

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05027

研究課題名(和文) 初期生命の硫黄転移系の探究

研究課題名(英文) A study on an ancestral sulfur transfer pathway

研究代表者

秀瀬 涼太 (HIDESE, RYOTA)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命准教授

研究者番号：90610866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円

研究成果の概要(和文)：超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の硫黄転移のキャリアーとして考えられるユビキチン様タンパク質(Ubl)の生理的機能の解析を行った。Ubl 遺伝子全破壊株で、モリブドプテリン含有酵素活性やtRNAのチオ化修飾率が低下したことから、これらの生合成において硫黄転移キャリアーとして機能することが示唆された。一方、生育環境中に元素硫黄が存在する場合は、Ubl非依存的な硫黄化機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、*T. kodakarensis*はUbl硫黄転移系を介して含硫化合物を合成する機構とUbl転移系を介さず外環境の元素硫黄により直接的に制御される2つの硫黄化機構を有することを示す結果を得た。モリブドプテリンやtRNAチオヌクレオシドは全ての生物に共通して存在する根源的な生体化合物である。元素硫黄などの還元硫黄こそが原始生命体が有していた始原的代謝経路の硫黄ドナーであることを示唆した点は、生命の起源を考察する上で学術的意義が極めて高い。

研究成果の概要(英文)：I analyzed the physiological roles of ubiquitin-like proteins as sulfur carriers for sulfur-containing biofactors in a hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. The ubl less-strain showed the decreased activities of molybdopterin-containing enzymes and thiolation rate of tRNA thionucleoside, indicating Ubl would be involved in the biosynthesis as sulfur-carrier; on the other hand, Ubls are dispensable for the biosyntheses of sulfur-containing biomolecules in the cells grown in the presence of elemental sulfur.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ユビキチン様タンパク質 好熱性アーキア 硫黄転移系 モリブドプテリン tRNA硫黄化修飾 原始生命体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

硫黄は必須元素である。L-メチオニンや L-システインなど含硫アミノ酸の他にも、鉄硫黄クラスター、モリブドプテリン、チアミンなど含硫補因子、2-チオウリジンや 4-チオウリジンなど tRNA のチオヌクレオチドはあらゆる生物の生命維持に必須である。含硫化合物合成において硫黄転移に必須な酵素であるシステインデスルフラゼ (CD) は、L-システインから硫黄の脱離反応を触媒する。CD による L-システインの脱硫黄化反応とこれによる自身の活性中心にあるシステイン残基上のパースルフィド(-S-SH)の形成である。次いで、このパースルフィドが硫黄キャリアーであるユビキチン様タンパク(Ubi)の C 末端に転移し Ubi チオカルボキシレートが形成する。最終的に Ubi チオカルボキシレートから個々の硫黄転移酵素によって tRNA やモリブドプテリン前駆体などの標的物質に硫黄が転移し硫黄化反応が完了する (Ubi 依存硫黄転移系) (図 1)。大腸菌では Ubi は、チアミン、モリブドプテリンへの硫黄キャリアーとしての役割をもつ。また、酵母やヒトでは、Ubi はモリブドプテリンの他、tRNA チオヌクレオチドへの硫黄転移に関わる。

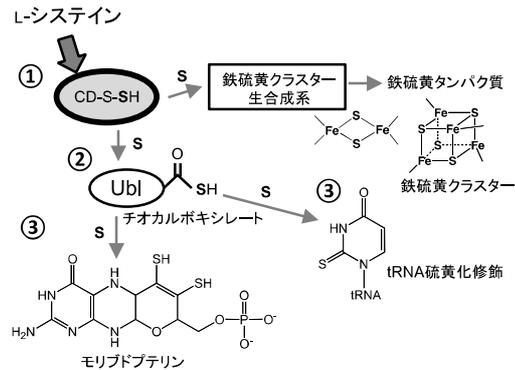


図 1. Ubi 依存硫黄転移系 (酵母、ヒト)

