

**京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書**

平成30年4月26日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 辻 井 昭 雄 様

所 属 部 局 工学研究科 合成・生物化学専攻

職 名 助 教

氏 名 佐 藤 喬 章

助 成 の 種 類	平成29年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究課題名	補酵素から探る原始的代謝			
上記以外で助成金を 充当した 研究内容				
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) 京都大学工学研究科 合成・生物化学専攻・大学院生(博士後期課程)・蜂須賀真一			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等)			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		抗体作製費用	95,040	
		卓上遠心機・静音マウス他	66,117	
		オリゴDNAなど	453	
		学会参加費用	157,060	
		組換え型酵素調製費(見込)	245,000	
活性測定試薬(見込)		281,330		
遺伝子破壊株作製費(見込)	155,000			
当財団の助成に ついて	<p>本助成制度のおかげで科研費がない期間も研究活動を続けることができ、大変感謝しております。お陰様で2018年度は科研費を取得することができました。科研費の取得も厳しくなっていると思われまますので、本助成事業は京都大学の研究者を支える素晴らしい助成制度だと思います。ぜひこれからも継続して頂ければと思っております。</p> <p>成果報告書の公開に関してですが、研究成果を世に発信することは大変重要ですが、論文として出版されてから公開するのが望ましいかと思ひます。よって公開は採択年度終了から2年以内にするなどの措置を設ければ、よりよい助成金制度になるのではないかと思ひました。ご検討のほどよろしくお願ひ申し上げます。</p>			

成果の概要

補酵素から探る原始的代謝

工学研究科 合成・生物化学専攻 佐藤喬章

アーキアは真核生物やバクテリアとは異なる第三の生物群を構成する、微生物である。バクテリアと同じ原核生物であり、形態はよく似ているものの、その代謝については真核生物はもちろんバクテリアのものとも異なることが多いことが分かっている。よって、アーキアの代謝を研究することで新規な酵素や新規な代謝経路を発見できることが期待できる。

また、アーキアは高温・高塩濃度・酸性/アルカリ性などと言った極限的な環境で生育する微生物を多く含むのも特徴である。本研究ではアーキアの中でも 85℃というヒトは生育できないような環境で生育する超好熱菌と呼ばれる微生物を対象とする。超好熱菌は一般的に、生命を分類する進化系統樹において根の近傍に位置することや、遺伝子数が少ないこと、さらにその生育環境が原始の地球環境に似ていること（高温・嫌気）などから、現存する生物の中では生命の原型に近い存在だと考えられている。よって超好熱性アーキアを研究することで生命進化についての知見を得られる可能性があり、学術的に興味深い研究題材と言える。さらに、超好熱菌由来のタンパク質はほぼ全て耐熱性を有しており、有用物質の生産に関わる酵素であれば、工業的な応用も考えられる。

本研究では代謝の中でも、リポ酸の生合成に着目した。リポ酸とは、生命にとって重要な補酵素の一つであり、グリシンにヒドロキシメチル基を付加してセリンを生合成するグリシン開裂系などで機能する。また抗酸化作用を示すことからサプリメントとしての利用も期待されている。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* はリポ酸を含まない培地で増殖できることから、自らリポ酸を生合成できると考えられる。しかし、そのゲノム上の遺伝子を調べると既知のリポ酸生合成経路の遺伝子群がそろっておらず、どのように生合成しているのかは不明であった。そこで本研究では、リポ酸生合成遺伝子の同定を目的とした。

申請者らはリポ酸生合成遺伝子の候補として、かつてはあるビタミンの生合成において機能すると考えられていた2つの遺伝子（以降、遺伝子 A および B とする）に着目した。というのも、このビタミンの生合成にはこの2つの遺伝子の他にも3つの遺伝子が必要であるが、それらは本菌のゲノム上には存在しないことが分かっていた。つまり遺伝子 A と B だけではこのビタミンは生合成できないことから、この2つの遺伝子には他の機能がある可能性が予測された。そこで、これらの遺伝子について比較ゲノム解析を行った。具体的には、様々なアーキアのゲノムを比較し、遺伝子 A と B の相同遺伝子の周辺にある共通の遺伝子を調べた（隣接しているか、もしくは周辺に存在する遺伝子は機能的に関連している可能性がある）。その結果、遺伝子 A と B の周辺にはリポ酸に関わる遺伝子が分布していた。

そこで遺伝子 A および遺伝子 B をそれぞれ破壊した株、および両方の遺伝子とも破壊した二重破壊株を作製した。遺伝子を破壊する前の宿主株および計3種の破壊株の合成培地におけ

る増殖特性を解析した。その結果、リポ酸を含まない培地において、宿主は増殖したのに対し、いずれの遺伝子破壊株も増殖を示さなかった。またリポ酸を添加することにより破壊株の増殖は相補され、リポ酸要求性を示すことが分かった。このことから、遺伝子 A および B はリポ酸生合成に寄与していることを明らかにできた。

上述のグリシン開裂系においてリポ酸は H タンパク質と呼ばれるタンパク質に結合して機能している。そこで、宿主株および各遺伝子破壊株における H タンパク質にリポ酸が結合しているかを調べた。まず、H タンパク質を解析するために H タンパク質を認識できる抗体を作製した。H タンパク質の組換え型タンパク質を大腸菌で発現・精製し、それを抗原として抗体を作製した。その抗体を用いて宿主株および各遺伝子破壊株の無細胞抽出液中のタンパク質に対してウェスタンブロット解析を行い、H タンパク質を検出した。その結果、全ての株において何も結合していない H タンパク質を示すと思われるシグナルが検出された。また、H タンパク質より少し分子量の大きいシグナルが宿主株においてのみ検出され、これはリポ酸が結合している H タンパク質だと予測された。一方、各遺伝子破壊株ではこのシグナルが検出されず、やはりリポ酸の生合成経路が遮断されていることを確認できた。

今後は、この遺伝子 A および B がコードする組換え型タンパク質を大腸菌で調製後、精製し、*in vitro* 解析によりどのような反応を触媒しているかを検討していく。また、リポ酸生合成に関わる可能性のある他の遺伝子についても、遺伝子破壊株の作製・解析、その組換え型タンパク質の *in vitro* 解析を行っていき、それらの成果を一つの論文としてまとめる予定である。