

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02901

研究課題名(和文)原始的硫黄転移系の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis of ancestral sulfur relay system

研究代表者

秀瀬 涼太 (HIDESE, RYOTA)

神戸大学・先端バイオ工学研究センター・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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* が持つ3種類のユビキチン様タンパク質(Ubl) TK1065, TK1093, TK2118の機能を解析した。Ubl遺伝子欠損株を用いた解析により、すべてのUblは、モリブドプテリン(MPT)生合成に重要であることが明らかとなった。一方、生育環境中に硫黄が存在する場合、Ubl非依存の硫黄転移系がMPT生合成で機能することを示唆している結果を得た。また、Ublは、*T. kodakarensis* が持つ4-チオウリジン、2-チオシチジンの硫黄化には関与しないことを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。本研究では、好熱性アーキアが持つユビキチン様タンパク質の機能を明らかにしたものであり、原始生命体における硫黄転移系の分子機構の解明に向けた基盤的知見を与えるものである。本研究結果は、微生物学だけでなく、進化生物学的にも意義深い。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the functions of three ubiquitin-like proteins (Ubls) TK1065, TK1093, and TK2118 in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. Based on the phenotypic analysis of ubl deficient strains, all Ubls are involved in the MPT biosynthesis. On the other hand, we obtained the results that the Ubl-independent sulfur transfer system functions in MPT biosynthesis in sulfur environment. We also found that Ubl is not involved in the sulfurization of 4-thiouridine and 2-thiocytidine in *T. kodakarensis*.

研究分野：応用微生物学

キーワード：アーキア 硫黄転移 ユビキチン様タンパク質 モリブドプテリン tRNAチオヌクレオチド

1. 研究開始当初の背景

鉄硫黄クラスター、モリブドプテリン (MPT) (Mo を結合し補酵素として働く) tRNA のチオヌクレオシド (4-チオウリジンなど、タンパク質合成の正確性に寄与) など含硫化合物は、あらゆる生物の生命維持に必須である。これら含硫化合物の硫黄は一般的に L-システインに由来し、硫黄転移系を介して標的分子に付加される (図 1)。硫黄転移系は 3つのステップから成り、最初の反応は、システインデスルフララーゼ (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サルフィド (-S-SH) の形成である。次いで、このパーサルフィドが硫黄キャリアであるユビキチン様タンパク (Ubl) の C 末端に転移し Ubl チオカルボキシレートが形成する。最終的に Ubl 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 (Ubl 依存硫黄転移系)。

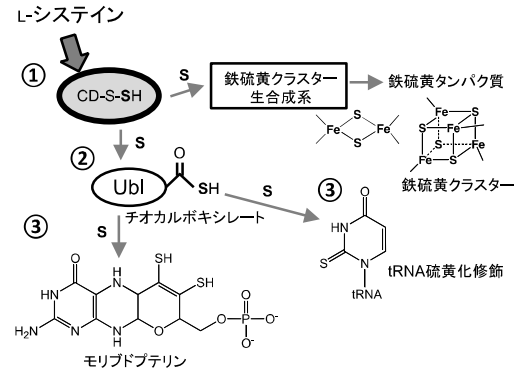


図 1. Ubl 依存硫黄転移系 (酵母、ヒト)

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サルフィド (-S-SH) の形成である。次いで、このパーサルフィドが硫黄キャリアであるユビキチン様タンパク (Ubl) の C 末端に転移し Ubl チオカルボキシレートが形成する。最終的に Ubl 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 (Ubl 依存硫黄転移系)。

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。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、デンプンやピルビン酸を代謝し、プロトンを受容体として水素発生型呼吸を行う (Archaea (2004) 1:263-267)。これまでに研究代表者は、*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合成系が働くため CD は必須ではないことを明らかにした (Mol. Microbiol. (2014) 93:331-345)。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と推察される。しかし、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、その実態は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、*T. kodakarensis* の Ubl オルソログ 3 種 (TK1065、TK1093、TK2118) の機能解明を目的とした。酵母や一部バクテリアでは Ubl は、硫黄転移系の硫黄キャリアーとして機能する他に、タンパク質の翻訳後修飾に関与することが明らかとなっている。まず、モリブドプテリン (MPT) 生合成における硫黄化における Ubl の役割を調べるため、*T. kodakarensis* 野生株及び遺伝子破壊株での MPT を介して合成される WCo (タングステンコファクター) 含有酵素活性や MPT 誘導体物の定量分析を行った。次に、*T. kodakarensis* が持つ tRNA チオヌクレオチドの硫黄化への Ubl の関与を解析した。また、Ubl によるタンパク質の翻訳後修飾を解析した。

