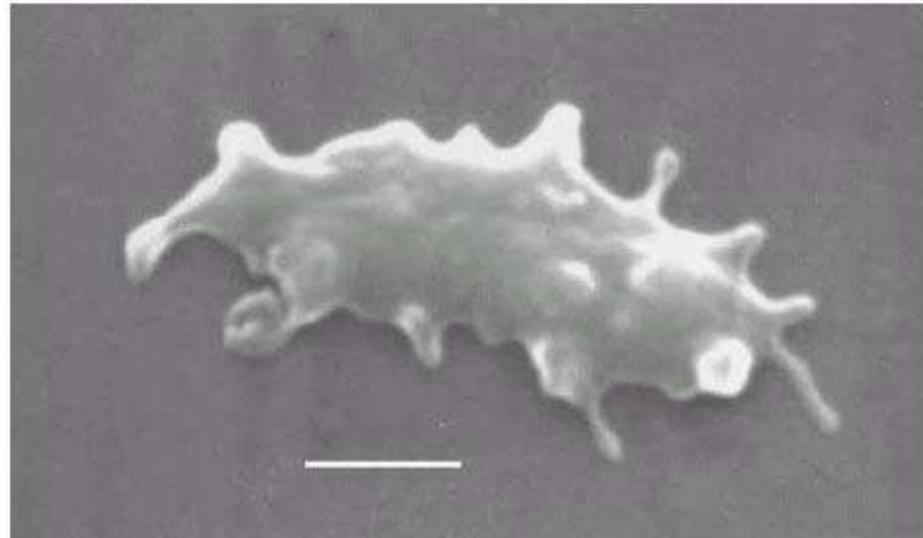


*Thermoplasma acidophilum* Thi1の  
4-Thiouridine合成反応における  
真の基質の特定

応用生物化学研究室  
山崎颯太

▶ *Thermoplasma acidophilum*



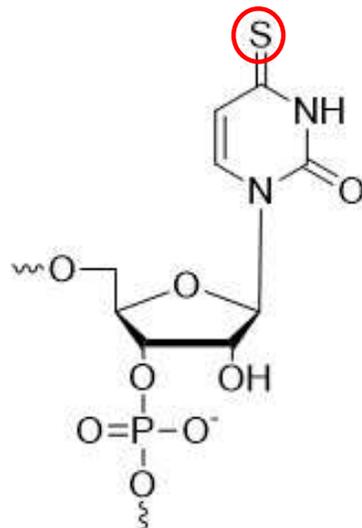
*Thermoplasma acidophilum*

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 (s<sup>4</sup>U)

