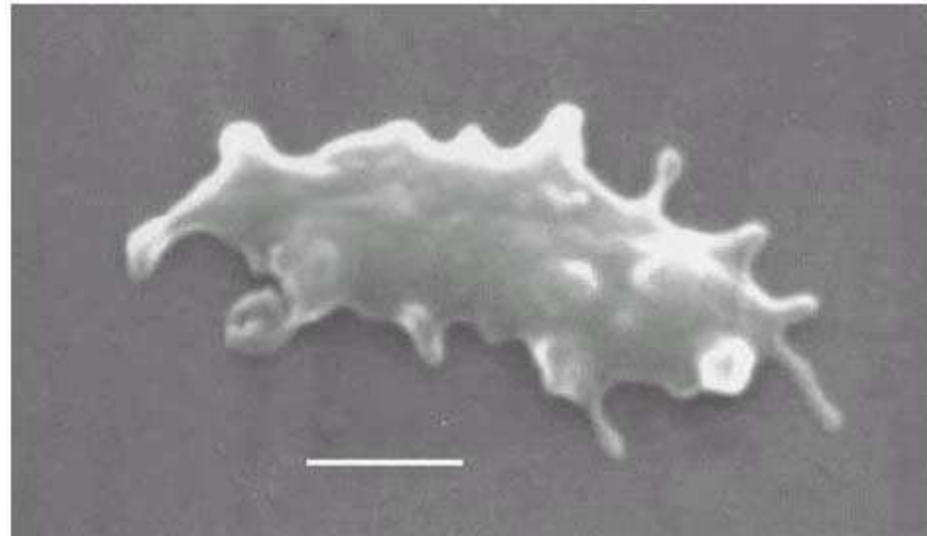


Thermoplasma acidophilum Thi1の
4-Thiouridine合成反応における
真の基質の特定

応用生物化学研究室
山崎颯太

▶ *Thermoplasma acidophilum*



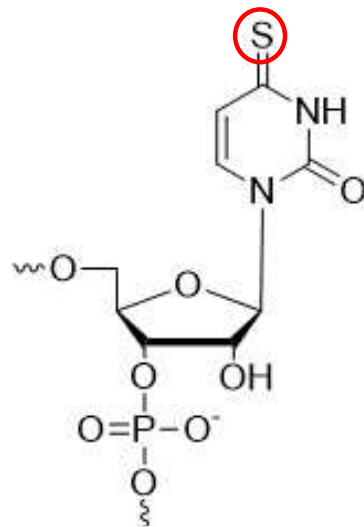
Thermoplasma acidophilum

好熱好酸性古細菌
至適生育温度 56°C
至適pH 1.8

高濃度の硫化水素が存在する環境に生息

4-Thiouridine (s⁴U)

