

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21274

研究課題名（和文）RNA起源説の核をなす酵素を欠損する大腸菌の構築によるDNA分子起源の再検証

研究課題名（英文）Revalidation of the origin of DNA molecules by constructing Escherichia coli deficient in the core enzyme of RNA origin theory

研究代表者

小川 順（Ogawa, Jun）

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70281102

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：すべての生物に共通でRNAからのDNA合成の鍵酵素である「リボヌクレオチド還元酵素（RNR）」を欠損する大腸菌の構築に成功した。本菌の栄養要求性を検討したところ、デオキシリボヌクレオシド（dNS）のうち、デオキシシチジン（dC）を要求し、さらに、数種のビタミン類を必要とすることが観察された。デオキシリボヌクレオシド合成経路の遺伝子を発現する破壊株を用いて、dNS合成能について評価したところ、デオキシウリジンの合成に成功したが、dCは合成できなかった。dNS要求性株を用いたバイオアッセイにより、新規デオキシリボヌクレオシド合成微生物を探索したが、新規経路を有する菌株は見出せなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原始地球上にRNAが最初に存在したと仮定するRNAワールド仮説は、広く信じられている。地球上のすべての生物は、リボヌクレオチドの還元反応によりDNAの構成分子を酵素合成する。本反応を触媒する酵素がribonucleotide reductase（RNR）であり、RNA仮説における「DNAはRNAに由来する」とする説の中核を担っている。本来必須遺伝子とされるRNR遺伝子を破壊し、かつ、新たなdNS生合成系により太古の自然環境に存在しえた化合物からDNAを生合成し生育しうる生物を構築できれば、DNAがRNAに由来するというRNA起源説に一石を投じるとともに、新たな生命分子起源説を提案しうる。

研究成果の概要（英文）：We have succeeded in constructing an E. coli that lacks ribonucleotide reductase (RNR), a key enzyme for DNA synthesis from RNA that is common to all organisms. When the nutrient requirements of this bacteria were examined, it was observed that it requires deoxycytidine (dC) among deoxyribonucleosides (dNS), as well as several vitamins.

When a disruption strain expressing a gene for the deoxyribonucleoside synthesis pathway was evaluated for its ability to synthesize dNS, it successfully synthesized deoxyuridine but not dC. Bioassays using dNS-requiring strains were used to search for novel deoxyribonucleoside-synthesizing microorganisms, but no strains with a novel pathway were found.

研究分野：応用微生物学

キーワード：デオキシリボヌクレオシド リボヌクレオチド還元酵素 DNA

1. 研究開始当初の背景

原始地球上に RNA が最初に存在したと仮定する RNA ワールド仮説は、広く信じられている。RNA ワールド仮説では、まず初めに RNA が誕生し、その後タンパク質・DNA が誕生したとされている。地球上のすべての生物は、リボヌクレオチドの還元反応により DNA の構成分子であるデオキシリボヌクレオチドを酵素合成する。本反応を触媒する酵素が ribonucleotide reductase (RNR) であり、RNA 仮説における「DNA は RNA に由来する」とする説の中核を担っている。

応募者は、dNS の酵素合成プロセス開発の過程で、可逆的な dNS 分解系として知られる代謝経路 (deo 経路; deo オペロンにコードされる) の各酵素の機能を活用することで、グルコース、アセトアルデヒド、核酸塩基という太古の地球環境に存在しえた単純な分子材料から dNS (DNA の構成単位) の生合成が可能となることを見いだした (図 1)。この知見は、「dNS がリボヌクレオチド以外の単純な分子材料から生合成されうる」という、基礎科学的に重要な知見として取り上げられた [1]。本知見を活用することで、本来必須遺伝子とされる RNR 遺伝子を破壊し、かつ、新たな dNS 生合成系により太古の自然環境に存在しえた化合物から DNA を生合成し生育しうる生物を構築できれば、DNA が RNA に由来するという RNA 起源説に一石を投げるとともに、新たな生命分子起源説 (DNA は独自の起源分子に由来する) を提案しうる。

2. 研究の目的

3 つの RNR 遺伝子 (*nrdAB*, *nrdEF*, *nrdDG*) を全て破壊した大腸菌を構築し、その生育を回復させる条件を検討する。また、RNR を介さない dNS 生合成経路を有する微生物の探索を行うことで、RNR を介さず dNS や DNA を生合成し生育する生物を見いだす。これにより、RNA 起源説に一石を投げ、新たな DNA 分子起源を提案することで、独自の生命分子起源仮説を提案することを目的とする。その成果は、抗ウイルス剤骨格等として産業的にも重要なデオキシリボヌクレオチド (dNS) の新規製法デザインの学術基盤としても有用である。