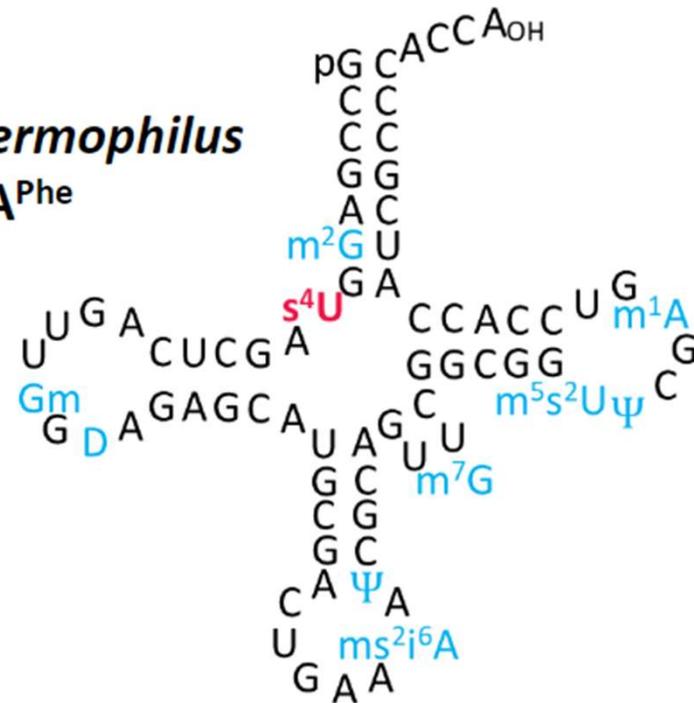
Uridineの4位の酸素原子が硫黄原子Sに置換された修飾ヌクレオシド



s<sup>4</sup>U

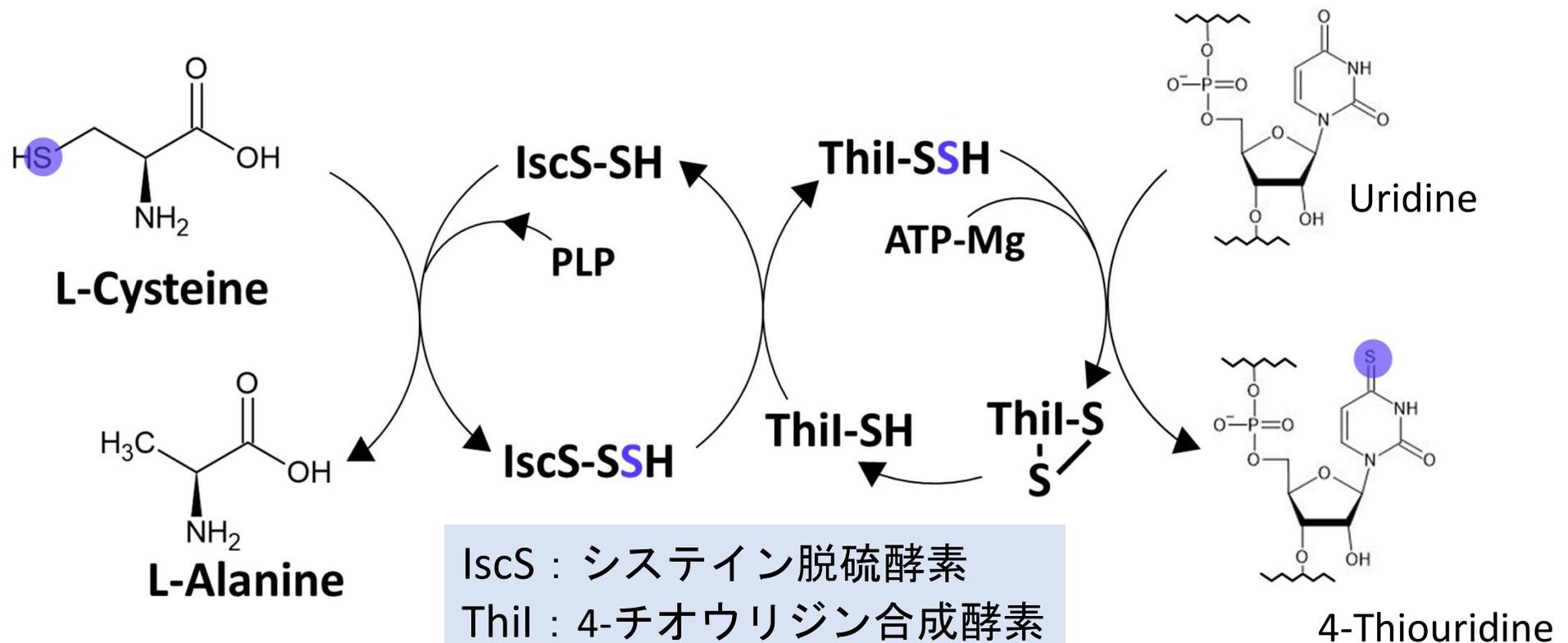
Ex.

*Thermus thermophilus*  