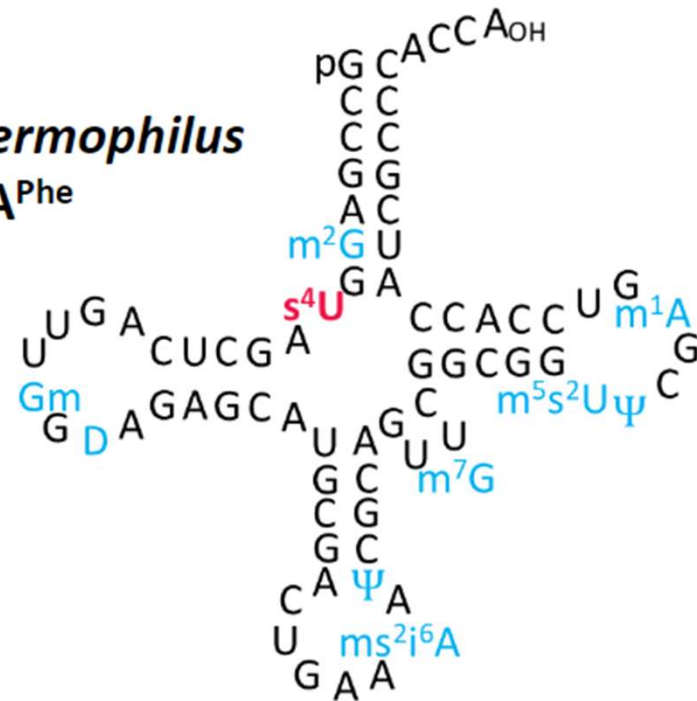
Uridineの4位の酸素原子が硫黄原子Sに置換された修飾ヌクレオシド



s⁴U

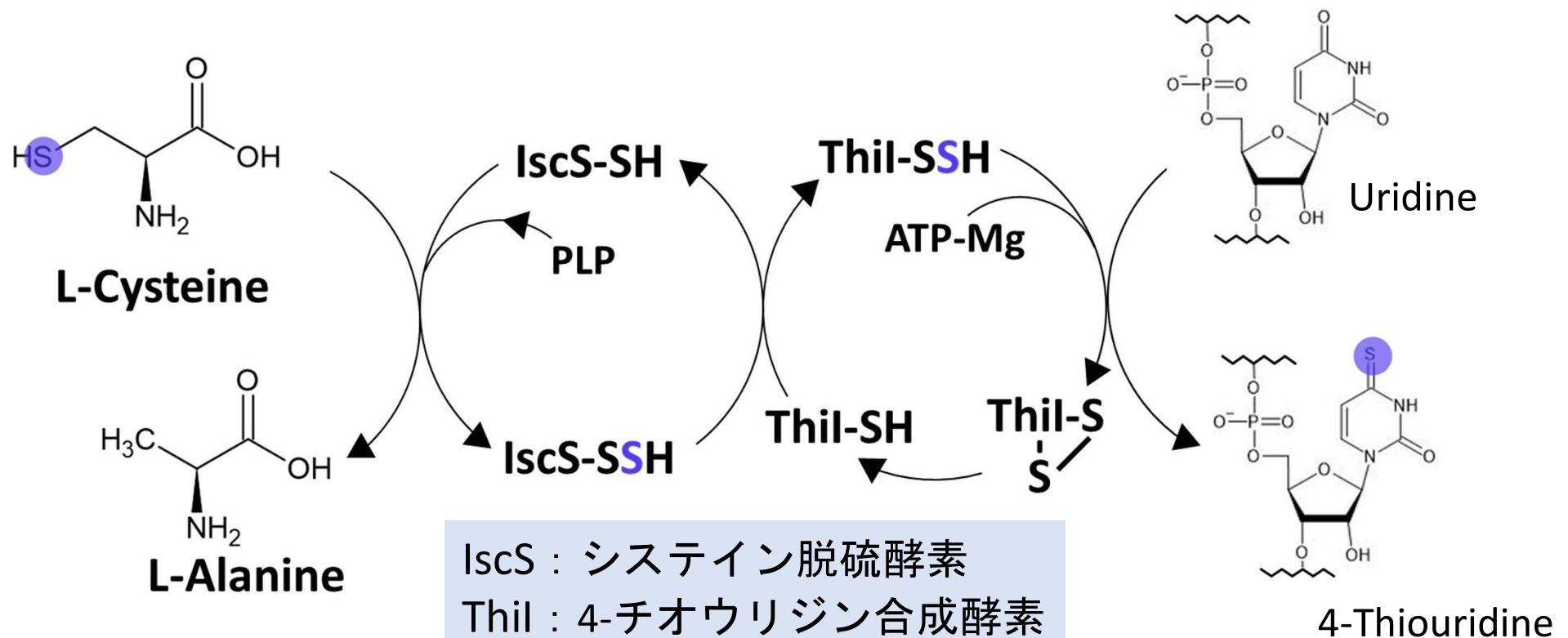
Ex.

Thermus thermophilus
tRNA^{Phe}



- 真正細菌とアーキアのtRNAの8位に主に見られる
- 生体内では、tRNAの立体構造の安定化、紫外線センサーなどの役割

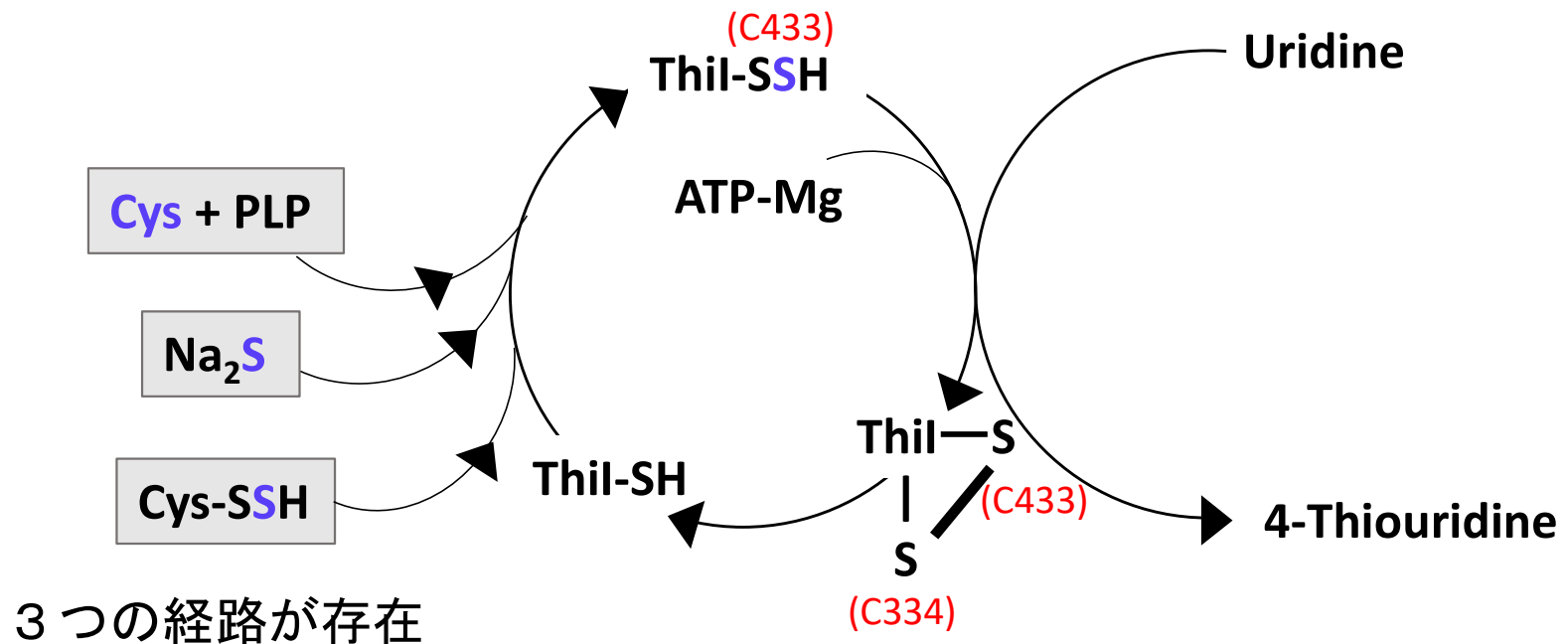
▶ 真正細菌 *Escherichia coli* における s^4U 合成経路