好熱性アーキアにおける硫黄転移系は未だ解明されておらず、また好熱性アーキアには CD や Ubi を持たない種も存在し未知の硫黄転移系の存在が推測されるなどその実態は不明である。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* は、好熱性アーキアのモデル生物として多くの研究がなされている。本菌は、元素硫黄 (S_0 , 化学式: S_8) を還元して硫化水素を発生しながら呼吸するが、 S_0 が存在しない環境では、デンブンやピルビン酸を代謝し、プロトン電子受容体として水素発生型呼吸を行う (Archaea (2004) 1:263-267)。これまでに我々は、*T. kodakarensis* が S_0 非存在下では CD 依存的な鉄硫黄クラスター合成が行われるため CD が生存に必須であるのに対し、 S_0 存在下では CD を必要としない未知の鉄硫黄クラスター生成系が働くため CD は必須ではないことを明らかにした (Mol. Microbiol. (2014) 93:331-345)。Ubi については、好塩性アーキア *Haloferax volcanii* において、SAMP1 はモリブドプテリン生成に関わること、SAMP2 は tRNA 硫黄化修飾に関わることがわかっているのみである (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2011) 108:4417-22)。Ubi は硫黄転移の他に、タンパク質の翻訳後修飾としての役割を担うことが知られている。

好熱性アーキアは進化系統樹の根の近傍に位置し、原始生命体の形質を強く保存していると考えられている。多くの好熱性アーキアは硫黄が豊富な環境に生息していることから、これら生物の持つ硫黄転移系は原始生命体が有していた硫黄転移系である可能性が高い。好熱性アーキアの硫黄転移系の分子機構を解明することは、原始生命体における硫黄転移系や硫黄代謝の理解と生命が硫黄の少ない環境へと適応進化した分子メカニズムの解明に繋がる重要な研究課題といえる。*T. kodakarensis* の Ubi の機能解明を目的にして、モリブドプテリン、tRNA チオヌクレオチド合成の硫黄転移への関与を検証した。

2. 研究の目的

T. kodakarensis には Ubi オルソログが 3 種 (TK1065、TK1093、TK2118) 存在する。モリブドプテリン合成や tRNA の硫黄化修飾において、これら Ubi の機能を検証するために、特

異的遺伝子法により Ubl 遺伝子破壊株を作成し、*T. kodakarensis* 野生株及び遺伝子破壊株でのモリブドプテリン含有酵素活性や tRNA スクレオチドの硫黄化を解析した。

3. 研究の方法

(1) Ubl 遺伝子破壊株の作成と生育解析

遺伝子機能の解析では、遺伝子破壊が極めて重要である。*T. kodakarensis* の特異的遺伝子破壊法は、オロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素 (*pyrF*) 欠損株を宿主に、*pyrF* を選択マーカーとして相同組換えを利用した遺伝子破壊系である。*T. kodakarensis* KU216 株 (Appl. Environ. Microbiol. (2005) 71:3889-99) を親株として、*tk1065* 遺伝子、*tk2118* 遺伝子をそれぞれ相同組換えにより破壊した。また、*T. kodakarensis* DAD 株 (FEMS Microbiol Lett. (2008) 287:113-20) を親株として、*pdaD* 遺伝子を染色体の *tk1093* 遺伝子と置換することで *tk1093* 遺伝子を破壊した。また、Ubl 遺伝子を全て破壊した株 (3 重遺伝子破壊株) を作成した。*T. kodakarensis* の培養では、栄養培地 ASW-YT をベースにして、元素硫黄を含む培地 (+S₀ 培地) または元素硫黄非含有ピルビン酸含有培地 (-S₀+ピルビン酸培地) を使用した。元素硫黄非含有デンブ含有培地 (-S₀+デンブ培地) を使用した。

(2) モリブドプテリン含有酵素活性測定

-S₀+ピルビン酸培地または+S₀ 培地で野生株と各 Ubl 破壊株または Ubl 全破壊株を 85°C で培養した。生育した菌体の無細胞抽出液のモリブドプテリン含有酵素 (FOR, ホルムアルデヒド: フェレドキシン酸化還元酵素; AOR, クロトンアルデヒド: フェレドキシン酸化還元酵素; GAPOR, グリセロアルデヒド-3-リン酸: フェレドキシン酸化還元酵素) 活性は、嫌気チャンバー内 (O₂ < 1.0 ppm) で 80°C でメチルピオロゲンの還元による A_{600 nm} の吸光度変化を測定することにより算出した。

