

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05411

研究課題名（和文）アーキアにおけるヌクレオシド代謝機構の解明

研究課題名（英文）Identification of the nucleoside degradation system in Archaea

研究代表者

佐藤 喬章（Sato, Takaaki）

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：60571411

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：真核生物や細菌とは異なる第三の生物群を構成する微生物であるアーキアは、特有の代謝系を数多く有する。高温環境で生育する超好熱性アーキアの複数種はペントースビスリン酸経路という代謝系でヌクレオシドを分解する。一方、高塩濃度下で生育する好塩性アーキアはその経路の一部の遺伝子のみを有し、ヌクレオシド代謝系の詳細は不明であった。本研究では、遺伝子配置などのゲノム情報を基にして推定する方法や元株から活性を指標として酵素を精製する手法でヌクレオシド代謝経路を構成する酵素の候補を選抜した。それらの精製酵素を調製・解析して酵素活性を同定することにより好塩性アーキアにおける新規なヌクレオシド代謝系を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌や真核生物はヌクレオシドのリボース部位の分解にペントースリン酸経路を用いている。一方、多くのアーキアはその代謝経路を持たないが、超好熱性アーキアを含む複数種のアーキアはペントース“ビス”リン酸経路を用いてヌクレオシドを分解していることが分かっていた。本研究で明らかにした好塩性アーキアにおける新規ヌクレオシド代謝系は、前半部分はペントースビスリン酸経路と似ているものの、後半部分は特有の経路であり、これまでに代謝の中には登場しなかった新規反応も含まれていた。ヌクレオシドという生物にとって基幹的な分子ですら、その代謝系は各微生物によって異なっており、その多様性が本研究課題の結果により示された。

研究成果の概要（英文）：Archaea are microorganisms forming the third domain of life distinct from Eucarya and Bacteria. Archaeal members possess many unique metabolic pathways. Some hyperthermophilic archaea, growing at high temperature, utilize a pentose “bis” phosphate pathway to degrade nucleosides. However, a nucleoside degradation pathway has been unclear in many halophilic archaea which grow under high salt concentration and harbor a part of genes in the pentose bisphosphate pathway. In this study, we selected candidate enzymes to constitute a nucleoside metabolic pathway in the halophilic archaea by utilizing genomic information and by purifying an enzyme displaying relevant activity from cell extract of halophilic archaea. By identifying the enzyme activities of these enzymes, we could find out a previously unrecognized nucleoside degradation pathway in some halophilic archaea.

研究分野：分子微生物学、生化学

キーワード：アーキア ヌクレオシド 代謝

1. 研究開始当初の背景

アーキアとは真核生物やバクテリアとは異なる第三の生物群(ドメイン)を構成する微生物群であり、他のドメインのものとは異なる固有の代謝経路を数多く有している。例えば、真核生物やバクテリアは一般的にペントースリン酸経路により核酸の生合成やヌクレオシド代謝を行っているが、アーキアの多くはこの代謝経路を持たない。核酸の生合成については複数のアーキアがペントースリン酸経路の代わりにリブローズモノリン酸経路を利用していることが分かっている(1-3)。

一方、アーキアにおけるヌクレオシド代謝については永らく不明であったが、申請者らはこれまでに超好熱性アーキア *Thermococcus* におけるヌクレオシド代謝経路として、炭酸固定酵素ルビスコを含むペントース“ピス”リン酸経路を同定してきた(4-6)。ルビスコは植物などで光合成の暗反応を行うカルビン回路の鍵酵素としてよく知られている。本経路においてはヌクレオシドホスホリラーゼ(アデノシン・グアノシン・ウリジン)・ADP 依存的リボース-1-リン酸キナーゼ、リボース-1,5-ビスリン酸イソメラーゼおよびルビスコによってヌクレオシドのリボース部位が中央糖代謝の代謝中間産物である 3-ホスホグリセリン酸に変換される(図 1A)。また、AMP ホスホリラーゼ・リボース-1,5-ビスリン酸イソメラーゼ・ルビスコの 3 酵素は NMP 代謝経路を構成し、NMP を 3-ホスホグリセリン酸に変換する(図 1A)。さらに、ヌクレオシドホスホリラーゼ・ADP 依存的リボース-1-リン酸キナーゼ・AMP ホスホリラーゼの 3 酵素はヌクレオシドを NMP へ変換し得る。