Escherichia coli における s^4U 合成経路

多くの古細菌ではゲノムに *iscS* がコードされていないため、古細菌の s^4U 合成経路の詳細は不明な点が多い

前任者が提案した *Thermoplasma acidophilum* の s⁴U 合成経路



Thil : 4-チオウリジン合成酵素

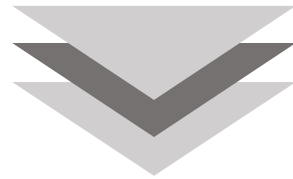
*Thermoplasma acidophilum*におけるs⁴U合成経路

▶ 研究の目的

Cys + PLPと $\text{Na}_2\text{S}(\text{HS}^-)$ のどちらが主経路なのか？

※Cys-SSHについては古細菌細胞内で存在していないと考えられるため除外

*Thermoplasma acidophilum*の s^4U 合成反応
における真の基質の特定



反応速度論解析を行う

01

*T.a.Thi*lの精製

02

$s^4\text{U}$ 合成タイムコースの測定

03

Na_2S 濃度の反応速度論解析

01

*T.a.Thi*lの精製

02

$s^4\text{U}$ 合成タイムコースの測定

03

Na_2S 濃度の反応速度論解析

▶ *Thermoplasma acidophilum* ThiI の精製

前任者が作製した
ものを使用

Thermoplasma acidophilum ThiI を
発現させた大腸菌 1.3 g

超音波破碎 & 加熱処理

陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

アフィニティークロマトグラフィー

サイズ除去カラムクロマトグラフィー

精製 *Thermoplasma acidophilum* ThiI
6.82 mg

[kDa]

70
55
40



54 KDa

15% SDS-PAGE
CBB染色

01

*T.a.Thi*lの精製

02

$s^4\text{U}$ 合成タイムコースの測定

03

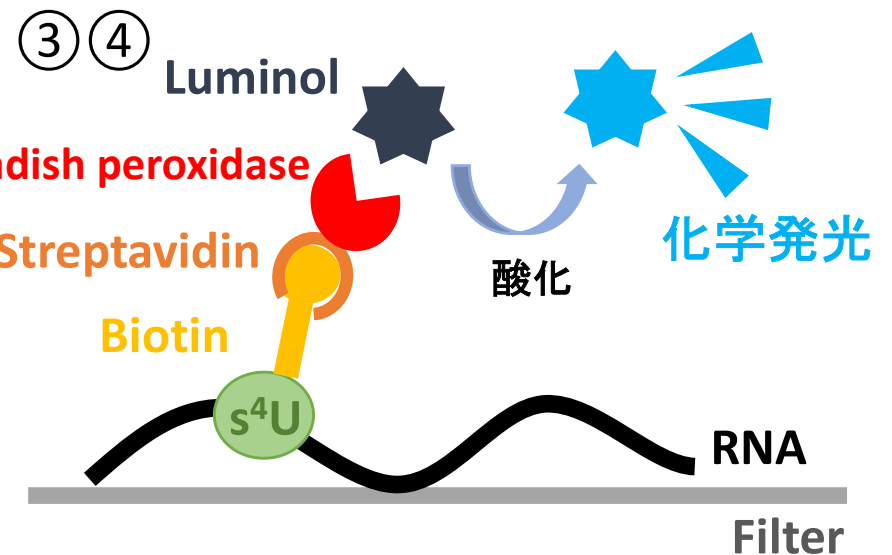
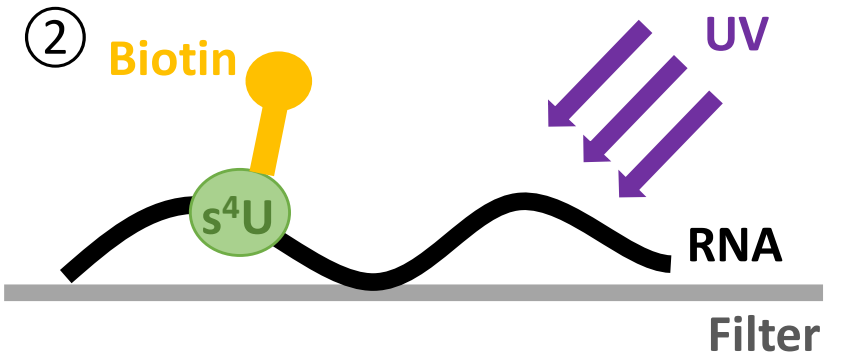
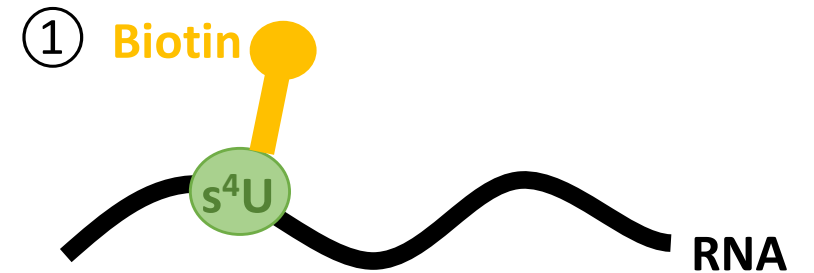
Na_2S 濃度の反応速度論解析

▶ 化学発光を用いたs⁴U検出法

前任者が開発したs⁴U検出法 (SITH)