tRNA<sup>Phe</sup>



- 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

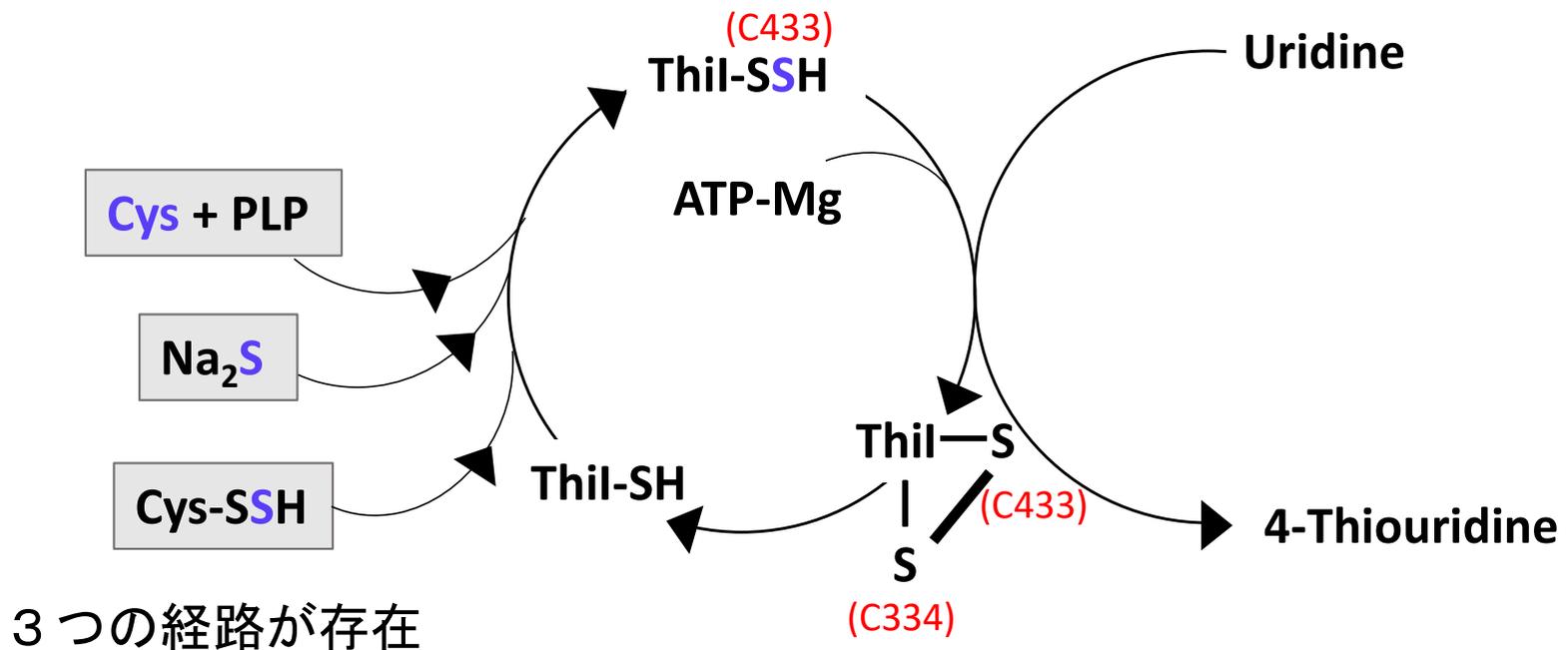
# ▶ 真正細菌 *Escherichia coli* における $s^4U$ 合成経路