3. 研究の方法

(1) Ubl 遺伝子破壊株の生育解析

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。元素硫黄非含有マルトデキストリン含有培地 (-S₀+MDX 培地) を使用した。

(2) モリブドプテリン含有酵素活性測定及びモリブドプテリン誘導体化物の定量分析

-S₀+ピルビン酸培地または+S₀培地で *T. kodakarensis* 野生株と各遺伝子破壊株 (ΔTK1065 株、ΔTK1093 株、ΔTK2118 株) 及び Ubl 全破壊株をそれぞれ 85°C で培養した。生育した菌体の無細胞抽出液の WCo 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) 活性は、嫌気チャンパー内 (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。

細胞内の MPT 含量を調べるため、+S₀ 培地および-S₀+ピルビン酸培地で *T. kodakarensis* 野生株及びΔTK1065 株、ΔTK1093 株、ΔTK2118 株、3 重遺伝子破壊株を塩酸で処理した後、酸抽出物をヨウ素で酸化し、MPT 誘導体化物を得た。MPT 誘導体化物を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計で解析した。

(3) tRNA チオヌ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、各種 *T. kodakarensis* 培養菌株から tRNA 画分を抽出し、tRNA ヌ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タンデム型質量分析計で解析した。

(4) Ubl によるタンパク質の翻訳後修飾

Ubl によるタンパク質の翻訳後修飾の有無を調べるため、TK1065, TK1093, TK2118 のそれぞれに特異的なポリクローナル抗体を作成した。-S₀+ピルビン酸培地または+S₀培地で *T. kodakarensis* 野生株及びΔTK1065 株、ΔTK1093 株、ΔTK2118 株、3 重遺伝子破壊株をそれぞれ 85°C で培養した。*T. kodakarensis* 細胞抽出液を使ってウェスタンブロット解析を行った。

4. 研究成果

(1) *T. kodakarensis* の糖代謝には WCo 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、デンプン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 (ΔTK1065、ΔTK1093、ΔTK2118 株) を -S₀+MDX 培地で 85°C (至適生育温度) で培養したところ、ΔTK1065 株は野生株と同等に生育した一方で、ΔTK1093 株は生育遅延を起こし、ΔTK2118 株は生育しなかった。次いで、+S₀培地でΔTK1065 株、ΔTK1093 株、ΔTK2118 株のそれぞれを 85°C で培養した。ΔTK1065 株及びΔTK2118 株は野生株と比べて同等に生育したが、ΔTK1093 株で野生株と比べてわずかな生育遅延が見られた。

(2) 元素硫黄を含む培地で培養した場合、各 Ubl 欠損株の WCo 含有酵素 (AOR、FOR) 活性は野生株のそれらと比べて同等であった。一方で、硫黄を含まない培地で培養した場合、各 Ubl 欠損株の WCo 含有酵素活性は野生株のそれと比べて減少した。次に、細胞の MPT 含量を調べるために *T. kodakarensis* 細胞の MPT を誘導化し、LC-MS/MS 解析に供した。この結果、

元素硫黄を含む培地の場合、野生株の MPT 含量と比べて各 Ubl 欠損株及び Ubl 全欠損株のそれは同等であった。一方で、元素硫黄を含まない場合、各 Ubl 欠損株及び Ubl 全欠損株の MPT 含量は野生株のそれと比較して減少した。これらの結果より、*T. kodakarensis* が持つ Ubl は、MPT 生合成に重要であることが明らかとなった。一方、硫黄が存在する環境では、Ubl 非依存の硫黄転移系が MPT 生合成に機能することを示唆している。以上の結果より、Ubl 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た。これらの経路は培地中の S_0 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。

(3)*T. kodakarensis* 細胞より tRNA 画分を抽出し、LC-MS/MS 解析に供した。この結果、4-チオウリジン、2-チオシチジンの硫黄修飾塩基を見出した。各 Ubl 欠損株の硫黄修飾塩基への硫黄化修飾率は、生育環境中の元素硫黄の存在の有無に関わらず、野生株と比べて同等であった。研究代表者らはこれまでに 5-メチル-2-チオウリジンが Ubl 依存的に合成されることを明らかにしている。一方で、4-チオウリジン、2-チオシチジンの硫黄化には、Ubl は関与しないことが明らかとなった。

(4) TK1065, TK1093, TK2118 に特異的に結合する抗体を利用してウェスタンブロット解析を行ったところ、Ubl の分子質量の上部にそれぞれの抗体に特異的なタンパク質バンドを検出した。それぞれの Ubl が翻訳後修飾に関わっていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	嶋 直樹 (SHIGI NAOKI) (20392623)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	
研究分担者	大平 高之 (OHIRA TAKAYUKI) (90727520)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教 (12601)	

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