SUGIO YUZURU *et al.* (2023) *RNA* 29:241-251

- ① MTSEA Biotin-XXを用いてビオチン化
- ② UVでフィルター上にRNAを固定
- ③ s⁴U-BiotinとStreptavidin-HRPが結合
- ④ Luminolの酸化により化学発光



▶ s⁴Uの定量方法

Linear - s⁴U RNA

5'- GGGACGCGs⁴UGCGCAAAGGCAGACCAGGACAGCGCAG -3'

希釈系列を作製し、サンプルと同時に化学発光を測定する



検量線を作成

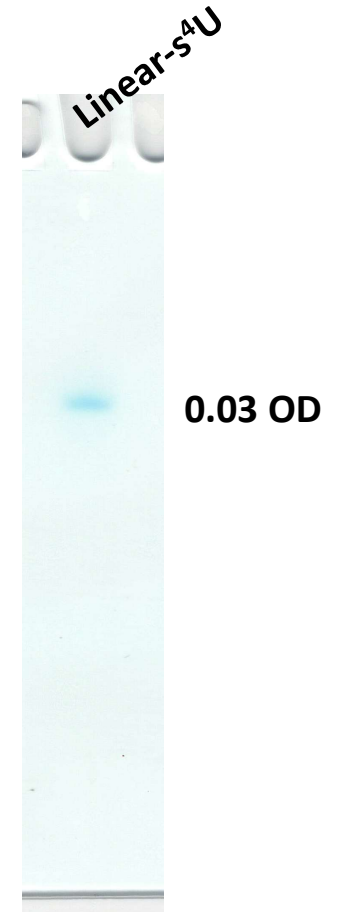


サンプル中のs⁴Uを定量

例

Sample

Linear-s⁴U



試験管内でT7 RNA polymeraseとs⁴UTPを用いて合成した

10% PAGE (7 M UREA)
メチレンブルー染色

▶ Na₂Sを用いてs⁴U合成反応を行った

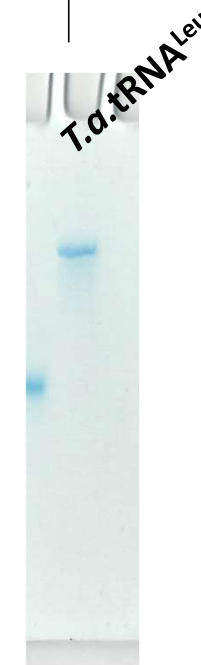
s ⁴ U合成反応溶液	f.c.
10x Buffer	1x
ATP	2 mM
Na ₂ S	1 mM
<i>T.a.</i> tRNA ^{Leu}	10 μM
<i>T.a.</i> Thil	0.5 μM
MilliQ fill up to	20 μL

1x Buffer	
Tris-HCl (pH 7.6)	50 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	5 mM
2-mercapto-EtOH	0.1 mM

前任者が精製した
ものを使用

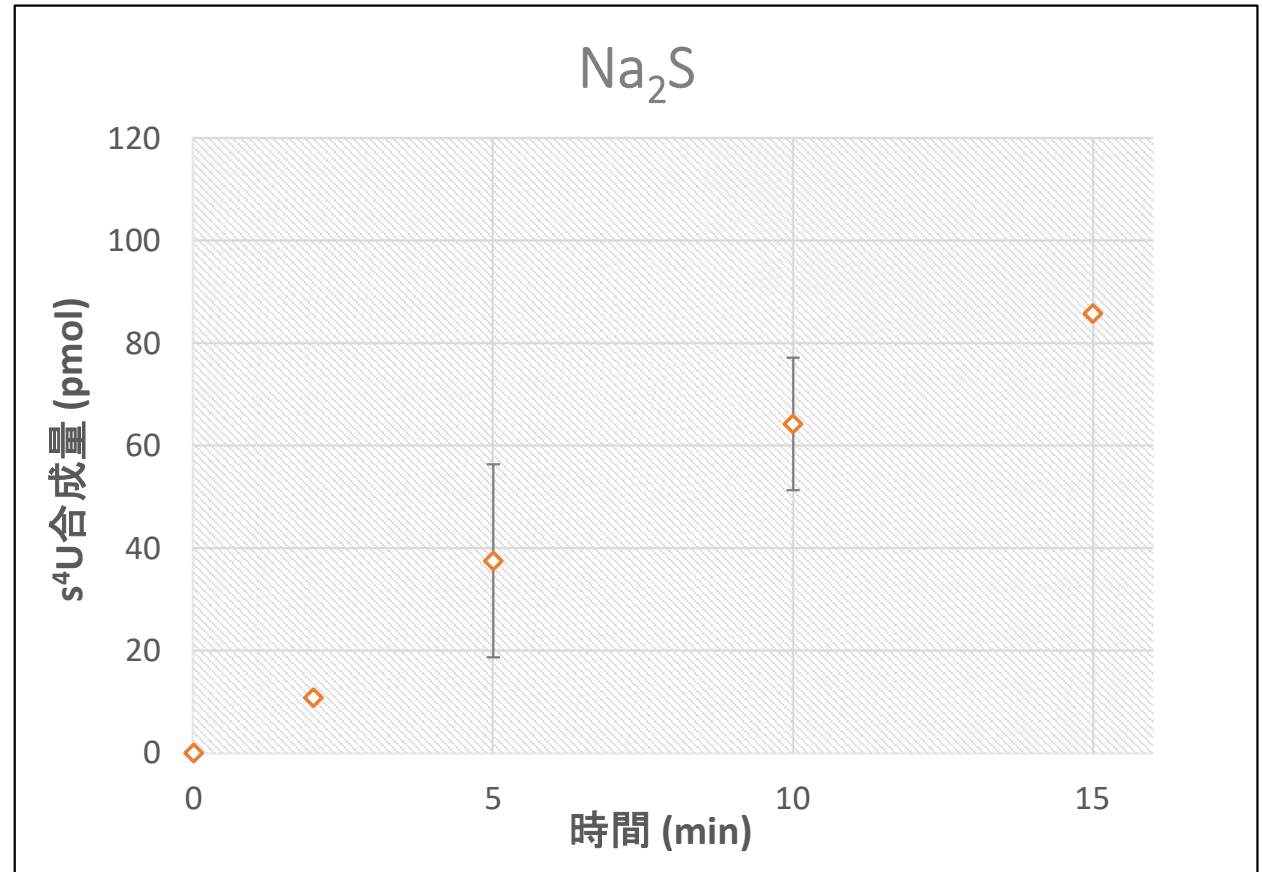
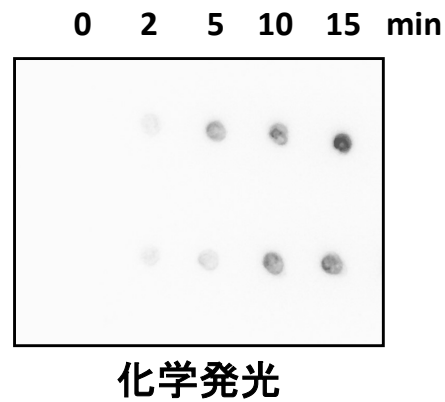
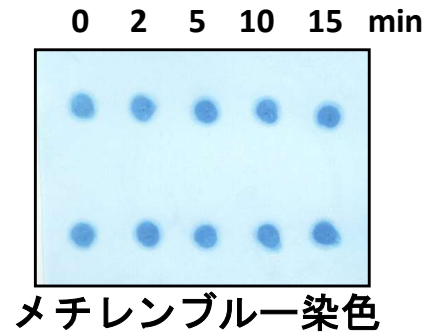
56°C インキュベート
*T.a.*Thilを入れて反応開始
0,2,5,10,15 minのタイムコースを測定

