

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19204

研究課題名(和文)ミトコンドリアを欠失させた真核細胞の構築とその分子細胞生物学的解析

研究課題名(英文) Construction of eukaryotic cells lacking mitochondria and their molecular biological analysis

研究代表者

高橋 康弘 (Takahashi, Yasuhiro)

埼玉大学・理工学研究科・名誉教授

研究者番号：10154874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母において、ミトコンドリアの唯一の必須機能はISCマシナリーによる鉄硫黄(Fe-S)クラスターの生合成である。そこで本研究では、酵母のサイトゾルだけでFe-Sクラスターを生合成できるように改変を施すことで、ミトコンドリアISCマシナリーの機能をバイパスさせ、“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試みた。原核生物由来のNIFマシナリーあるいはSUFマシナリーの成分を出芽酵母のサイトゾルで発現させたところ、後者において、ISCの必須成分であるNfs1の遺伝子を破壊することに初めて成功することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においてNfs1を欠失できたことは、ミトコンドリアISCマシナリーの必須機能を、サイトゾルに導入した古細菌由来のSUFマシナリーによってバイパスさせることができたことを示している。引き続き、同様の条件下で、サイトゾルからミトコンドリアへのタンパク質輸送装置の中心成分であるTim23の遺伝子の破壊を試みたが、現在まで、破壊株の単離には成功していない。ただし、今後の挑戦に向けて道筋をつけることはできた。

研究成果の概要(英文)：In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the only essential function of mitochondria is the biosynthesis of iron-sulfur (Fe-S) clusters by the ISC machinery. In this study, we attempted to create “eukaryotic cells without mitochondria” by modifying yeast so that it can biosynthesize Fe-S clusters only in the cytosol. By expressing components of the prokaryotic SUF machinery in the cytosol, we succeeded for the first time in disrupting the NFS1 gene that encodes an essential component of ISC machinery. This gene disruption indicates that the essential function of the mitochondrial ISC machinery could be bypassed by the foreign SUF machinery expressed in the cytosol. Next, we attempted under similar conditions, to disrupt the gene for Tim23, a central component of the protein transport machinery from the cytosol to the mitochondria. To date, we have not succeeded in isolating the deletion strain, but we have paved the way for future challenges.

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 を生産・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行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、“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 exilis* 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 (Kamkowska *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 (生育に必要な DNA ポリメラーゼやリボソームの生合成因子 Rli1 を含む) に Fe-S クラスターを供給している。一方 *M. exilis* 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ている。

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、リポ酸の合成など) 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) に原核生物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) あるいは SUF マシナリーのプロトタイプの 2 成分 (SufB\* と SufC) 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を試みた。

(2) 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、この点を確認した。

(3) 次いで、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の破壊を試みた。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した。

### 4. 研究成果

(1) ピロリ菌由来の NIF マシナリーの 2 成分 (NifS と NifU) は、大腸菌の ISC マシナリーや枯草菌 SUF マシナリーの機能を代替することができる。そこで、これらを構成的なプロモーターの下流にクローニングし、酵母サイトゾルで発現させた。嫌気条件下でスクリーニングを行ったところ、酵母 ISC マシナリーの必須成分である Jac1 の遺伝子破壊株を初めて得ることができた。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。ただし、酵母 ISC マシナリーの別の必須成分である Nfs1 の遺伝子破壊株は得られなかった。

(2) 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 ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) を添加するといった条件を検討し、さらにはミトコンドリア移行配列を除去した Nfs1 のコピーをサイトゾルで発現させるといった改変を施して検討を重ねたが、NFS1 遺伝子を破壊することはできなかった。

(3) JAC1 遺伝子は破壊できたが NFS1 遺伝子は破壊できないという相反する結果について、その要因を検討したところ、前者は、嫌気的な条件下であれば、NIF マシナリーの有無に関わらず破壊できることが判明した。すなわち (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。JAC1 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。JAC1 破壊株からはリパ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たが、全ゲノム配列の比較からは、関連のありそうな変異箇所を特定することはできなかった。

(4) 別の Fe-S クラスター生合成系である SUF マシナリー (アーキア *Methanocaldococcus jannaschii* 由来のプロトタイプ) を酵母のサイトゾルで発現させた後に、NFS1 遺伝子の破壊を試みたところ、この遺伝子の破壊株を初めて構築することができた。今回導入した SUF マシナリーは、嫌気条件下で遊離の  $\text{S}^2$  を硫黄源として機能するタイプを用いたが、得られた NFS1 破壊株の表現型は、導入した SUF マシナリーの特性と合致していた。さらに、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 (グルタミン酸合成酵素など) 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。したがって、ISC マシナリーの役割の中で酵母の生存に必須な機能(ミトコンドリアからサイトゾルへの Fe-S クラスターの供給)が、サイトゾルで発現させた *M. jannaschii* 由来の SUF マシナリーによってバイパスすることができたと考えられる。