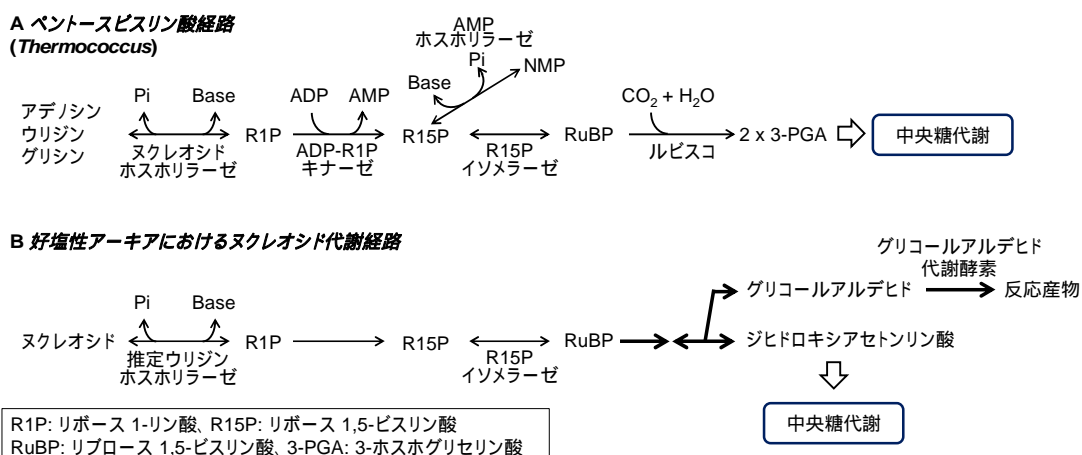


図 1. 超好熱性アーキア *Thermococcus* におけるヌクレオシド代謝経路・ペントースビスリン酸経路 (A) および好塩性アーキアにおける新規ヌクレオシド代謝経路

しかし、同じアーキアでも死海などの好塩濃度の環境下で生育している好塩性アーキアの中にはリボース-1,5-ビスリン酸イソメラーゼのホモログは有するものの、ADP 依存的リボース-1-リン酸キナーゼ・AMP ホスホリラーゼ・ルビスコのホモログは持たないものが多数存在し、これらのヌクレオシド代謝経路については依然として不明であった。特にルビスコが存在しないとリボース-1,5-ビスリン酸イソメラーゼの反応産物であるリブローズ 1,5-ビスリン酸が代謝できないことになる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、リボース-1,5-ビスリン酸イソメラーゼ遺伝子のみを単独で有する好塩性アーキアにおけるヌクレオシド代謝経路の解明を目的とした。

本研究課題を始めるまでに既に幾つかの実験を行い、代謝経路を明らかにしつつあった(論文投稿中)。まず、リボース-1,5-ビスリン酸イソメラーゼのホモログは確かにリボース 1,5-ビスリン酸の異性化を触媒した。本遺伝子とオペロンを形成する遺伝子や本遺伝子が存在する好塩性アーキアに特異的に存在する遺伝子に着目し、それらの解析を行った。その結果、リボース 1-リン酸を基質として代謝が進み、最終的にジヒドロキシアセトンリン酸およびグリコールアルデヒドを生成すると考えられた。ジヒドロキシアセトンリン酸は中央糖代謝で代謝され得るが、グリコールアルデヒドがどのように代謝されるか、また基質のリボース 1-リン酸がどのように生成するのかは不明であった。

そこで本研究課題では、リボース 1-リン酸を生成する酵素とグリコールアルデヒドを代謝する酵素の同定を行うことにより好塩性アーキアのヌクレオシド代謝の全容を解明することを目指した。また、好塩性アーキア細胞を用いて、ヌクレオシドの資化性や、ヌクレオシドによる本代謝経路構成遺伝子の発現制御が存在するのかについても明らかにすることにした。

3. 研究の方法

(1) 組換え型タンパク質の調製

大腸菌での発現ベクターを作製するため、好塩性アーキア由来の候補遺伝子を化学合成した。この際、大腸菌でのレオコドン減らし、また GC 含量も減らした遺伝子をデザインした。化学合成した遺伝子を発現用のベクターへと組み込み、発現ベクターを作製した。構築したベクターを大腸菌に導入し、イソプロピル- β -チオガラクトピラノシドを用いて発現を誘導した。リボース 1-リン酸生成酵素に関してはヒドロキシアパタイト相互作用カラムおよびゲル濾過カラムを用いたクロマトグラフィーにより精製した。グリコールアルデヒド代謝酵素に関しては、好塩性アーキア由来のネイティブ酵素はヒドロキシアパタイトカラムおよびゲル濾過カラム、大腸菌で調製した組換え型タンパク質は陰イオン交換カラムおよびゲル濾過カラムを用いた各種クロマトグラフィーにより精製した。精製度の確認は精製タンパク質溶液に含まれるタンパク質をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離し、クマシーブリリアントブルー (CBB) により染色して行った。

