si, Makoto

Hibi, Koichi Tanaka, Jun Ogawa. The Case for an Early Biological Origin of DNA. *J. Mol. Evol.*, **79**(5-6), 204-212, 2014.

DOI: 10.1007/s00239-014-9656-6

Yuuki Mitsukawa, Makoto Hibi, Narihiro Matsutani, Nobuyuki Horinouchi, Satomi Takahashi, Jun Ogawa, Novel nucleoside hydrolase from *Lactobacillus buchneri* LBK78 catalyzing hydrolysis of 2'-O-methylribonucleosides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2016. in press. DOI:10.1080/09168451.2016.1182853

〔学会発表〕(計6件)

日比 慎, 松谷 成裕, 堀之内 伸行, 高橋 里美, 小川 順ら. 乳酸菌由来 Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase の持つリボシル基転移活性を利用した核酸医薬中間体の酵素合成. 第66回日本生物工学会大会 2014年9月10日 札幌コンベンションセンター (札幌)

Yuuki Mitsukawa, Makoto Hibi, Narihiro matsutani, Nobuyuki Horinouchi, Satomi Takahashi, Jun Ogawa, Studies on 2'-O-methylribonucleoside metabolism in microorganisms. 農芸化学会関西支部提案公募事業

【ENVIRONMENT】Session 3-3. 2015年1月31日 京都大学(京都)

光川 侑輝, 日比 慎, 松谷 成裕, 堀之内 伸行, 高橋 里美, 小川 順, 微生物による 2'-O-メチルリボヌクレオシドの代謝に関する研究. 日本農芸化学会関西支部例会. 2015年1月31日 京都大学(京都)

光川 侑輝, 日比 慎, 松谷 成裕, 堀之内 伸行, 高橋 里美, 小川 順, 放線菌由来の新規 nucleoside hydrolase の機能解析と核酸医薬生産プロセスへの応用開発. 日本農芸化学会2015年度大会 2015年3月29日 岡山大学(岡山)

光川 侑輝, 日比 慎, 松谷 成裕, 堀之内 伸行, 高橋 里美, 小川 順, 新規なヌクレオシダーゼに見出したりボシル基転移活性による 2'-O-メチルリボヌクレオシド合成. 第67回日本生物工学会大会, 日本(鹿児島) 2015年10月26日

光川 侑輝, 日比 慎, 松谷 成裕, 堀之内 伸行, 高橋 里美, 小川 順, 微生物由来の新規な nucleoside hydrolase を用いた核酸医薬原料 2'-O-メチルリボヌクレオシドの酵素的合成. 2016年度日本農芸化学会大会, 日本, 2016年3月29日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 順 (OGAWA, Jun)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 70281102

(2) 研究分担者

日比 慎 (HIBI, Maokoto)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号: 30412347