

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06608

研究課題名(和文) TCA回路で形成される代謝酵素複合体の進化起源の解明

研究課題名(英文) The evolutionary origin of metabolon formed within the TCA cycle

研究代表者

亀谷 将史 (Kameya, Masafumi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：80748517

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)：rTCA回路を有する細菌の中で古くに他から分岐したAquificota門に属する *Hydrogenobacter thermophilus* を材料に、代謝複合体形成を検討した。ゲル濾過分画やアフィニティタグを利用した酵素間相互作用の *in vitro* 検出、またタンパク質間架橋処理やBN-PAGE、抗体による特異的検出などを行った。TCA回路で報告例のあるような強固な結合は検出されず、このような複合体形成はrTCA回路からの分岐後に独自進化したものである可能性が示唆された。一方、*in vitro* 解析では弱いながらも結合性を示す酵素もあり、特定の条件でタンパク質間相互作用が起こる可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代謝酵素複合体とは、ある代謝系を構成する酵素群が細胞内で形成する複合体である。TCA回路においても代謝酵素複合体が形成されることが知られているが、その進化的起源は明らかでない。TCA回路を逆回転させた二酸化炭素固定経路、reductive TCA (rTCA)回路はTCA回路の祖先型代謝と推定され、TCA回路という生物普遍的な代謝系の進化を理解する上で不可欠な存在である。本研究を通じて、rTCA回路における複合体形成を検証し、液液相分離など微弱なタンパク質間相互作用についての概念・研究手法を適用することでさらなる解明につながる結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We conducted an investigation into the formation of metabolons within the reductive tricarboxylic acid (rTCA) cycle of *Hydrogenobacter thermophilus*, a member of the Aquificota phylum, which represents an ancient lineage of bacteria. Our study involved the utilization of various techniques, including gel filtration, affinity tagging, cross-linking of associated proteins, BN-PAGE, and specific antibody detection of target enzymes. Despite previous reports of robust binding between specific enzymes in the tricarboxylic acid (TCA) cycle, we did not detect such interactions, suggesting that they may have evolved independently subsequent to the divergence from the rTCA cycle. However, certain enzymes exhibited weak associations in our *in vitro* analysis, implying the possibility of protein-protein interactions under specific conditions.

研究分野：代謝進化

キーワード：TCA回路 rTCA回路 代謝複合体 炭酸固定

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

代謝酵素複合体とは、ある代謝系を構成する酵素群が細胞内で形成する複合体である。複合体形成は、中間代謝物の拡散防止や共役反応の効率化、代謝制御などの効果をもたらす。代謝酵素複合体は解糖系や核酸合成系など多様な代謝系で見ついている。

TCA 回路 (Krebs 回路、クエン酸回路) は多くの生物の代謝で中心的な役割を果たす経路である。本回路でも、大腸菌や枯草菌、真核生物のミトコンドリアなどで、複数の酵素が結合し複合体を形成することが知られている。しかし、このように多岐にわたる生物が代謝酵素複合体を有するに至った進化過程は、まったく明らかになっていない。

二酸化炭素を唯一の炭素源とする独立栄養性生物の一部は、reductive TCA (rTCA) 回路と呼ばれる二酸化炭素固定経路を有する。rTCA 回路の発見当初、本回路は「TCA 回路の単なる逆回し」と見なされた。しかし rTCA 回路を有する好熱性細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* の生化学的解析により、rTCA 回路は炭酸固定方向に進むための独自の反応ステップや機構を有し、単なる TCA 回路の逆回しではないことが示された。この酵素学的知見から申請者は rTCA 回路が TCA 回路の祖先型代謝であることを提唱し、この仮説は他グループによる研究でも支持されている。

2. 研究の目的

本研究では TCA 回路における代謝複合体の進化起源を明らかにするため、まずその祖先型代謝経路である rTCA 回路における代謝酵素複合体の存在を検証し、形成が見られた場合はその複合体の構造機能解析を行うこととした。これにより、TCA 回路における代謝複合体が成立した進化過程や rTCA 回路との関係性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験材料として、rTCA 回路を有する細菌の中でもっとも古くに他から分岐した *Aquificota* 門に属し、rTCA 回路中酵素の生化学的研究が最も蓄積した菌である *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 を用いた。

代謝複合体検出のための古典的手法の一つとして、ゲル濾過クロマトグラフィーによる分画が知られる。本研究でも *H. thermophilus* の細胞抽出液を分画し、rTCA 回路中の各酵素が存在する画分を酵素活性測定により特定した。また、rTCA 回路中の酵素のうち 7 種それぞれに特異的に結合する抗体を作製し、各酵素の検出に用いた。さらに、特定の種類の抗体を用いた免疫沈降に供し、対象酵素以外のタンパク質が共沈殿しないかを検討した。

各種酵素にアフィニティタグを付加して異種発現系を構築し、得られた酵素を用いてタンパク質間相互作用の有無を検討した。また *H. thermophilus* の細胞抽出液にアフィニティタグ付き酵素を混合し、アフィニティ精製に供することで複合体の再構成および取得同定を試みた。

各種試料をタンパク質間架橋処理や BN-PAGE、2 次元電気泳動に供した後に抗体による特異的検出を行い、高分子領域に rTCA 回路中各酵素が検出されないかを検証した。

4. 研究成果

大腸菌の TCA 回路では、ゲル濾過分画でも分取可能な比較的強固な結合による複合体形成が報告されている。*H. thermophilus* の細胞抽出液で同様の実験を行ったところ有意な複合体形成は

検出されず、このような強固な結合による複合体は本菌の rTCA 回路酵素では形成されていないことが示唆された。また、複合体の *in vitro* 再構成系でもこれまで有意な相互作用は検出されず、rTCA 回路酵素間の複合体形成を示唆するデータは得られていない。この結果は、TCA 回路で報告例のあるような強固な結合に基づく複合体形成が、rTCA 回路からの分岐後に独自進化したものであることを支持する結果である。

一方、タンパク質間架橋処理や免疫沈降を利用した実験では、弱いながらも酵素間相互作用の存在が示唆された。本実験結果は、特定の条件下でタンパク質間相互作用が起こる可能性を示しており、近年研究の進んでいる液液相分離などの微弱なタンパク質間相互作用に関する概念・研究手法を適用することでさらなる解明につながる結果と言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masafumi Kameya, Soichiro Nakayama, Hiroyuki Arai, Masaharu Isii
2. 発表標題 Atypical sulfur assimilation and Cys synthesis in <i>Hydrogenobacter thermophilus</i>
3. 学会等名 Extremophiles 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 亀谷将史
2. 発表標題 水素細菌の特異な代謝とその利活用
3. 学会等名 第7回 SPIRITS生物-無機-有機融合化学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Masafumi Kameya, Hiroyuki Arai, and Masaharu Ishii	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 229
3. 書名 Electron-Based Bioscience and Biotechnology	

〔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	石井 正治 (Ishii Masaharu) (30193262)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授 (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
---------	---------