(2) ヌクレオシドホスホリラーゼ活性の測定

ヌクレオシドホスホリラーゼに関しては、反応産物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって解析し、反応で生成する核酸塩基を 260 nm の吸光をモニターして定量することにより活性を測定した。

(3) 好塩性アーキアの無細胞抽出液の作製

好塩性アーキアをヌクレオシドを添加した 25% NaCl 含有高塩濃度培地で培養し、遠心集菌した後、超音波破碎した。再度遠心を行い上清を無細胞抽出液とした。

(4) LC-MS 解析

好塩性アーキアから精製したタンパク質の同定は LC-MS 解析により行った。まず目的の活性を示すタンパク質を SDS-PAGE により分離し、銀染色を行った。目的タンパク質をゲルから切り出し、脱染色、還元、アルキル化、トリプシンによる消化処理を行った後、ゲルから抽出した。消化断片を LC-MS/MS により解析し、アミノ酸配列を決定した。

(5) グリコールアルデヒド代謝酵素の活性測定

グリコールアルデヒド代謝酵素については、生成物が吸光を示すことから、その吸光をモニターして生成物を定量することにより活性を測定した。

(6) グリコールアルデヒド代謝酵素をコードする遺伝子の転写量解析

ヌクレオシドを添加・非添加培地で培養した好塩性アーキアからトータル RNA を抽出し、逆転写酵素による cDNA への逆転写を行った。標的遺伝子内部に結合するプライマーを用いて、PCR を行い、反応産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、増幅断片の量を検討した。

4. 研究成果

(1) リボース 1-リン酸生成酵素の同定

リボース-1,5-ビスリン酸イソメラーゼ遺伝子とオペロンを形成する遺伝子の中で、ウリジンホスホリラーゼとアノテートされている遺伝子に着目した。アノテーション通りの機能を果たしたとすると、本酵素はウリジンの加リン酸分解によりリボース 1-リン酸とウラシルを生成すると考えられた。そこで、大腸菌を用いて 4 種の好塩性アーキア由来の組換え型タンパク質を調製した。4 種の内 2 種は封入体を形成し不溶性画分として得られた。一方で残り 2 種は可溶性画分に得られたため、その内の 1 種を各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、ほぼ単一となるまで精製した。

精製した酵素の各ヌクレオシドに対するホスホリラーゼ活性を検討した。その結果意外なことに、本酵素はウリジンに対してはほとんど活性を示さず、別のヌクレオシドに対して有意なホスホリラーゼ活性を示した。また本組換え型タンパク質の塩濃度依存性、反応温度依存性、pH 依存性などの酵素学的特性を明らかにした。さらに、速度論的解析を行い最も高い活性を示したヌクレオシドおよびリン酸に対する V_{max} および K_m の速度論的パラメーターを決定した。

次に、好塩性アーキアを培養し、無細胞抽出液を作製した。無細胞抽出液中の本酵素の活性を測定したところ、確かに活性を検出できた。これらにより、好塩性アーキアにおいてリボース 1-リン酸を産生している酵素を同定できた (図 1B)。

(2) グリコールアルデヒド代謝酵素の同定

まずゲノム情報を利用して候補遺伝子を探索した。ある種の好塩性アーキアにおいてヌクレオシド代謝経路を構成する他の遺伝子とオペロンを形成している候補遺伝子を見出した。本遺伝子は大腸菌で発現させ、組換え型タンパク質の解析を行おうと試みたが発現量が少なく、また精製が進まなかったことから、精製酵素の解析が行えなかった。そこで、好塩性アーキアの無細胞抽出液を用いて候補遺伝子

胞抽出液中からグリコールアルデヒド代謝活性を示すネイティブなタンパク質を精製した。その結果、活性を示すタンパク質をほぼ単一となるまで精製でき、また LC-MS 解析によりタンパク質を同定した。意外なことに、上記のゲノム情報から選抜した酵素とは異なるものであった。

また、本精製酵素の塩濃度依存性、反応温度依存性、pH 依存性などの酵素学的特性を明らかにした。さらに、速度論的解析を行い、グリコールアルデヒドに対する V_{max} および K_m の速度論的パラメーターを決定した。さらに、組換え型タンパク質も大腸菌を用いて調製し、精製を行い、同じレベルの活性を示すことを確認した。

本遺伝子はリボース-1,5-ビスリン酸イソメラーゼ遺伝子を単独で有する好塩性アーキアに特異的に分布しているわけではなかったが、少なくとも本実験に用いた好塩性アーキアにおいては本酵素がグリコールアルデヒド代謝に寄与していると考えられる (図 1B)。

