

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19340

研究課題名(和文)ミトコンドリアを持たない真核細胞研究のキックオフ

研究課題名(英文) Attempts to create eukaryotic cells without mitochondria by engineering the iron-sulfur cluster biosynthesis systems

研究代表者

高橋 康弘 (Takahashi, Yasuhiro)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：10154874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：“ミトコンドリアを持たない真核生物”(Monocercomonoides sp.)では、バクテリアからの水平伝播によって新たな鉄硫黄(Fe-S)クラスター生合成系がサイトゾルにもたらされ、これによって、ミトコンドリアの必須機能(ISCマシナリー)が回避されている。そこで本研究では、出芽酵母においてFe-Sクラスター生合成系を操作することにより、ミトコンドリアISCマシナリーの機能をバイパスさせることを試みた。NIFマシナリーの2成分を酵母のサイトゾルで発現させ、ISCマシナリー全体を欠失させるべく種々の条件を検討したが、マシナリーの成分の中には欠失可能なものと不可能なものがあることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、真核細胞における鉄硫黄(Fe-S)クラスターの生合成系ならびにその局在性を人為的に操作・改変することにより、ミトコンドリアにおける生合成系(ISCマシナリー)の必須機能をバイパスさせることを試みた。これをバイパスさせることができれば、ミトコンドリア全体をも欠失させることが可能になると期待したが、ISC成分の中には必須性を回避できないもの(NFS1)が存在することが判明した。

研究成果の概要(英文)：The essential function in mitochondria and mitosomes is the biosynthesis of iron-sulfur (Fe-S) clusters by the mitochondrial ISC machinery. By contrast, another type of Fe-S cluster biosynthesis system is brought to the cytosol by horizontal gene transfer in the eukaryotic species that survives without mitochondria (Monocercomonoides sp.). In this study, we attempted to bypass the mitochondrial ISC machinery in *Saccharomyces cerevisiae* by engineering the Fe-S cluster biosynthesis systems. We expressed the components of the bacterial NIF machinery in yeast cytosol, and various conditions were examined to delete the entire ISC machinery. We found that some of the essential ISC components could be deleted, although some remained still essential.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：鉄硫黄クラスター ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、酸化的リン酸化によって大量の ATP を供給するオルガネラとして、真核生物の繁栄を支えている。嫌気性原生生物の一部においては酸化的リン酸化能が消失しているが、それでもなお、ミトコンドリアが退化進化した関連オルガネラ(マイトソーム)として維持されている。しかし、2016年5月、“ミトコンドリアを持たない真核生物”がはじめて報告された。嫌気性原生生物のひとつ *Monocercomonoides* sp. では、ミトコンドリアのタンパク質群をコードする遺伝子のすべてが、ゲノムから欠失していたのである (Karnkowska *et al. Curr. Biol.* 26:1-11, 2016)。近縁の原生生物種との比較から、かつてはこの *Monocercomonoides* もミトコンドリアを保持していたが、進化の過程で失ったものと推定された。その欠失が可能になった要因は、鉄硫黄 (Fe-S) クラスター生合成系の局在性の変更である。

ミトコンドリアやマイトソームに共通する唯一の必須機能は、ISC マシナリーによる Fe-S クラスターの生合成である。ミトコンドリアに局在する ISC マシナリーは、サイトゾルの CIA マシナリーと協調して、サイトゾルや核の Fe-S タンパク質群(生育に必須な DNA ポリメラーゼやリボソームの生合成因子 Rhl1 を含む)に Fe-S クラスターを供給している。一方 *Monocercomonoides* では、バクテリアからの水平伝播によって、別タイプの Fe-S クラスター生合成系 (SUF マシナリー) がサイトゾルにもたらされている。これが CIA マシナリーと協調して Fe-S クラスターを供給することによって、ミトコンドリアの ISC マシナリーやミトコンドリア全体の必須性が回避されたものと考えられる。

別の嫌気性原生生物 *Entamoeba histolytica* や *Mastigamoeba balamuthi* では、マイトソームは保持されているものの、ISC マシナリーはさらに別タイプの Fe-S クラスター生合成系 (NIF マシナリー) に置き換わっている (Nyvltova *et al. PNAS.* 110:7371-7376, 2013)。また、われわれは *E. histolytica* の NIF マシナリーが、ISC マシナリーや SUF マシナリーと同様に、さまざまな Fe-S タンパク質群に対して特異性の広い Fe-S クラスター供給系として機能できることを明らかにしている (Ali *et al. J. Biol. Chem.* 279:16863-16874, 2004)。これらの知見から、真核細胞のミトコンドリアに局在している ISC マシナリーは、SUF マシナリーや NIF マシナリーと機能的に置換するという可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

