

令和 3 年 4 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850049

研究課題名(和文)アーキアにおけるイノシトールキナーゼとリン酸化イノシトールの生理学的役割の解明

研究課題名(英文) Identification of the physiological role of inositol kinase and inositol monophosphate in Archaea

研究代表者

佐藤 喬章 (Sato, Takaaki)

京都大学・工学研究科・助教

研究者番号：60571411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アーキアにおけるmyo-イノシトールキナーゼの生理的役割の解明を目的とし研究を進めた。本研究では、本酵素がイノシトールの3位のヒドロキシル基をリン酸化していることを明らかにした。アーキアを含めた様々な生物でイノシトールはイノシトール-3-リン酸の状態でグルコース-6-リン酸から生合成され、適合溶質などの原料となる。また、本遺伝子の発現量や破壊株のin vivo解析からは本遺伝子が環境ストレスへの応答に寄与していることが示唆された。イノシトールがどのように生成するかは不明であるが、本酵素は何らかの代謝により生じるイノシトールを再びリン酸化して適合溶質などを生合成する役割があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原核生物においてはイノシトールという糖アルコールは環境変化に対応するための適合溶質の原料となったり、真核生物においてはシグナル伝達物質となったりする。原核生物であるアーキアにおいてイノシトールをリン酸化する酵素が見つかったが、一般的には適合溶質の生合成にリン酸化のステップはないことから、その生理的役割は不明であった。本研究では、酵素の解析や遺伝子破壊株を使った実験により、イノシトールをリン酸化する酵素の役割がやはり環境ストレスへの適応であることを示唆する知見を得た。適合溶質の生合成もしくは再生に関して今までは知られていなかった経路が存在することが示唆され、新たな研究への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to identify the physiological role of myo-inositol kinase and its product, myo-inositol phosphate, in Archaea. The reaction product of the archaeal inositol kinase was identified to be inositol 3-phosphate whose hydroxyl group at C3 position is phosphorylated among six hydroxyl groups. Inositol 3-phosphate is generally synthesized from glucose 6-phosphate, which can be the substrate to synthesize a compatible solute. In addition, in vivo analyses of its gene transcription levels and gene disruption strain suggested that this enzyme is involved in the response to environmental stress. These results obtained in this study suggested that the myo-inositol kinase phosphorylates an inositol, generated with some kind of metabolism, to synthesize compatible solutes.

研究分野：分子微生物学

キーワード：Inositol Kinase Archaea Hyperthermophile

1. 研究開始当初の背景

アーキアはバクテリアや真核生物とは異なる第三のドメインを構成する微生物群で、その多くは高温や高塩濃度といった極限環境下で生育している。また、アーキアは特有の代謝経路を数多く有する。申請者はこれまでに超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を研究題材として、アーキア特異的な AMP などの核酸を代謝する経路 (*Science* 315: 1003-6 [2009], *J. Bacteriol.* 194: 6847-55 [2012]) や核酸の前駆体を合成するリブローズモノリン酸経路 (*J. Bacteriol.* 188: 4698-704 [2006]) などの新規代謝経路の同定やそこで機能する新規酵素の機能解明を進めてきた。また、生体内における遺伝子機能を解析するための有効なツールとして、超好熱菌としては初となる遺伝子破壊系も構築してきた (*J. Bacteriol.* 185: 210-20 [2003], *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3889-99 [2005])。

研究開始当初、申請者らはゲノム解析において sugar kinase, ribokinase family と機能推定されていたがその基質や生体内における機能は不明であった TK2285 の解析を行い、*myo*-イノシトールキナーゼであることを同定した (*J. Biol. Chem.* 288: 20856-67 [2013])。これはアーキアにおけるイノシトールキナーゼとしては初めての同定例であった。しかしながらアーキアにおける既知の *myo*-イノシトール代謝 (膜脂質の合成や浸透圧・熱ショックに対応する適合溶質である di-*myo*-イノシトールリン酸[DIP]の合成など) において *myo*-イノシトールのリン酸化のステップは見当たらない。

2. 研究の目的

そこで、本研究では超好熱性アーキア *T. kodakarensis* を研究題材として アーキアにおけるイノシトールキナーゼおよびリン酸化イノシトールの生理学的役割の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) イノシトールキナーゼの反応産物同定

イノシトールキナーゼ(TK2285)がイノシトールのどの位置のヒドロキシル基をリン酸化しているかによって、予測される反応産物の代謝経路が変わってくる。ただし、これまでの LC-MS 解析によりリン酸化する位置は一つということが分かっていた (*J. Biol. Chem.* 288: 20856-67 [2013])。例えば 3 位のヒドロキシル基がリン酸化されている場合、膜脂質や適合溶質など、何らかの代謝産物から産生されるイノシトールをリン酸化して、中央糖代謝に戻したり、再び膜脂質や DIP の再合成に利用できるようになる。一方、3 位以外のヒドロキシル基をリン酸化している場合は、新規イノシトール化合物の合成やシグナル伝達物質として機能している可能性も考えられた。そこで、NMR 解析 ($^1\text{H-NMR}$, $^{31}\text{P-NMR}$ 、およびそれらの 2 次元 NMR 解析など) によりリン酸基の位置を絞り込んだ。イノシトールでは 1 位と 3 位および 4 位と 6 位の炭素に結合するヒドロキシル基は等価であるため、これらがリン酸化されていた場合は NMR 解析では最終的な同定は行えない。そこで、キラルカラムを用いた LC および MS による検出により最終的な同定を行った。さらに、ヒドロキシル基が欠けたイノシトール誘導体に対する活性測定解析も行った。