*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 s<sup>4</sup>U 合成経路



Thil : 4-チオウリジン合成酵素

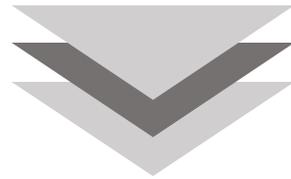
*Thermoplasma acidophilum*におけるs<sup>4</sup>U合成経路

## ▶ 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 $\text{s}^4\text{U}$ 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

$\text{Na}_2\text{S}$ 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

$\text{Na}_2\text{S}$ 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

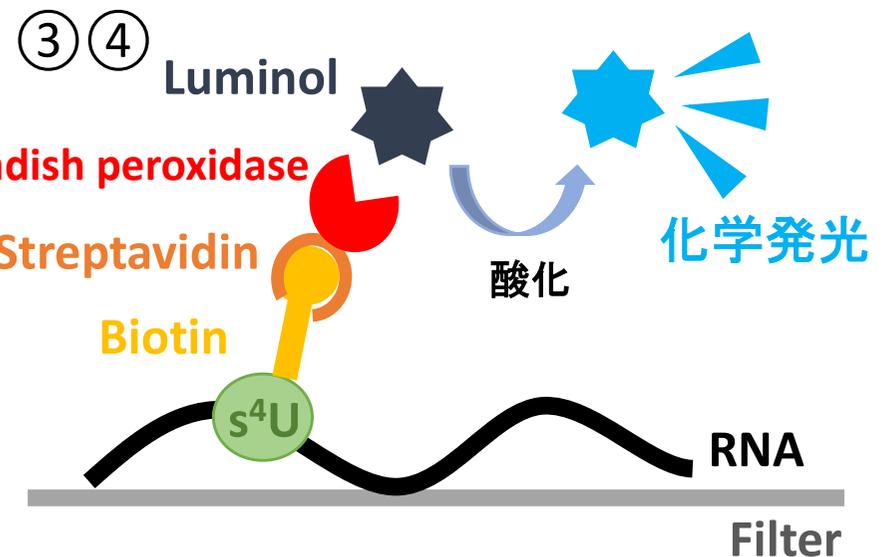
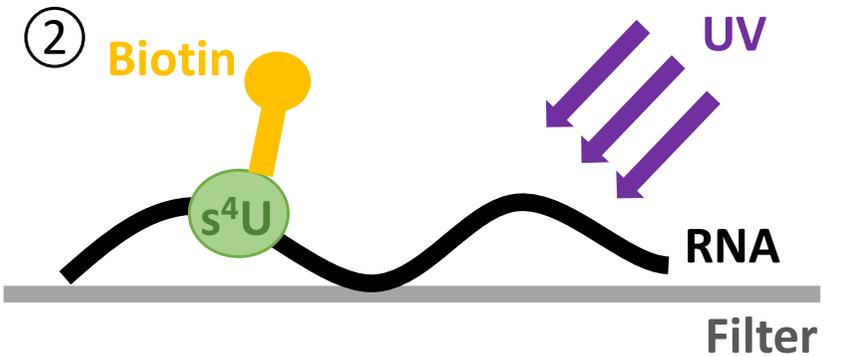
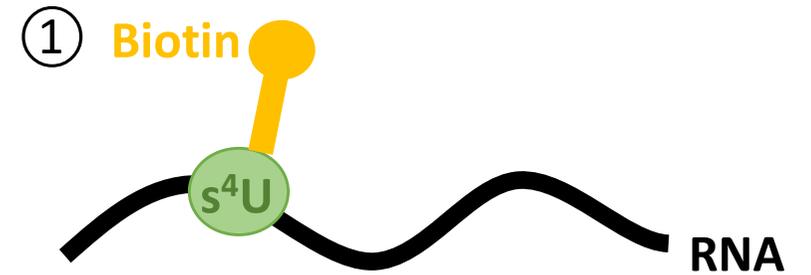
$\text{Na}_2\text{S}$ 濃度の反応速度論解析