(3) 好塩性アーキアの *in vivo* 解析

また、好塩性アーキアを培養している高塩濃度培地にヌクレオシドを添加して増殖が亢進するかを検討した。上記のヌクレオシドホスホリラーゼが基質とするヌクレオシドを添加するとわずかに増殖の増加が見られた。一方、培地にヌクレオシドを添加して上記のグリコールアルデヒド代謝酵素の遺伝子転写量を reverse transcription PCR (RT-PCR) により検討した。その結果、有意な遺伝子転写量の増加が観察され、本遺伝子がヌクレオシド代謝に寄与していることが示唆された。

以上のことから好塩性アーキアにおける新規なヌクレオシド代謝系を同定することができた (図 1B)。前半部分はペントースビスリン酸経路と似ているものの後半は特有の経路であった。ヌクレオシドは生命にとって基幹的な分子の一つであるが、その代謝経路は、微生物間はもちろんアーキアの中でも多様であることが示された。これらの結果をまとめた論文を現在投稿中である。論文が受理・公開され次第、本報告書については詳細についても記述したものにアップデートする。

(4) アーキア細胞における大規模ゲノム組換え系の構築

上記の様にアーキア間でも異なるタイプのヌクレオシド代謝経路を利用していることが分かった。これらの経路を丸ごと入れ替えることにより、その生理的意義にアプローチできると考え、一度に多数の遺伝子をアーキアゲノムに組み込むことができる系を構築した(7)。

< 引用文献 >

1. Kato, N., Yurimoto, H., and Thauer, R. K. (2006) The physiological role of the ribulose monophosphate pathway in bacteria and archaea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 10–21
2. Orita, I., Sato, T., Yurimoto, H., Kato, N., Atomi, H., Imanaka, T., and Sakai, Y. (2006) The ribulose monophosphate pathway substitutes for the missing pentose phosphate pathway in the archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *J. Bacteriol.* **188**, 4698-4704
3. Soderberg, T. (2005) Biosynthesis of ribose-5-phosphate and erythrose-4-phosphate in *Archaea*: a phylogenetic analysis of archaeal genomes. *Archaea* **1**, 347-352
4. Aono, R., Sato, T., Imanaka, T., and Atomi, H. (2015) A pentose bisphosphate pathway for nucleoside degradation in Archaea. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 355-360
5. Aono, R., Sato, T., Yano, A., Yoshida, S., Nishitani, Y., Miki, K., Imanaka, T., and Atomi, H. (2012) Enzymatic characterization of AMP phosphorylase and ribose-1,5-bisphosphate isomerase functioning in an archaeal AMP metabolic pathway. *J. Bacteriol.* **194**, 6847-6855
6. Sato, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2007) Archaeal type III RuBisCOs function in a pathway for AMP metabolism. *Science* **315**, 1003-1006
7. Sato, T., Takada, D., Itoh, T., Ohkuma, M., and Atomi, H. (2020) Integration of large heterologous DNA fragments into the genome of *Thermococcus kodakarensis*. *Extremophiles* **24**, 339-353

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sato T, Takada D, Itoh T, Ohkuma M, Atomi H	4. 巻 24
2. 論文標題 Integration of large heterologous DNA fragments into the genome of <i>Thermococcus kodakarensis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Extremophiles	6. 最初と最後の頁 339-353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00792-020-01159-z.	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 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤喬章
2. 発表標題 ゲノム情報を基盤としたアーキアにおける新規酵素の同定と利用
3. 学会等名 第20回酵素応用シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤喬章, 平田晃右, 南瞭子, 跡見晴幸
2. 発表標題 好塩性アーキアにおけるグリコールアルデヒド代謝酵素の同定と解析
3. 学会等名 第71回 日本生物工学会 大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤喬章
2. 発表標題 アーキア特異的な代謝に関わる新規酵素の同定
3. 学会等名 第82回 酵素工学研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 喬章、平田 晃右、南 瞭子、跡見 晴幸
2. 発表標題 好塩性アーキアHalobacterium salinarumにおけるグリコールアルデヒド還元酵素の同定
3. 学会等名 極限環境生物学会 2019年度年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田晃右、南瞭子、佐藤喬章、跡見晴幸
2. 発表標題 好塩性アーキアにおけるグリコールアルデヒド代謝酵素の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤喬章，法土咲菜恵，吉井祐太，南瞭子，平田晃右，神田脩一郎，野口綾子，真鍋良幸，深瀬浩一，跡見晴幸
2. 発表標題 好塩性アーキアにおける新規ヌクレオシド代謝経路の同定
3. 学会等名 酵素工学研究会 第80回講演会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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