(2) イノシトールキナーゼの発現を活性化 する条件の検討

炭素源が異なる各種培養条件 (解糖・ピルビン酸を基質とした糖新生・硫黄およびアミノ酸をそれぞれ最終電子受容体および基質とした糖新生条件)、各種ストレス条件 (高塩濃度・高温条件) で *T. kodakarensis* を培養し、TK2285 の発現が活性化される条件を探索した。TK2285 タンパク質を抗原とする抗体を用いて Western blot 解析により発現量の変動を解析した。

(3) イノシトールキナーゼ遺伝子破壊株の作製および解析

TK2285 遺伝子破壊株を作製・解析し、増殖が抑制される培養条件を探索した。(2)および(3)の結果から、生体内で本遺伝子およびリン酸化イノシトールが機能している条件を検討した。

(4) DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子転写量変動の解析

DNA マイクロアレイを用いて全遺伝子の転写量変動を網羅的に解析した。1. 宿主とTK2285 遺伝子破壊株、2. 通常培地と *myo*-イノシトールを添加した培地、3. TK2285 の発現が活性化される培地と活性化されない培地、4. nucleoside 添加培地と非添加培地、などでの全遺伝子転写量を比較した。これらにより転写量の変動するイノシトール代謝関連遺伝子候補の探索を行った。

(5) メタボローム解析

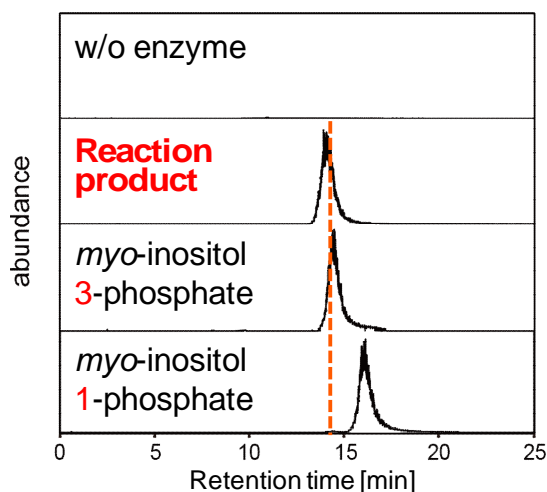
イノシトールキナーゼ遺伝子の発現が活性化される条件において宿主株およびイノシトールキナーゼ遺伝子破壊株を培養し、適合溶質を含む細胞内の低分子化合物を抽出した。抽出した化合物に対し、NMR および HPLC 解析を行った。宿主株特異的な化合物について LC-MS 解析を行い、その分子量を決定した。

最終的に全ての実験結果を総合的に判断し、アーキアにおけるイノシトールキナーゼの生理学的役割を予測した。

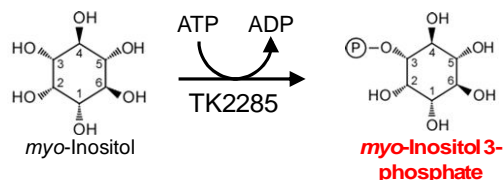
4. 研究成果

まず、超好熱性アーキア *T. kodakarensis* 由来のイノシトールキナーゼ (TK2285) がイノシトールのどの位置のヒドロキシル基をリン酸化しているかを同定した。TK2285 反応産物の NMR 解析により 1 位もしくは 3 位のヒドロキシル基をリン酸化しているこ

とが分かった。さらに、キラルカラムを用いた LC-MS 解析 (図 1) を行った結果、3 位がリン酸化されていることが明らかとなった。ヒドロキシル基が欠けたイノシトール誘導体に対する活性測定解析の結果もこれを支持した。これらにより、**本酵素はイノシトールの 3 位の炭素に結合したヒドロキシル基をリン酸化しており、反応産物は inositol 3-phosphate であることが明らかとなった** (図 2) (主な発表論文[1])。



(図 1) キラルカラムを用いた TK2285 反応産物の同定

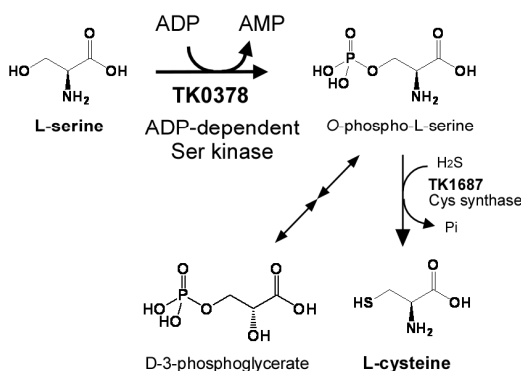


(図 2) TK2285 が触媒する酵素反応

また、本遺伝子の発現量が変化する培養条件を検討した結果、一般的に適合溶質が機能するような条件で発現量が増加することが分かった。また、*T. kodakarensis* において inositol kinase 遺伝子の破壊株を作製・解析し、その増殖特性解析を行った結果、上記の発現が活性化される条件において、遺伝子破壊株の細胞収量の減少が見られた。また、DNA マイクロアレイ解析の結果、遺伝子破壊株においては、細胞内タンパク質が変性した場合に機能するような遺伝子の転写が増