# ▶ 化学発光を用いたs<sup>4</sup>U検出法

## 前任者が開発したs<sup>4</sup>U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 s<sup>4</sup>U-BiotinとStreptavidin-HRPが結合
- ④ Luminolの酸化により化学発光



# ▶ $s^4U$ の定量方法

## Linear - $s^4U$ RNA

5'- GGGACGCG $s^4U$ UGC GCAAAGGCAGACCAGGACAGCGCAG -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 $s^4U$ を定量

例

Sample

Linear- $s^4U$



試験管内でT7 RNA polymeraseと $s^4UTP$ を用いて合成した

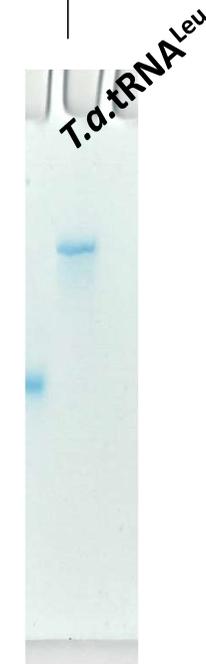
10% PAGE (7 M UREA)  
メチレンブルー染色

# ▶ Na<sub>2</sub>Sを用いてs<sup>4</sup>U合成反応を行った

s <sup>4</sup> U合成反応溶液	f.c.
10x Buffer	1x
ATP	2 mM
Na <sub>2</sub> S	1 mM
<i>T.a.</i> tRNA <sup>Leu</sup>	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 <sub>2</sub>	5 mM
2-mercapto-EtOH	0.1 mM

前任者が精製した  
ものを使用

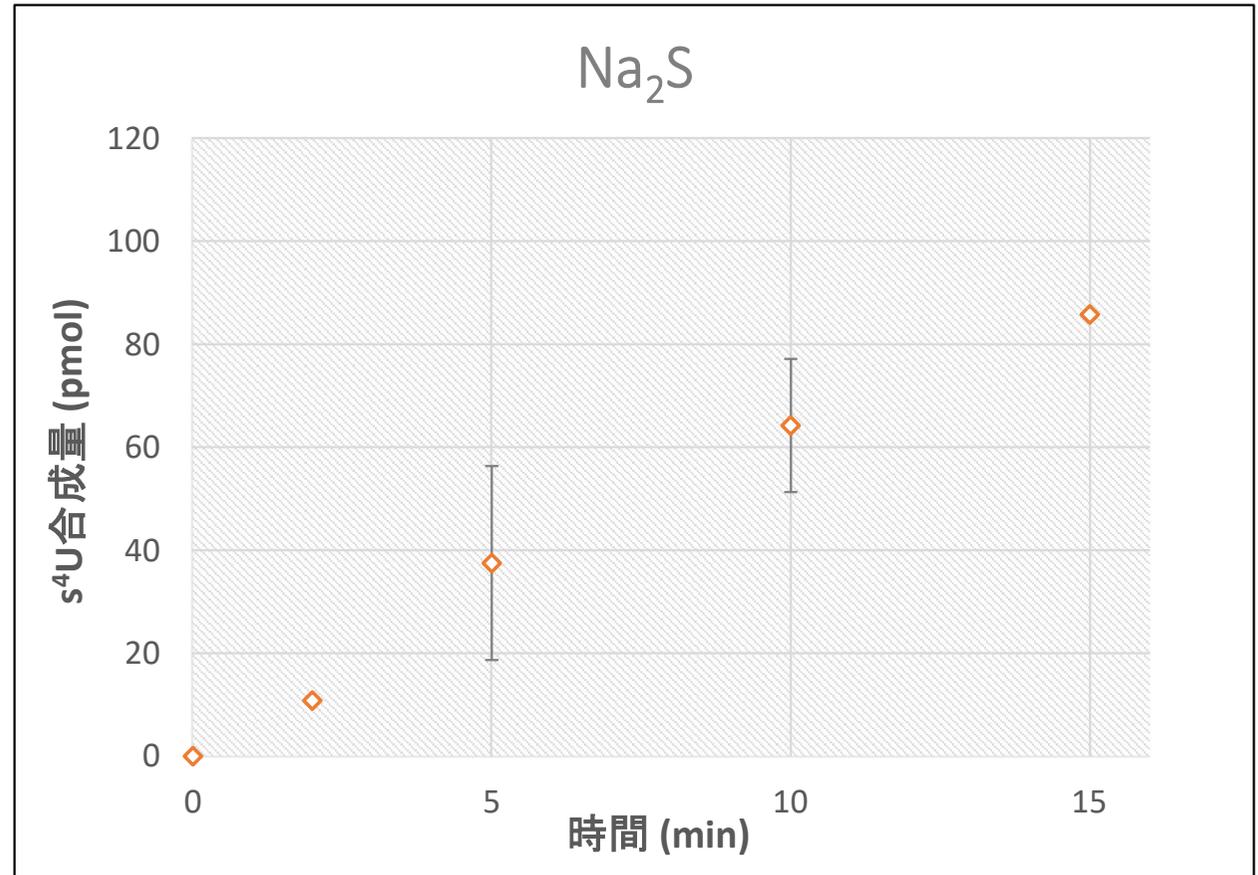
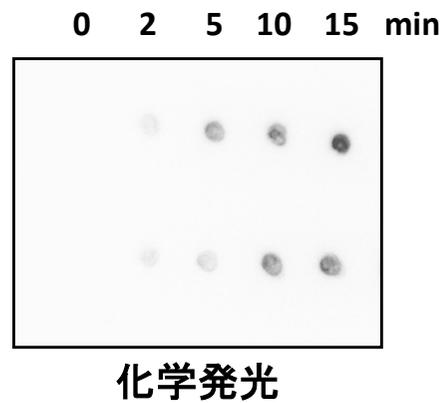
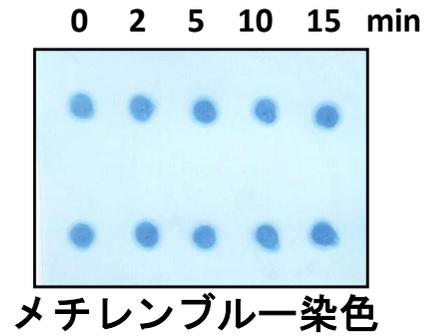