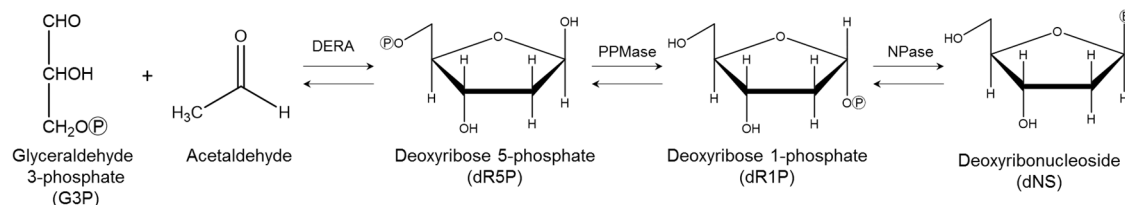


図 1 DERA 経路による dNS の生合成

DERA: Deoxyribose phosphate aldolase, PPMase: Phosphopentomutase, NPase: Nucleoside phosphorylase

3. 研究の方法

大腸菌が有する 3 つの RNR 遺伝子 (*nrdAB*, *nrdEF*, *nrdDG*) をすべて破壊し、DNA を供給する代替経路を導入することで、生育可能か検討する。DNA を供給する代替経路としては、応募者が見いだした deo 経路を検証する。しかし、deo 経路は本来 dNS の分解経路であり、DNA の供給にはこれまで見いだされていない未知の生合成経路の関与が予想される。そこで、リボヌクレオチド還元酵素不活性化状態での生育を担保しうる DNA 起源候補分子の選抜、さらには、これらの起源分子を基質とする新規 DNA 生合成経路を RNR 遺伝子破壊腸菌に導入することで、その機能検証を試みる。このように、「リボヌクレオチド還元酵素欠損大腸菌の構築」と「新規 DNA 合成経路の探索・機能検証」の成果を互いにフィードバックさせることで、生命分子起源における新たな仮説の提案を試みる。加えて、新規合成経路情報を dNS の製法デザインに展開する。

4. 研究成果

(1) RNR 遺伝子を全て破壊した大腸菌の構築と生育条件の検討

dNS を培地に添加することで、大腸菌 BW38029 株の *nrdAB*, *nrdEF*, *nrdDG* を相同組み換えにより破壊することに成功した。さらに、デオキシアデノシンキナーゼ遺伝子 *dak* を組込んだベクター-pCDF-Mmdak を導入して、形質転換株 $\Delta nrdAB/\Delta nrdEF/\Delta nrdDG$ (pCDF-Mmdak) を構築した。さらに、先行研究で見出された dNS 生合成酵素の遺伝子群である deo オペロンとピルビン酸をアセトアルデヒドに変換するピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 *pdc* を共発現する形質転換株 $\Delta nrdAB/\Delta nrdEF/\Delta nrdDG$ (pCDF-Mmdak/pBR deo/pACYC-pdc) を構築した。

また、 $\Delta nrdAB/\Delta nrdEF/\Delta nrdDG$ (pCDF-Mmdak) の栄養要求性を解析した。デオキシシチジン (dC) 0.05% を含む LB 培地で 37 °C、300 rpm で前培養した後、DNA の構成物質である dNS や カザミノ酸、ビタミンなどを添加した LB 培地や TB 培地、MOPS 培地で数日培養し、OD₆₀₀ を測定した。その結果、天然培地である LB 培地や TB 培地において、dC が生育に必要であることを明らかにした。本成果は論文として報告している [2]。また、MOPS 培地では、dC だけでなく

カザミノ酸や yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (YNB) が生育に必要であることを見いだした (図 2, 図 3)。また、Coenzyme B₁₂ (CoB₁₂) はそれだけでは生育を回復しないが、YNB が添加されている培地において、CoB₁₂ を添加することで、OD₆₀₀ の増加が観察された (図 3)

また、DERA 経路で dNS を供給した場合の生育条件を検討するために、 $\Delta nrdAB/\Delta nrdEF/\Delta nrdDG$ (pCDF-Mmdak/pBR-deo/pACYC-pdc) を LB 培地にグルコースやピルビン酸ナトリウムを様々な濃度で添加した培地で培養し、生育を評価したが、生育が回復する条件は見つからなかった。