加していることが分かった。これらのことから **myo-イノシトールキナーゼは周辺環境の変化によるストレスに応答する機能を担っていることが示唆された。**

次にストレス応答機構を分子レベルで解明することを目指して、宿主株および遺伝子破壊株から適合溶質を含む化合物群を抽出した。抽出化合物群の HPLC 解析を進めた結果、**宿主特異的なピークが観察**され、本化合物の分離条件および吸光スペクトルを決定できた。分離した化合物の NMR 解析の結果、Ser である可能性も考えられたため、Ser 生合成および代謝経路の解明を進めた。その結果、Ser の代謝には本酵素とは異なる ADP-dependent serine kinase (TK0378) が関与していることが明らかとなった (図 3) (主な発表論文[2])



(図 3) ADP-dependent serine kinase

そこで再度、宿主特異的に検出される化合物の同定を目指し、LC-MS 解析を行った。その結果、分子量を同定できたが、一般的な適合溶質の分子量とは一致しなかった。本化合物の詳細な化学構造の同定は継続して行っている。

以上の結果より、超好熱性アーキア *T. kodakarensis* における myo-イノシトールキナーゼは、何らかの代謝により生成した myo-イノシトールの 3 位のヒドロキシル基をリン酸化して本来の代謝経路に戻す、つまりサルベージの役割を担っていることが明らかとなった。さらに細胞周辺の環境変化によるス

トレスに対する応答に寄与していることが示唆されたことから、適合溶質の生合成に寄与している可能性が高いと考えられる。適合溶質の生合成もしくは再生に関して今までは知られていなかった経路が存在することが示唆され、新たな研究への展開が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

(1) Nagata R, Fujihashi M, Sato T, Atomi H, Miki K. Crystal structure and product analysis of an archaeal myo-inositol kinase reveal substrate recognition mode and 3-OH phosphorylation. *Biochemistry* 2015; 54: 3494-3503. DOI 10.1021/acs.biochem.5b00296. (査読有)

(2) Makino Y, Sato T, Kawamura H, Hachisuka SI, Takeno R, Imanaka T, and Atomi H. An archaeal ADP-dependent serine kinase involved in cysteine biosynthesis and serine metabolism. *Nat. Commun.* 2016; 7: 13446. DOI 10.1038/ncomms13446. (査読有)

[学会発表](計 6 件)

(1) Takaaki Sato, Riku Aono, Masahiro Fujihashi, Yukika Miyamoto, Keiko Kuwata, Eriko Kusaka, Haruo Fujita, Kunio Miki, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, Functional characterization of three ribokinase family proteins in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*, American Society for Microbiology 114th General Meeting, 18th May, 2014, Boston, USA.

(2) Takaaki Sato, Riku Aono, Sanae Hodo, Yuta Yoshii, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, Novel metabolic pathways in Archaea, 2014 Korean Society for Microbiology and Biotechnology International Symposium & Annual Meeting, 26th June, 2014, Busan, Korea.

(3) 佐藤喬章, 青野陸, 藤橋雅宏, 宮本幸花, 桑田啓子, 日下絵里子, 藤田春雄, 三木邦夫, 今中忠行, 跡見晴幸, 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における ribokinase family タンパク質の機能解明、第 66 回 日本生物工学会、2014 年 9 月 10 日、札幌コンベンションセンター

(4) 佐藤喬章、超好熱性アーキアにおける新規ペントース代謝経路の同定、第 16 回 極限環境生物学会、2015 年 11 月 9 日、東京海洋大学 品川キャンパス

(5) Takaaki Sato, Riku Aono, Masahiro Fujihashi, Yukika Miyamoto, Keiko Kuwata, Eriko Kusaka, Haruo Fujita, Kunio Miki, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, Functional characterization of three ribokinase family proteins in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*, The 14th China-Japan-Korea Symposium on Enzyme Engineering, 17th November, 2016, Guangxi Wharton International Hotel, Nanning, China

(6) 佐藤喬章, 藤橋雅宏, 宮本幸花, 永田隆平, 宮本幸花, 桑田啓子, 日下絵里子, 藤田春雄, 三木邦夫, 跡見晴幸, 超好熱性アーキアにおける *myo*-inositol kinase の同定と解析、第 17 回 極限環境生物学会、2016 年 11 月 26 日、東京工業大学すずかけ台キャンパス

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 喬章 (SATO, Takaaki)
京都大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号 : 6 0 5 7 1 4 1 1