56°C インキュベート  
*T.a.* Thilを入れて反応開始  
0,2,5,10,15 minのタイムコースを測定

↓  
SITHを用いてs<sup>4</sup>U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s<sup>4</sup>U合成量が上昇

# ▶ L-Cysteine + PLPを用いてs<sup>4</sup>U合成反応を行った

s <sup>4</sup> 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 <sup>Leu</sup>	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 <sub>2</sub>	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

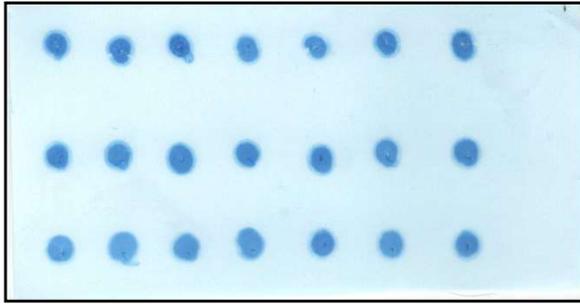
0,1,2,5,7.5,10,15 minのタイムコースを測定



SITHを用いてs<sup>4</sup>Uの化学発光を検出

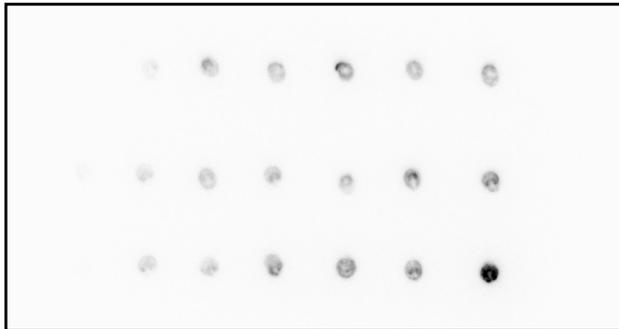
# ▶ SITHを用いて化学発光を測定した

0 1 2 5 7.5 10 15 min