(5)ミトコンドリアタンパク質の 99%は核にコードされ、サイトゾルで前駆体タンパク質として合成された後に、ミトコンドリア内に輸送されることが知られている。そこで、輸送経路で中心的な役割を果たしている Tim23 の遺伝子を破壊させることができれば、ミトコンドリアはいずれもぬけの殻となり、最終的にミトコンドリアそのものを欠失できるのではないかと考え、TIM23 遺伝子の破壊に挑戦した。上述のように酵母のサイトゾルで SUF マシナリーのプロトタイプを発現させたのち、TIM23 遺伝子をジェネティシン 耐性遺伝子で置換するように形質転換を行ったところ、小さなコロニーが多数出現し、その多くで TIM23 遺伝子が破壊されていることをコロニー PCR で確認することができた。しかし、それらのコロニーは全て植継ぐことができなかった。種々の要因を検討したが、現在まで破壊株の単離には成功していない。

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 1件）

1. 著者名 Murata Maya, Murakami Taichi, Yuda Eiki, Mukai Nanami, Zheng Xintong, Kurachi Natsumi, Mori Sachiko, Ogawa Shoko, Kunichika Kouhei, Fujishiro Takashi, Wada Kei, Takahashi Yasuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 The minimal SUF system can substitute for the canonical iron-sulfur cluster biosynthesis systems by using inorganic sulfide as the sulfur source	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2024.03.20.586028	査読の有無 無
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 Nakamura Ryosuke, Ogawa Shoko, Takahashi Yasuhiro, Fujishiro Takashi	4. 巻 289
2. 論文標題 Cycloserine enantiomers inhibit PLP dependent cysteine desulfurase SufS via distinct mechanisms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 5947 ~ 5970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16455	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 Baek Sanghun, Imamura Sousuke, Higa Takeshi, Nakai Yumi, Tanaka Kan, Nakai Masato	4. 巻 119
2. 論文標題 A distinct class of GTP-binding proteins mediates chloroplast protein import in Rhodophyta	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2208277119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2208277119	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 Kunichika Kouhei, Nakamura Ryosuke, Fujishiro Takashi, Takahashi Yasuhiro	4. 巻 60
2. 論文標題 The Structure of the Dimeric State of IscU Harboring Two Adjacent [2Fe-2S] Clusters Provides Mechanistic Insights into Cluster Conversion to [4Fe-4S]	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1569 ~ 1572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.1c00112	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 Fujishiro Takashi、Nakamura Ryosuke、Kunichika Kouhei、Takahashi Yasuhiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Structural diversity of cysteine desulfurases involved in iron-sulfur cluster biosynthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 e190001_1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v19.0001	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10件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kouhei Kunichika, Ryosuke Nakamura, Takashi Fujishiro, Yasuhiro Takahashi
2. 発表標題 Structural insights into biosynthesis of a [4Fe-4S] cluster via coupling of two adjacent [2Fe-2S] clusters in the IscU enzyme
3. 学会等名 錯体化学会第72回討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kei Wada, Yoshikazu Tanaka, Yasuhiro Takahashi
2. 発表標題 Structural and functional analyses of E. coli SufBCD complex involved in iron-sulfur clusters biogenesis.
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榎 千智、室賀 直来、寺畑 拓也、島田 侑希乃、國近 航平、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に関わるSUF、SUF-like、ISC系の硫黄供給システムの酸化ストレス耐性の比較
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上 太一、村田 真耶、藤城 貴史、高橋 康弘
2. 発表標題 メタン生成古細菌のSufB2C2複合体は鉄硫黄クラスター生合成系SUFマシナリーのプロトタイプである
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大塚 穂乃、中村 亮裕、小川 翔子、藤城 貴史、高橋 康弘
2. 発表標題 2つの異なるタイプのシステインデスルフラゼと基質類似分子との反応
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 和田 啓、田中 良和、高橋 康弘
2. 発表標題 鉄硫黄クラスター生合成を担うSUFマシナリーの構造機能解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kouhei Kunichika, Ryosuke Nakamura, Takashi Fujishiro, Yasuhiro Takahashi
2. 発表標題 Structural basis for biosynthesis of a [4Fe-4S] cluster from two [2Fe-2S] clusters on the IscU enzyme in ISC machinery
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC10) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kei Wada, Yoshikazu Tanaka, Yasuhiro Takahashi
2. 発表標題 Molecular mechanism of the SUF system involved in the iron-sulfur cluster biogenesis.
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC10) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市原 將希、関 亮太、中井 由実、高橋 康弘
2. 発表標題 ミトコンドリアの欠失を目指した真核細胞の鉄硫黄クラスター生合成系の改変
3. 学会等名 第19回微生物研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横 千智、室賀 直来、寺畑 拓也、島田 侑希乃、國近 航平、中村 亮祐、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の硫黄輸送に関わる分子種の比較
3. 学会等名 第19回微生物研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

--



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)	大阪医科薬科大学・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