↓
SITHを用いてs⁴Uの化学発光を検出



10% PAGE (7 M UREA)
メチレンブルー染色

▶ SITHを用いて化学発光を測定した



0~15 minで直線的にs⁴U合成量が上昇

▶ L-Cysteine + PLPを用いてs⁴U合成反応を行った

s ⁴ U合成反応溶液	f.c.
10x Buffer	1x
ATP	2 mM
L-Cysteine	1 mM
Pyridoxal phosphate	1 mM
<i>T.a.</i> tRNA ^{Leu}	10 μM
<i>T.a.</i> Thil	0.5 μM
MilliQ fill up to	20 μL

1x Buffer	
Tris-HCl (pH 7.6)	50 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	5 mM
2-mercapto-EtOH	0.1 mM

56°C インキュベート

*T.a.*Thilを入れて反応開始

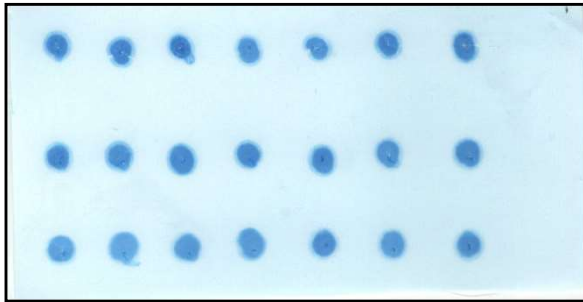
0,1,2,5,7.5,10,15 minのタイムコースを測定



SITHを用いてs⁴Uの化学発光を検出

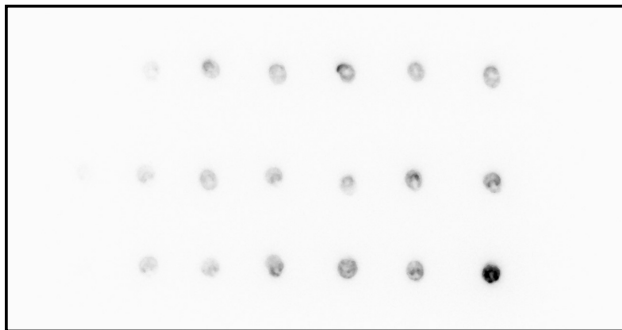
▶ SITHを用いて化学発光を測定した

0 1 2 5 7.5 10 15 min

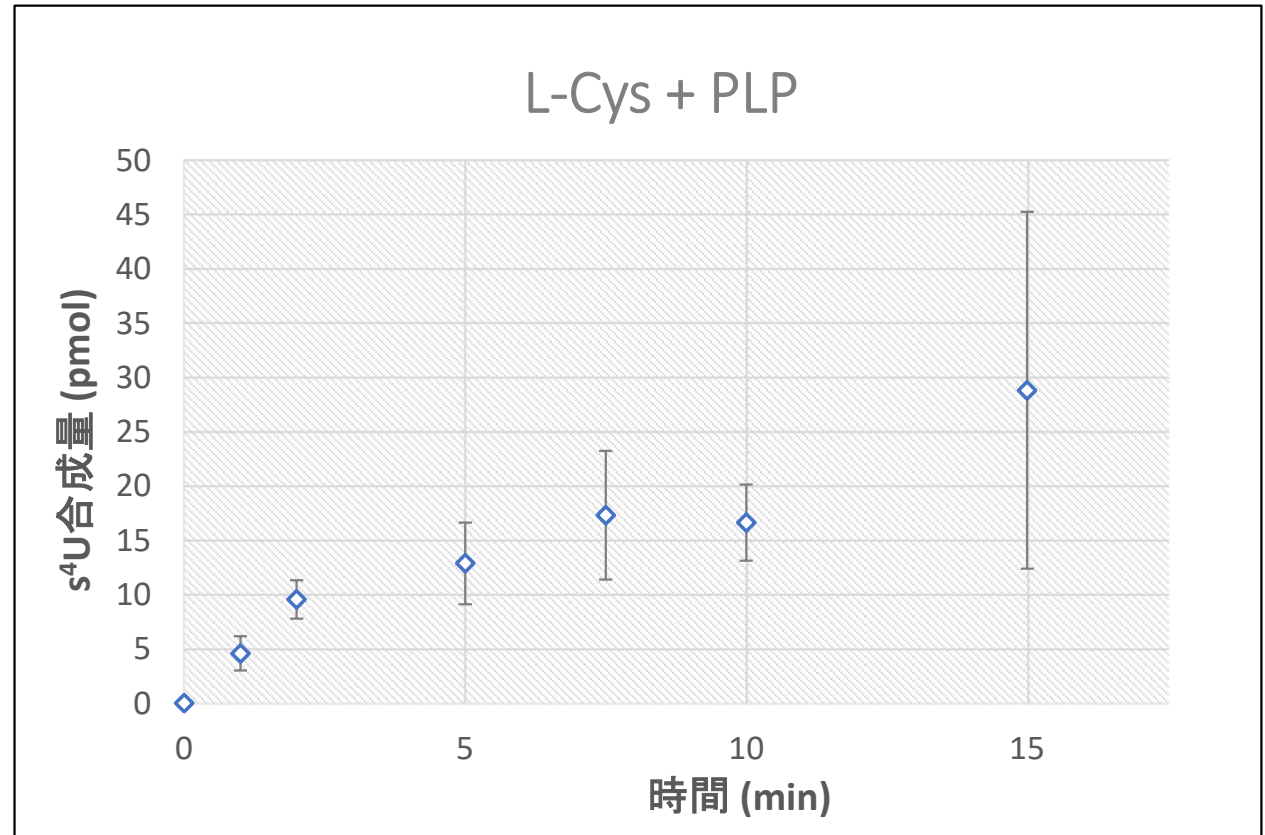


メチレンブルー染色

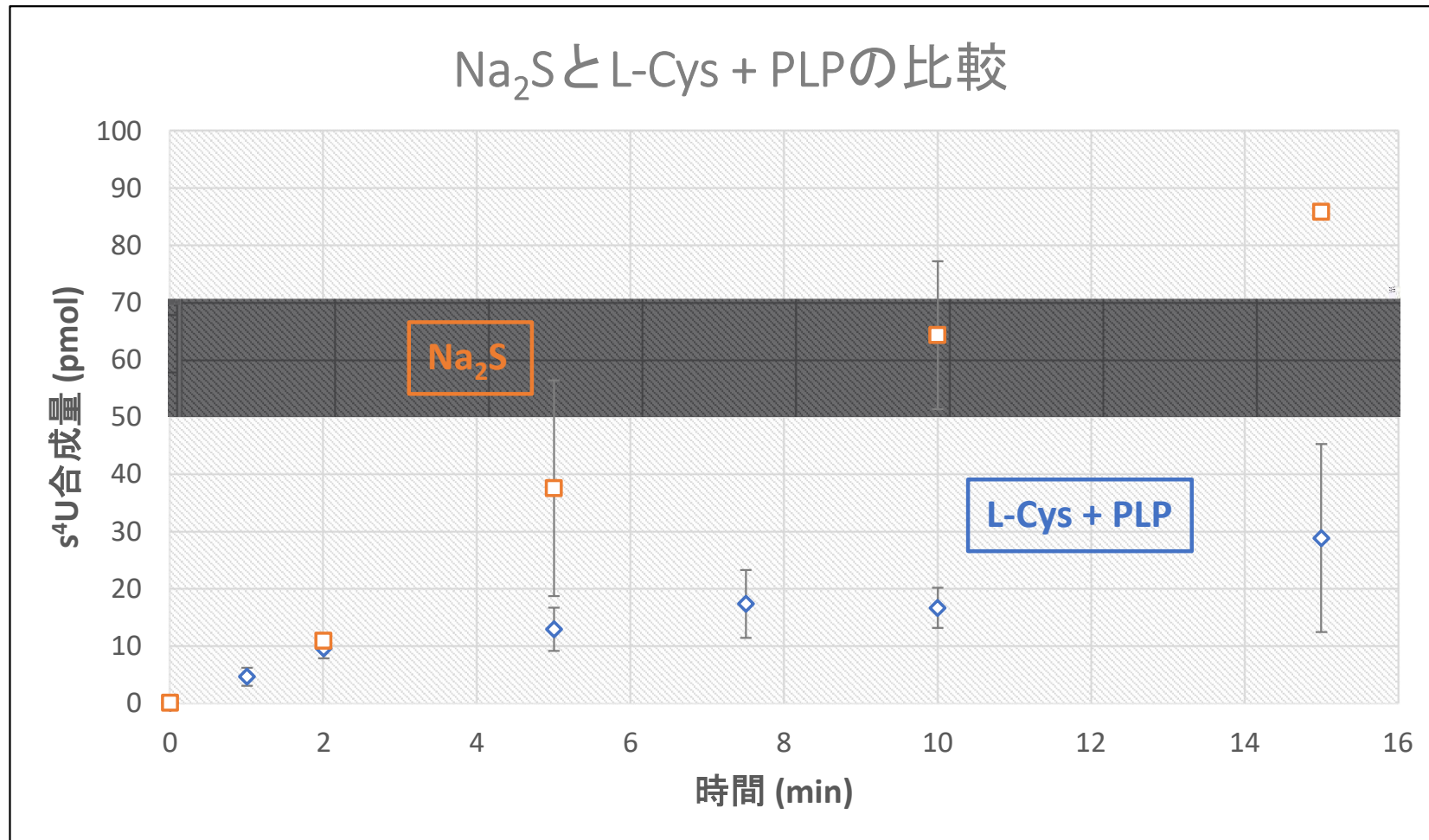
0 1 2 5 7.5 10 15 min



化学発光



▶ Na₂SとPLP+L-Cysの反応速度を比較した



Na₂Sのほうがより優れた基質である

01

*T.a.Thi*lの精製

02

$s^4\text{U}$ 合成タイムコースの測定

03

Na_2S 濃度の反応速度論解析

▶ Na₂Sの濃度を振って反応させた