(3) tRNA チオスクレオチドの硫黄化修飾解析

-S₀+ピルビン酸培地または+S₀ 培地で野生株と各 Ubl 破壊株または Ubl 全破壊株を 85°C で培養した。tRNA の硫黄化修飾率を調べるため、+S₀ 培地および-S₀+ピルビン酸培地で各遺伝子破壊株 (Δ TK1065 株、 Δ TK1093 株、 Δ TK2118 株、3 重遺伝子破壊株) から tRNA 画分を抽出し、tRNA スクレオチドを既報の方法 (*Nat Chem Biol.* (2016) 12:648-55) に従い、液体クロマトグラフトンデム型質量分析計で解析した。

4. 研究成果

(1) Ubl のアミノ酸配列を基にした系統解析によると、TK2118 と TK1093 は *H. volcanii* 由来 SAMP1、SAMP2 とそれぞれ相同性が高いことがわかった。*T. kodakarensis* の糖代謝にはモリブドプテリン含有酵素であるグリセロアルデヒド-3-リン酸: フェレドキシン酸化還元酵素が関与する。本酵素遺伝子破壊株は、デンブなどを炭素源とした培養条件では生育致死となる (*Mol. Microbiol.* (2011) 81: 1300-1312)。3 種の Ubl 遺伝子のそれぞれを破壊した株 (Δ TK1065、 Δ TK1093、 Δ TK2118 株) を-S₀+デンブ培地で 85°C (至適生育温度) で培養したところ、 Δ TK1065 株や Δ TK1093 株は生育した一方で、 Δ TK2118 株は生育しなかった。次いで、+S₀ 培地で Δ TK1065 株、 Δ TK1093 株、 Δ TK2118 株のそれぞれを 85°C、93°C (生育上限温度) で培養した。85°C では、 Δ TK1093 株で野生株と比べてわずかな生育遅延が見られ、93°C では、 Δ TK1093 株は生育が遅延し、最高菌体濁度が減少した。さらに-S₀+ピルビン酸

培地では、85°C でΔTK1093 株とΔTK2118 株で生育が遅延し、93°C で両株とも生育致死になった。

(2) -S₀+ピルビン酸培地で生育したΔTK1065 株、ΔTK1093 株、ΔTK2118 株では、AOR や FOR 活性が野生株と比べて低下した (GAPOR は検出感度以下)。以上の結果より、いずれの Ubi でもモリブドプテリン生合成に関わることが示唆され、TK2118 は特に GAPOR の活性化に関わると予想された。一方、+S₀培地で生育した 3 重遺伝子破壊株のいずれの酵素の活性も野生株と同等であった。これは、硫黄が存在する環境では、Ubi 非依存の硫黄転移系が機能することを示唆している。

(3) tRNA の化学修飾は、ほぼすべての生物で見られる。一部の好熱菌 (好熱性バクテリア *Thermus thermophilus* や超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* など) では、tRNA の T-ループの 54 位も 5-メチル-2-チオウリジン誘導体に修飾される。54 位の硫黄修飾により、T-ループと D-ループから構成される tRNA の肩領域の構造が安定化され、tRNA の熱安定性が向上する (J. Biol. Chem.(2006) 281:14296-14306)。-S₀+ピルビン酸培地で生育したΔTK1093 株および 3 重遺伝子破壊株において tRNA ヌクレオチド (tRNA の 54 位に見られる 5-メチル-2-チオウリジン修飾など) の硫黄化修飾の顕著な減少が見られた。しかしながら、硫黄化は完全には消失しておらず、また上述と同様に+S₀培地ではこれら株は野生株と同等の修飾率を示した。以上の結果から、TK1093 が tRNA 硫黄化修飾関連タンパク質であること、tRNA の硫黄化修飾には TK1093 が関与する硫黄転移経路とこれを必要としない経路が存在することが示唆され、これらの経路は培地中の S₀ の存在に応じて使い分けがなされている可能性が考えられた (図 2)。