モデル真核生物である出芽酵母において、ミトコンドリアにおける唯一の必須機能は ISC マシナリーによる Fe-S クラスターの生合成であり、それ以外の機能 (TCA サイクルや酸化的リン酸化、脂肪酸の  $\beta$ -酸化、アミノ酸やヘム、ピオチンの合成など) は失っても、富栄養培地であれば生育することができる。では、サイトゾルだけで Fe-S クラスターを供給できるように改変することができれば、出芽酵母においても、ミトコンドリア ISC マシナリーの必須性、ひいてはミトコンドリア自体の必須性も回避できるのではないだろうか? 本研究では、*Monocercomonoides* や *Entamoeba* のゲノム情報を参考にして、出芽酵母の Fe-S クラスター生合成系を改変することにより、ミトコンドリアを持たない真核細胞を実験的に創り出すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 出芽酵母のサイトゾルの Fe-S クラスター生合成系 (CIA マシナリー) にバクテリア由来のクラスター生合成系の成分を追加して、ミトコンドリアの寄与がなくてもサイトゾルだけで、Fe-S タンパク質群に Fe-S クラスターを供給できるように改変する。具体的には、NIF マシナリーの 2 成分 (NifS と NifU) を出芽酵母のサイトゾルで発現させ、CIA マシナリーと協調してクラスターを生合成できるように改変する。

(2) NIF マシナリーの特性や ISC マシナリーとの共通性について理解を深めるために、構造や生化学的な諸性質について詳細を調べる。

(3) サイトゾルだけで Fe-S クラスターを組み立てることができるようになれば、ISC マシナリーの必須性が回避されると期待される。ミトコンドリアの ISC マシナリーをコードする必須遺伝子群を破壊することで、この点を確認する。

(4) ミトコンドリアへのタンパク質輸送装置をコードする必須遺伝子群を破壊する。これらを破壊することができれば、ミトコンドリアの内部はタンパク質も DNA も無い抜け殻となり、いずれ細胞から欠失すると予想される。

#### 4. 研究成果

(1) NIF マシナリー (NifS と NifU) について、生化学的な性質ならびに構造を解析した。NifS については、結晶内で酵素反応をスタートさせることによって、反応中間体の構造を捉えることに成功した。また、NifS の活性部位の柔軟な触媒ループの構造はこれまで不明であったが、種々の条件を検討することで、この触媒ループを含めた構造決定にはじめて成功した。これによって、NifS の触媒反応で重要となる反応中間体と活性部位のアミノ酸との相互作用や、複雑に絡み合った触媒ループが反応の進行時に解消されるべきトポロジー変化を見出した。NifU については、結晶化することが困難であったため、NifU 二量体と NifU-NifS 複合体の構造を SAXS により解析した。また、NifU の3つのドメインを個別に発現・精製し、NifU 二量体間の会合部位や NifS との相互作用部位を検討した。これらの解析から、Fe-S クラスター生合成系としての基本的なアウトラインが明らかになった。

(2) *nifS* と *nifU* をクローン化し、細胞質で発現させるよう出芽酵母に導入した。一般に、Fe-S クラスターの生合成系を過剰に発現させると有害な影響が現れるため、タンパクの発現量を変化させて酵母細胞の生育に対する影響を調べ、NIF マシナリーの適正な発現量が担保できる条件を検討した。発現量は Western 解析によって確認し、また、出芽酵母の生育に影響を及ぼさない発現量 (プロモーターのセット) を特定した。

(3) ミトコンドリアで作られる Fe-S クラスターの一部を細胞質へ輸送する内膜の輸送体 ATM1 の遺伝子破壊に成功した。ただし、予想に反して、この破壊株は NifS、NifU の発現プラスミドを脱落させても生育可能であった。ATM1 は必須遺伝子と報告されていたが、NifS、NifU の有無に関係なく破壊されたことから、Fe-S クラスター生合成系の改変において、指標にならないことが判明した。

(4) ミトコンドリアにおける ISC マシナリーの必須成分 JAC1 の破壊に (世界で初めて) 成功した。また、破壊株の表現型から、ミトコンドリア内の Fe-S タンパク質群 (TCA 回路や電子伝達系) は機能していないが、サイトゾルや核の Fe-S タンパク質群は正常と推定された。この破壊株からはリバータントが単離できたため、サイトゾルにおける NIF+CIA のキメラ型 Fe-S クラスター生合成系の機能が向上したのではないかと期待して、サプレッサー変異の特定を進めている。