<u>s⁴U合成反応溶液</u>	<u>f.c.</u>
10x Buffer	1x
ATP	2 mM
Na ₂ S	○
<i>T.a.</i> tRNA ^{Leu}	10 μM
<i>T.a.</i> Thil	0.5 μM
MilliQ fill up to	20 μL

1× Buffer	
Tris-HCl (pH 7.6)	50 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	5 mM
2-mercapto-EtOH	0.1 mM

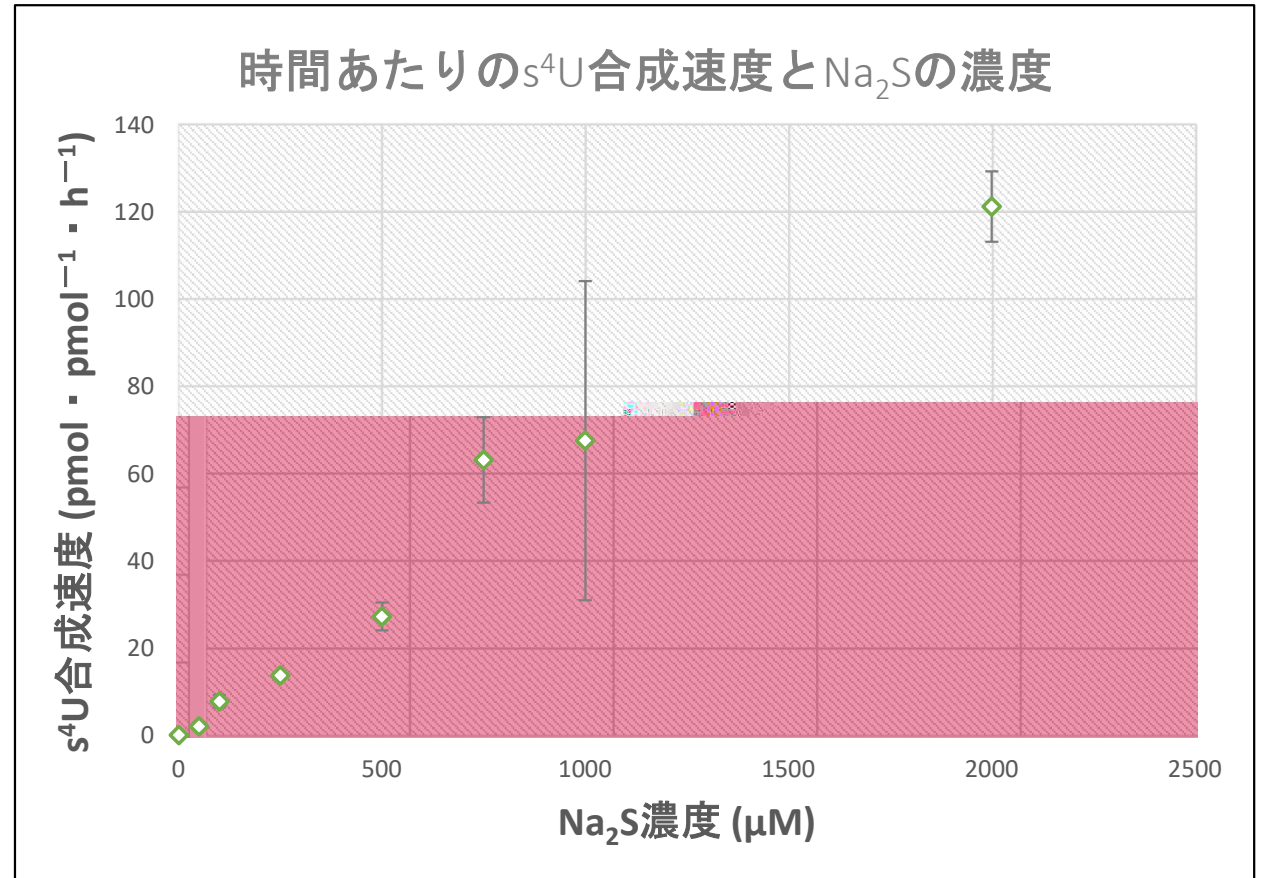
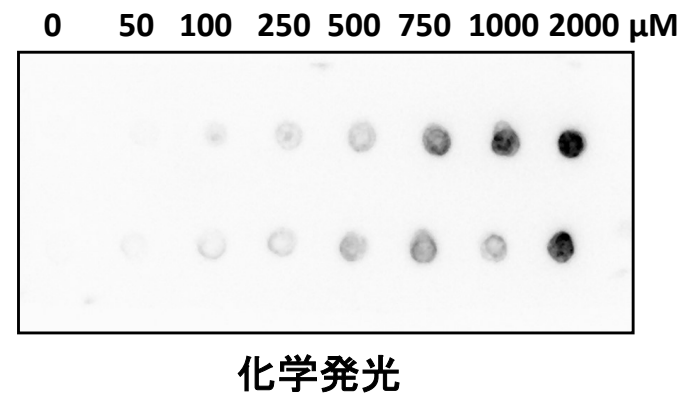
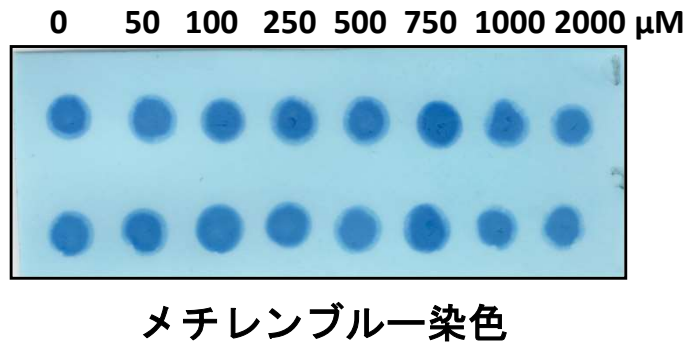
0 μM
50 μM
100 μM
250 μM
500 μM
750 μM
1000 μM
2000 μM
を製