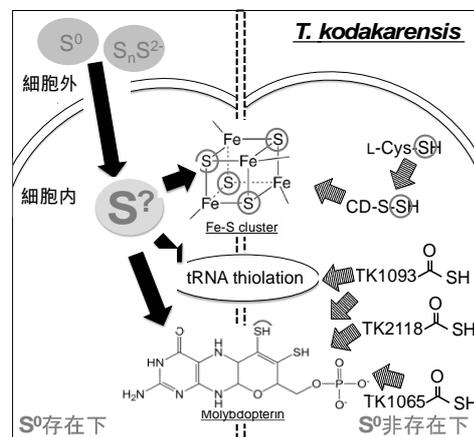


図 2. *T. kodakarensis* の硫黄転移系

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Hidese, R., Kawato, K., Nakura, Y., Yasukawa, K., Yanagihara, I., Fujiwara, S.	4. 巻 495
2. 論文標題 Thermostable DNA helicase improves the sensitivity of digital PCR	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 2189-2194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.12.053.	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 Hidese, R., Tse, KM., Kimura, S., Mizohata, E., Fujita, J., Horai, Y., Umezawa, N., Higuchi, T., Niitsu, M., Oshima, T., Imanaka, T., Inoue, T., Fujiwara, S.	4. 巻 284
2. 論文標題 Active site geometry of a novel aminopropyltransferase for biosynthesis of hyperthermophile-specific branched-chain polyamine.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 3684-3701
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.14262.	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 Hidese, R., Yamashita, K., Kawazuma, K., Kanai, T., Atomi, H., Imanaka, T., Fujiwara, S.	4. 巻 21
2. 論文標題 Gene regulation of two ferredoxin:NADP+ oxidoreductases by the redox-responsive regulator SurR in Thermococcus kodakarensis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Extremophiles	6. 最初と最後の頁 903-917
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00792-017-0952-0.	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 Hidese, R., Im, KH., Kobayashi, M., Niitsu, M., Furuchi, T., Fujiwara, S.	4. 巻 81
2. 論文標題 Identification of a novel acetylated form of branched-chain polyamine from a hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakarensis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1845-1849
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2017.1345616.	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 Fukuda, W., Yamori, Y., Hamakawa, M., Osaki, M., Fukuda, M., Hidese, R., Kanesaki, Y., Okamoto-Kainuma, A., Kato, S., Fujiwara, S.	4. 巻 52
2. 論文標題 Genes regulated by branched-chain polyamine in the hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakarensis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Amino acids	6. 最初と最後の頁 287-299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00726-019-02793-4.	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 Hidese, R., Toyoda, M., Yoshino, K.I., Fukuda, W., Wihardja, G.A., Kimura, S., Fujita, J., Niitsu, M., Oshima, T., Imanaka, T., Mizohata, E., Fujiwara, S.	4. 巻 286
2. 論文標題 The C-terminal flexible region of branched-chain polyamine synthase facilitates substrate specificity and catalysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 3926-3940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14949	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 Yamori, Y., Hamakawa, M., Hidese, R., Fukuda, M., Atomi, H., Fukuda, W., Fujiwara, S.	4. 巻 52
2. 論文標題 Branched-chain polyamine stabilizes RNA polymerase at elevated temperatures in hyperthermophiles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Amino acids	6. 最初と最後の頁 275-285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00726-019-02745-y	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 秀瀬涼太、榊原早津季、藤原伸介
2. 発表標題 超好熱性アーキアの硫黄転移に関わるユビキチン様タンパク質の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秀瀬涼太、榊原早津季、藤原伸介
2. 発表標題 超好熱性アーキアの含硫化合物への硫黄転移に関わるユビキチン様タンパク質の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017年度合同大阪大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 秀瀬 涼太, 榊原早津季, 藤原伸介
2. 発表標題 超好熱性アーキアの含硫化合物の硫黄転移に関わるユビキチン様タンパク質の機能解析
3. 学会等名 第18回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 秀瀬 涼太, 榊原早津季, 藤原伸介
2. 発表標題 超好熱性アーキアのモリブドプテリン生合成における硫黄転移系
3. 学会等名 第65回日本生化学会近畿支部 例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榊原 早津季, 秀瀬 涼太, 福田 青郎, 藤原 伸介
2. 発表標題 超熱性アーキアにおけるユビキチン様タンパク質の機能解析
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidese, R., Sakakibara, S., Ohira, T., Suzuki, T., Shigi, N., Fujiwara, S.
2. 発表標題 Physiological roles of Thermococcus kodakarensis ubiquitine-like protein in the biosynthesis of sulfur-containing biomolecules
3. 学会等名 Thermophile2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hidese, R., Fukuda, W., Niitsu, M., Fujiwara, S.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 512
3. 書名 Identification of branched-chain polyamines in hyperthermophiles.	

〔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
研究協力者	嶋 直樹 (Shigi Naoki)		
研究協力者	大平 高之 (Ohira Takayuki)		