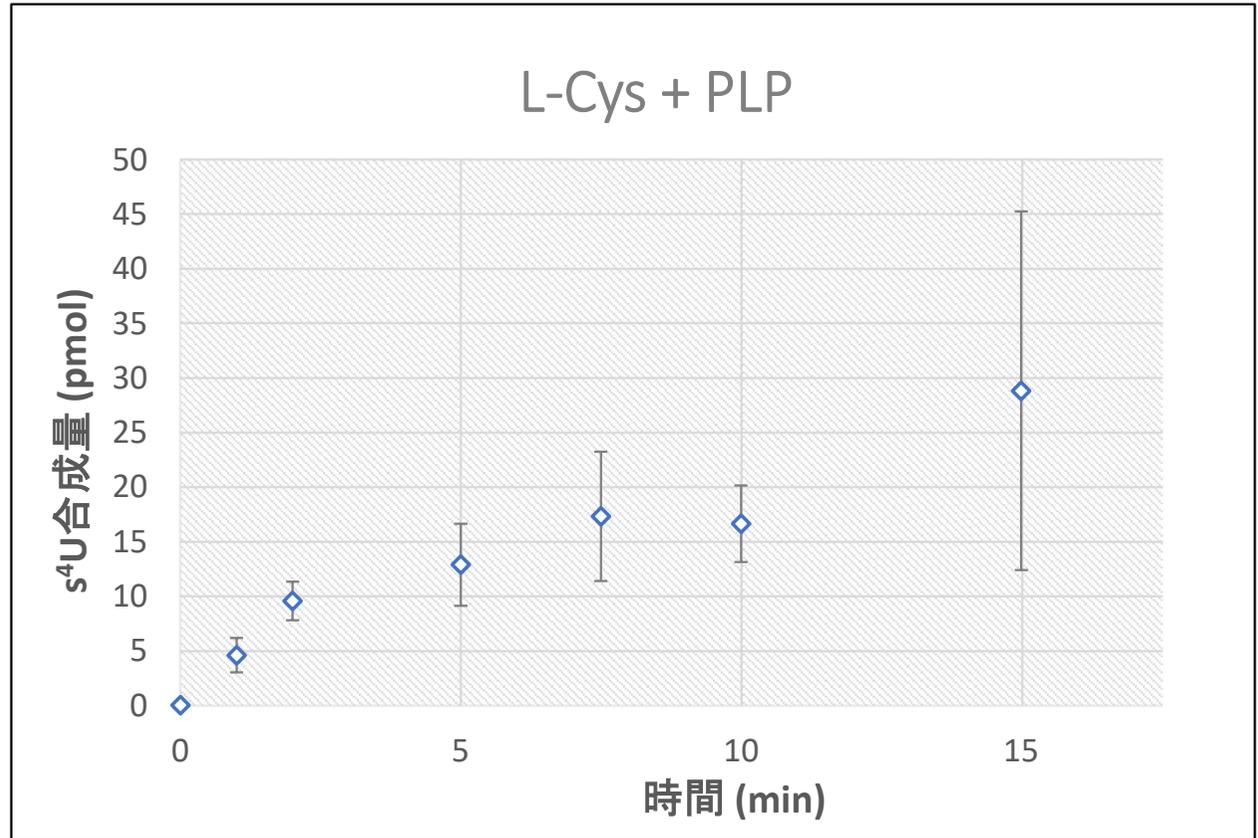


メチレンブルー染色

0 1 2 5 7.5 10 15 min

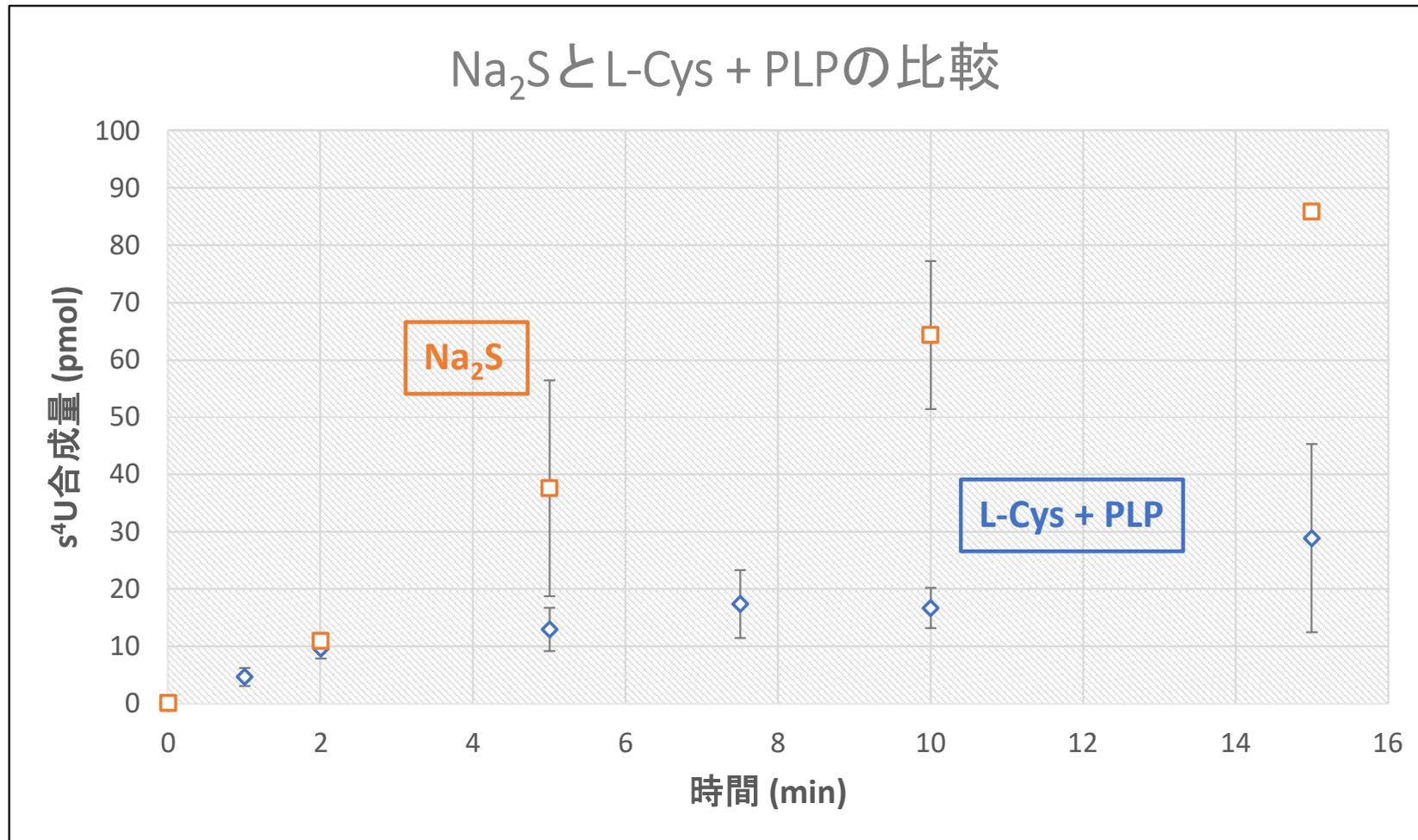


化学発光





# Na<sub>2</sub>SとPLP+L-Cysの反応速度を比較した



Na<sub>2</sub>S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

$\text{Na}_2\text{S}$ 濃度の反応速度論解析

# ▶ Na<sub>2</sub>Sの濃度を振って反応させた

<u>s<sup>4</sup>U合成反応溶液</u>	<u>f.c.</u>
10x Buffer	1x
ATP	2 mM
Na <sub>2</sub> S	○
<i>T.a.</i> tRNA <sup>Leu</sup>	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 <sub>2</sub>	5 mM
2-mercapto-EtOH	0.1 mM

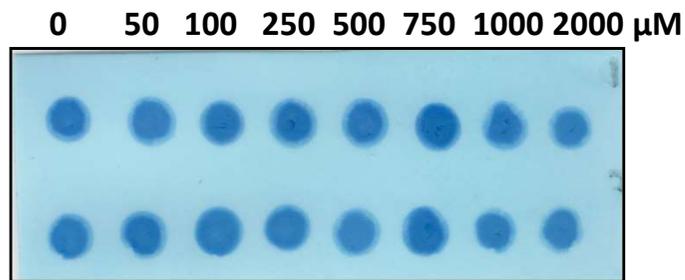
0 μM
50 μM
100 μM
250 μM
500 μM
750 μM
1000 μM
2000 μM
を製