(5) 別の必須成分である NFS1 の遺伝子破壊には、これまで成功していない。NFS1 はシステイン脱硫黄酵素として、Fe-S クラスター生合成系に硫黄を供給するだけでなく、tRNA の硫黄修飾系にも硫黄を供給することが知られている。そこで、培地に高濃度の硫黄を添加するといった条件を検討し、さらには NFS1 のコピー (ミトコンドリア移行配列を除去したもの) をサイトゾルで発現させるといった改変を施して、バイパスの可能性について検討を続けている。

以上、助成金の交付期間に“ミトコンドリアを欠失させる”という目的を達することはできなかったが、今後の展開に期待が持てる状況である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakai Yumi, Maruyama-Nakashita Akiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Biosynthesis of Sulfur-Containing Small Biomolecules in Plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3470 ~ 3470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21103470	査読の有無 無
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 Tanaka Naoyuki, Yuda Eiki, Fujishiro Takashi, Hirabayashi Kei, Wada Kei, Takahashi Yasuhiro	4. 巻 112
2. 論文標題 Identification of IscU residues critical for de novo iron-sulfur cluster assembly	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 1769 ~ 1783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mmi.14392	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 Nakamura Ryosuke, Hikita Masahide, Ogawa Shoko, Takahashi Yasuhiro, Fujishiro Takashi	4. 巻 287
2. 論文標題 Snapshots of PLP substrate and PLP product external aldimines as intermediates in two types of cysteine desulfurase enzymes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1138 ~ 1154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15081	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 中井由実, 矢野貴人	4. 巻 71
2. 論文標題 鉄硫黄クラスター及びtRNA硫黄修飾と細胞内硫黄輸送経路	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 硫酸と工業	6. 最初と最後の頁 133 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Yokoyama Nao, Nonaka Chihiro, Ohashi Yukari, Shioda Masaharu, Terahata Takuya, Chen Wen, Sakamoto Kotomi, Maruyama Chihiro, Saito Takuya, Yuda Eiki, Tanaka Naoyuki, Fujishiro Takashi, Kuzuyama Tomohisa, Asai Kei, Takahashi Yasuhiro	4. 巻 107
2. 論文標題 Distinct roles for U-type proteins in iron-sulfur cluster biosynthesis revealed by genetic analysis of the <i>Bacillus subtilis</i> sufCDSUB operon	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 688 ~ 703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mmi.13907	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9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村 亮裕、藤城 貴史、高橋 康弘
2. 発表標題 鉄硫黄クラスター生合成系における硫黄供給酵素のシステイン脱硫反応機構
3. 学会等名 2019年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村亮裕、小松茉里佳、小川翔子、國近航平、藤城貴史、高橋康弘
2. 発表標題 2つの異なるグループに属するシステインデスルフラゼに対する阻害剤の作用機構の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國近航平、藤城貴史、山川誠、和田啓、高橋康弘
2. 発表標題 特殊な環境に生育する微生物由来の鉄硫黄クラスター生合成系の試験管内再構成の試み
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中尚志、佐藤紗希子、松嶋夢叶、金澤美秋、藤城貴史、和田啓、高橋康弘
2. 発表標題 鉄硫黄クラスターの生合成を担う IscUは ordered/disordered状態を遷移する必要がある
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤城貴史、寺畑拓也、島田侑希乃、高橋康弘
2. 発表標題 鉄硫黄クラスター生合成SUF-likeマシナリーにおける亜鉛依存型硫黄運搬タンパク質 SufUの構造と機能
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村亮裕、藤城貴史、小松茉莉佳、高橋康弘
2. 発表標題 鉄硫黄クラスター生合成系へ硫黄の供給を担うシステインデスルフラゼの反応中間体のX線結晶構造解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國近航平、藤城貴史、山川誠、平林佳、岩永朋子、福山恵一、和田啓、高橋康弘
2. 発表標題 超好熱性細菌の鉄硫黄クラスター生合成タンパク質群のX線結晶構造解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村 亮裕、藤城 貴史、高橋 康弘
2. 発表標題 ピロリ菌の鉄硫黄クラスター生合成系 NIF マシナリーにおけるシステイン脱硫酵素 Nifs の触媒反応機構の解明
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤城 貴史、高橋 康弘
2. 発表標題 The NIF machinery for iron-sulfur cluster biogenesis
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

埼玉大学 理工学研究科 分子統御研究室 <a href="http://park.saitama-u.ac.jp/~tougyo/Home.html">http://park.saitama-u.ac.jp/~tougyo/Home.html</a>
--

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	中井 由実  (Nakai Yumi)  (80268193)	大阪医科大学・医学部・講師    (34401)	

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
---------	---------