56°C インキュベート
*T.a.*Thilを入れて反応開始
それぞれの濃度で5分値を測定



SITHを用いてs⁴Uの化学発光を検出

▶ SITHを用いて化学発光を測定した

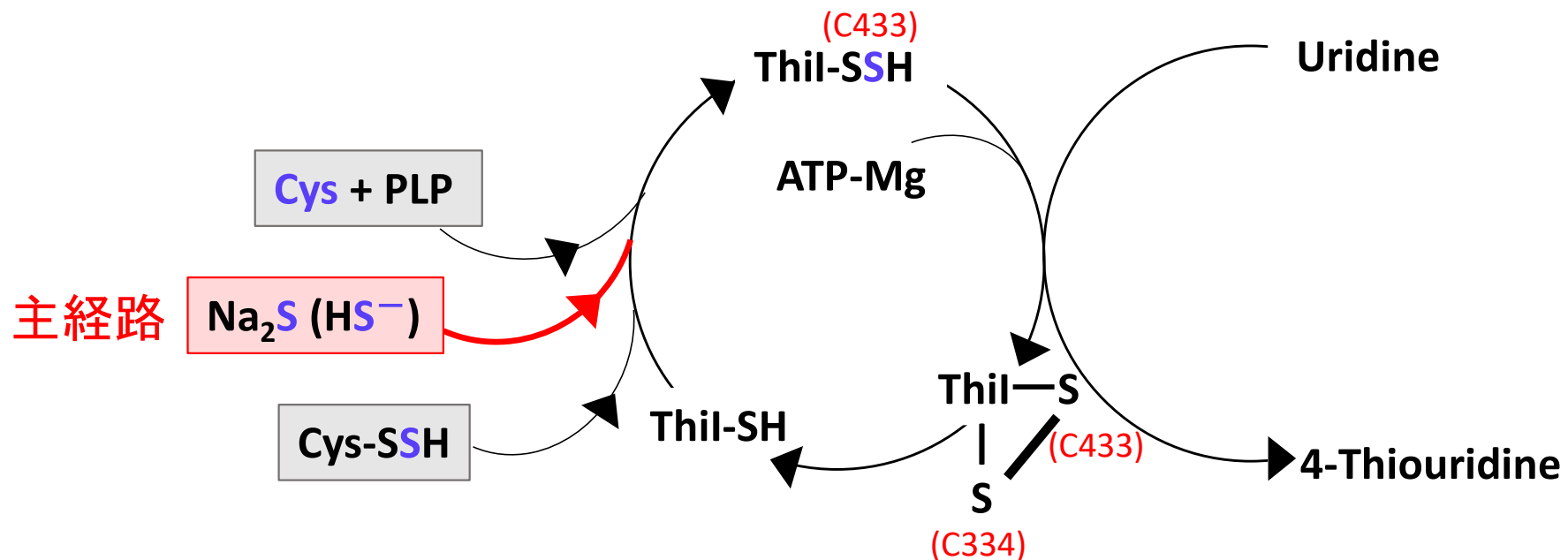


Na_2S 濃度 0~2000 μM の範囲では、 $s^4\text{U}$ 合成速度は Na_2S 濃度依存的に上昇

▶ まとめ・考察

- *Thermoplasma acidophilum*の s^4U 合成反応において、 Na_2S (HS^-)の方がより優れた基質であり、0~2 mMの範囲では Na_2S 濃度依存的に s^4U 合成速度が上昇する

*Thermoplasma acidophilum*は硫化水素 (H_2S)が高濃度に溶け込んだ箱根大涌谷の温泉水から単離された



*Thermoplasma acidophilum*における s^4U 合成経路

ご清聴ありがとうございました