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

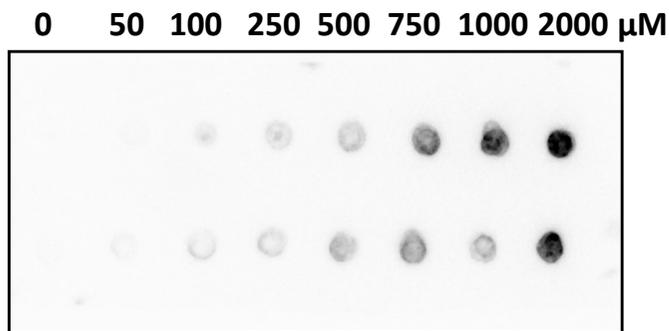


SITHを用いてs<sup>4</sup>Uの化学発光を検出

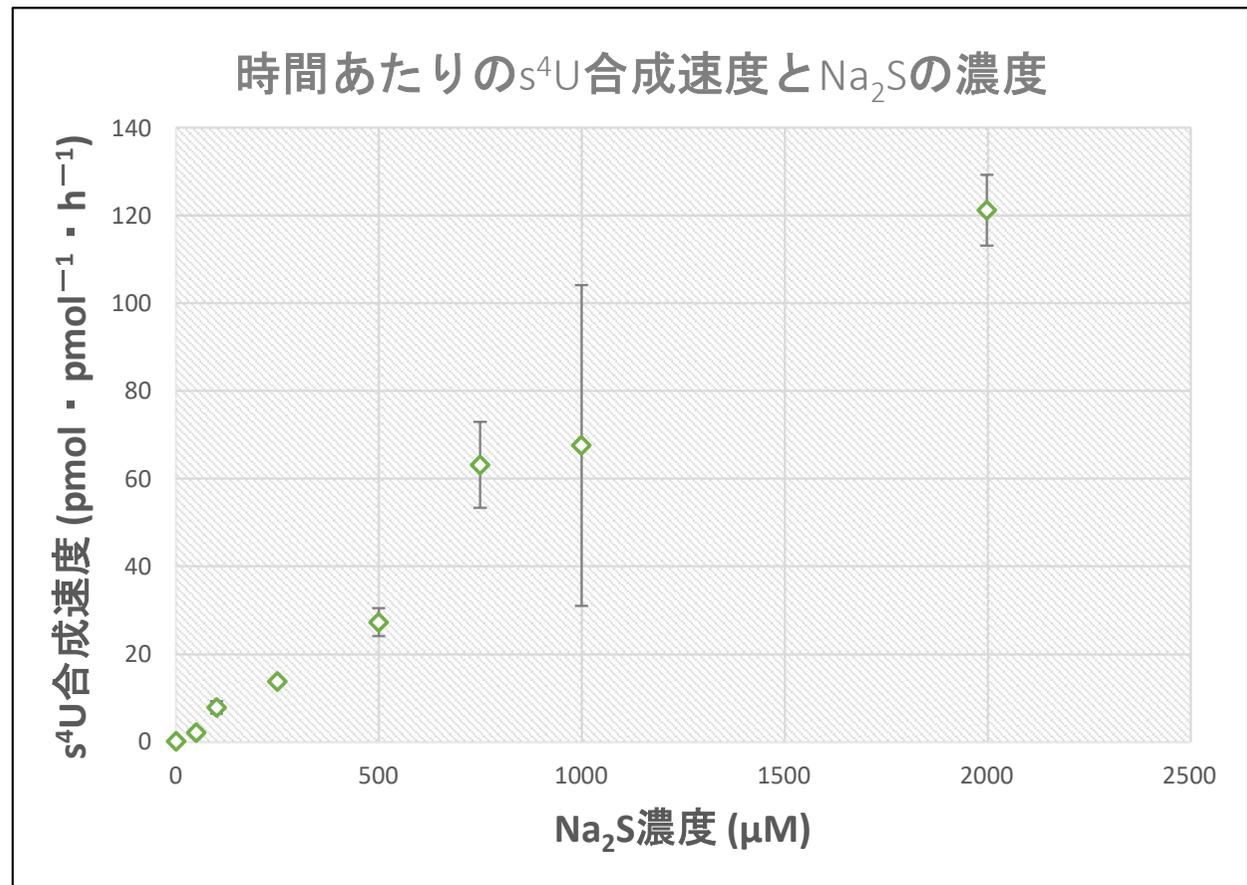
# ▶ SITHを用いて化学発光を測定した



メチレンブルー染色



化学発光

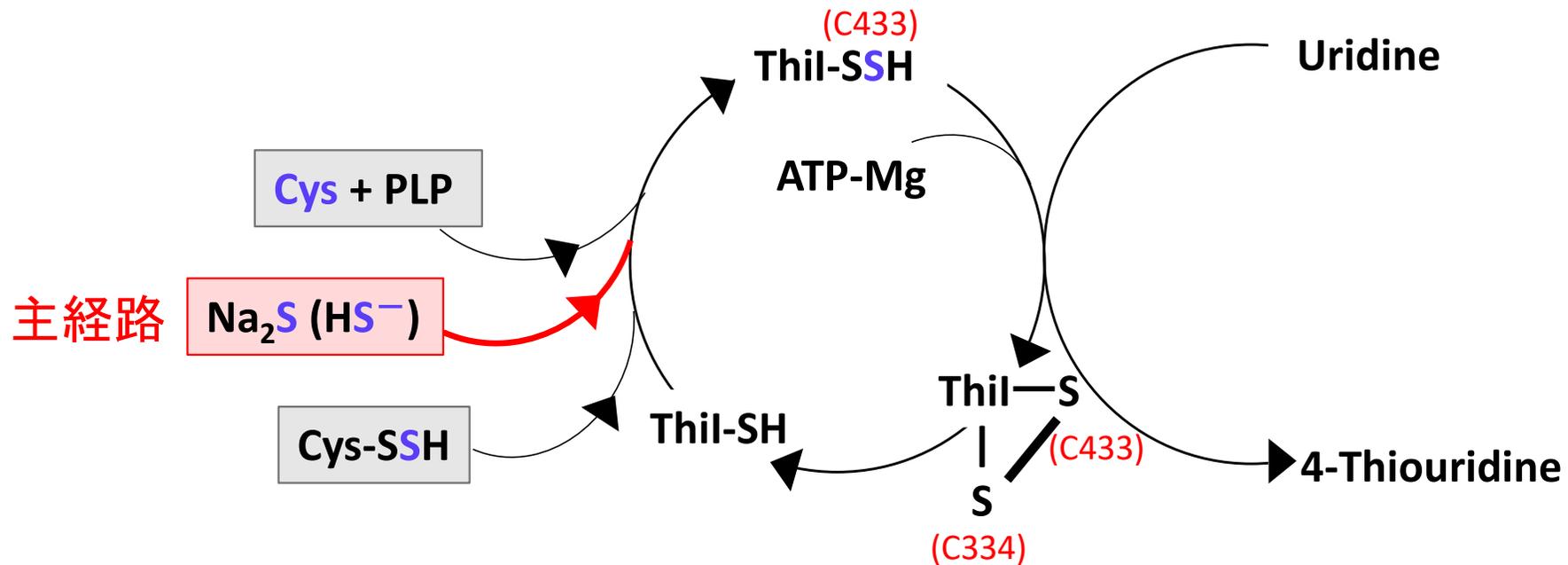


$\text{Na}_2\text{S}$ 濃度 0~2000  $\mu\text{M}$ の範囲では、 $s^4\text{U}$ 合成速度は $\text{Na}_2\text{S}$ 濃度依存的に上昇

## ▶ 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