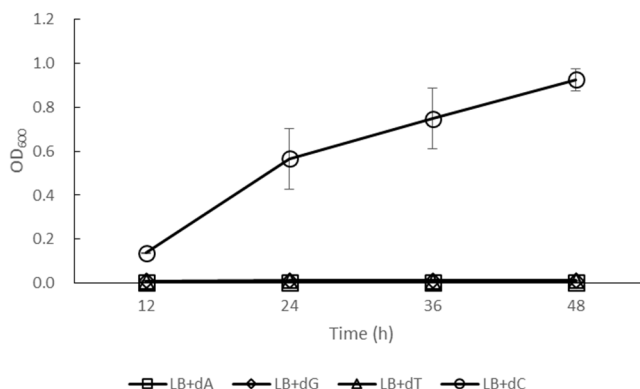


図 2 LB 培地での $\Delta nrdAB/\Delta nrdEF/\Delta nrdDG$ (pCDF-Mmdak) の生育

dA: デオキシアデノシン, dG: デオキシグアノシン,
dT: チミジン, dC: デオキシチジン

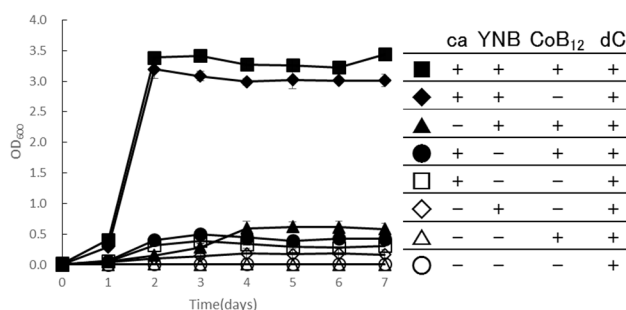


図 3 MOPS 培地での $\Delta nrdAB/\Delta nrdEF/\Delta nrdDG$ (pCDF-Mmdak) の生育

ca: カザミノ酸, YNB: yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate,
CoB₁₂: Coenzyme B₁₂, dC: デオキシチジン

(2) RNR を介さない dNS 生合成経路を有する微生物の探索

RNR を介さない新たな dNS 生合成経路を見出すために、2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPG) から脱炭酸反応で dR5P を生合成し、dR5P から dNS を生合成するような経路などを想定し、スクリーニングを行った。KDPG はアルギン酸代謝や、Entner-Doudoroff 経路の中間体であるため、アルギン酸や KDPG に構造に近いグルコン酸を基質として用い、集積培養法により、アルギン酸・グルコン酸資化性菌を取得した。そして、集積培養で単離した微生物の洗浄菌体に対して、基質としてグルコン酸や、シトシンなどを含む反応液を加え、28 °C, 1000 rpm で 24 時間反応させた。反応液中の dC の生成は、dC 要求性の $\Delta nrdAB/\Delta nrdEF/\Delta nrdDG$ (pCDF-Mmdak) を用いるバイオアッセイにより評価した。バイオアッセイによる評価後、dC が生成している可能性がある反応液について HPLC により生成物を確認したが、現在のところ RNR を介さずに dC を生成する微生物は見いだされていない。

[1] Poole, A.M., N. Horinouchi, R.J. Catchpole, D. Si, M. Hibi, K. Tanaka, **J. Ogawa**. "The Case for an Early Biological Origin of DNA." *J. Mol. Evol.*, 79(5-6), 204-212 (2014).

[2] Arras, S. D. M., N. Sibaeva, R. J. Catchpole, N. Horinouchi, D. Si, A. M. Rickerby, K. Deguchi, M. Hibi, K. Tanaka, M. Takeuchi, **J. Ogawa**, A. M. Poole. "Characterisation of an Escherichia coli line that completely lacks ribonucleotide reduction yields insights into the evolution of obligate intracellularly." *eLife*, in press (2023).

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 Arras, S. D. M., N. Sibaeva, R. J. Catchpole, N. Horinouchi, D. Si, A. M. Rickerby, K. Deguchi, M. Hibi, K. Tanaka, M. Takeuchi, J. Ogawa, A. M. Poole.	4. 巻 12
2. 論文標題 Characterisation of an Escherichia coli line that completely lacks ribonucleotide reduction yields insights into the evolution of obligate intracellularly.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e83845
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.83845	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 出口賢児、斯大勇、堀之内伸行、小園祥子、竹内道樹、日比慎、Anthony M. Poole、小川順
2. 発表標題 デオキシリボヌクレチド生合成経路遺伝子を破壊し代替経路を導入した大腸菌によるデオキシリボヌクレオシド生産の検討
3. 学会等名 酵素工学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 出口賢児、斯大勇、堀之内伸行、小園祥子、竹内道樹、日比慎、Anthony M. Poole、小川順
2. 発表標題 デオキシリボヌクレオチド生合成経路遺伝子を破壊した大腸菌の生育評価と代替経路導入の検証
3. 学会等名 農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 出口賢児、斯大勇、堀之内伸行、小園祥子、竹内道樹、日比慎、Anthony M. poole、小川順
2. 発表標題 Growth evaluation of Escherichia coli with knockout of deoxyribonucleotide synthetic pathway genes
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
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	竹内 道樹 (Takeuchi Michiki) (40766193)	京都大学・農学研究科・特定助教 (14301)	

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		
ニュージーランド	The University of Auckland		