

令和 4 年 10 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18675

研究課題名（和文）大腸菌を用いた新規硫黄貯蔵分子および関連代謝経路の同定と生理意義の解明

研究課題名（英文）Exploration of the molecules for cellular sulfur stock in Escherichia coli

研究代表者

河野 祐介（Kawano, Yusuke）

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：40558029

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：大腸菌での有用硫黄化合物の生産技術が進展する一方で、培養時に毒性の硫化水素が生じる問題がある。この現象は、硫黄の「同化」に関わると仮説し、単一硫黄源の無機培地で硫化水素発生を調べた。すると、硫黄源がチオ硫酸塩の時に硫化水素が発生するが、硫酸塩の時は発生しないこと、転写因子Crpが関わること、培地グルコースの枯渇が引き金となることを明らかにした。pspEは、野生株で硫化水素発生後に転写量が増加したが、crp破壊株では増加しなかった。pspE破壊株では、野生株と同等の硫化水素発生が見られた。よって、pspEは、他の未知の因子との複合的な機能として、crpに依存する硫化水素生成に関わる可能性が高い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、大腸菌のチオ硫酸転移酵素遺伝子であるpspEに注目し、その理解を進めることで、未だに未知の部分が多い硫黄の代謝や制御、更には、炭素代謝とのクロストークについて重要な知見を明らかにしたため、その学術的な意義は大きい。更に、硫黄化合物の発酵生産の生産性向上や有害な副産物である硫化水素の低減などに繋がる成果であるため、産業界に技術還元可能な有効性が十分に見込めることから、社会的な意義も大きいと考えている。引き続き、当研究を推進し、その意義を深めていきたい。

研究成果の概要（英文）：Recently, technology of production of sulfur compounds using E. coli is progressing. However, simultaneous generation of hydrogen sulfide is problematic. We hypothesized that this phenomenon is involved in sulfur assimilation, and then examined its generation in inorganic medium containing sole sulfur source. The results showed that the generation occurred in the medium of thiosulfate but not of sulfate, is involved in transcription factor Crp, and is triggered by glucose shortage in the medium. Transcription of pspE was up-regulated after the hydrogen sulfide generation in wild type, whereas that was not changed in crp disruptant. However, pspE disruptant exhibited the hydrogen sulfide generation like wild type. Accordingly, pspE should be involved in crp-dependent hydrogen sulfide generation in a cooperative fashion with other unknown factors.

研究分野：応用微生物学

キーワード：硫黄代謝 大腸菌 硫黄転移酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

あらゆる生物で「硫黄」は生存に必須な重要な生体構成元素である。微生物は、無機硫黄源の同化が可能で、硫酸イオン (SO_4^{2-}) やチオ硫酸イオン ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) の硫黄原子を、炭素骨格である *O*-アセチルセリンへと固定し、有機硫黄分子であるシステイン (Cys) を生合成する。さらに、この Cys を起点に、重要な生理活性を持つ様々な含硫生体分子が合成される。しかし、硫黄の生体含量は低く解析は困難なため、硫黄分子種の取り込み様式、同化代謝系、制御システムには多くの未知部分が残されている。

炭素や窒素などの栄養の利用様式では、生育環境変動に対する頑健性を発揮するためのシステムの存在が知られている。例えば、何らかの栄養飢餓や環境ストレスで生育が制限される場合には、炭素源が利用可能な場合は、その代謝産物はグリコーゲン (グルコースのポリマー) として、窒素源の場合はポリアミノ酸 (例: シアノフィシン; アルギニン修飾されたアスパラギン酸のポリマー) などのポリマー形態に変換することで細胞内にコンパクトに大量貯蔵される。環境の好転時には、これらの貯蔵分子の速やかな分解・異化により細胞構成成分やエネルギーとして利用することで、迅速な増殖の再開を可能としている。「硫黄」については、このような貯蔵物質が未知であるがポリマー状硫黄の最終貯蔵形態が存在するはずと仮説を立てた。

研究代表者や研究協力者 (筑波大准教授 大津厳生) らは、大腸菌を用いて、細胞内で生合成された還元性物質である Cys が、トランスポーター YdeD によりペリプラズムへ輸送され、そこで活性酸素種 H_2O_2 を H_2O へと還元して消去する抗酸化機構 (システイン/シスチンシャトルシステム) を見いだしている。そこで、酸化型となったシスチン (CySS) は CySS インポーター FliY-YecSC により細胞質へ回収・還元され、出発物質の Cys へと再還元される。この循環により持続的な抗酸化機能が駆動される。このようなペリプラズムでの Cys による新様式の還元反応には、さらなる未知機能を担う可能性が予想される。さらに、YdjN がスルホシステイン (Cys-SO_3^{2-}) のインポーターであることも突き止めている。 Cys-SO_3^{2-} は、Cys と亜硫酸イオン (SO_3^{2-}) から非酵素的に生成しうる事実を踏まえると、YdjN は、「Cys/CySS シャトルシステムで供給された Cys とペリプラズムで発生した SO_3^{2-} との反応で生成した Cys-SO_3^{2-} を取り込む」という生理的な機能を有する可能性が想定される。

これらに加え、最近の報告では、大腸菌のペリプラズムに局在するチオ硫酸; 硫黄転移酵素 PspE が、*in vivo* でその Cys 残基のチオールがポリスルフィド化されうることや、*in vitro* で $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ と反応してポリスルフィド鎖が伸張することが示された (Cheng et al, 2008, Open Microbiol. J.)。その反応特性や生理意義は不明のままであるものの、ペリプラズムで SO_3^{2-} が発生し得ることが示唆される。また、PspE のポリスルフィドは上に述べたような硫黄の貯蔵源として機能する可能性が想定される。

一般的な知見では、取り込まれた $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ は、CysM で *O*-アセチルセリンに固定され、生じた Cys-SO_3^{2-} の還元により Cys が合成される (チオ硫酸経路)。しかし、研究代表者らは、チオ硫酸単一硫黄源培地で *cysM* の生育が劇的に阻害されるものの、実は致死でないことを発見し、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ から Cys への未知の CysM 非依型同化経路の存在が判明した。さらに、この *cysM* は、PspE の強制発現により、その生育阻害が相補されたため、この未知同化経路への PspE の関与が示唆された。実際に、*cysM* に PspE をプラスミドで過剰発現させた菌体祖抽出液を用いて、チオ硫酸を基質として生化学的な硫黄転移酵素反応 ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ PspE-SSH + SO_3^{2-}) を調べると、その活性が飛躍的に高まる事などを先行知見として確認している。

以上の各研究シーズを組み合わせ、この未知経路が PspE による硫黄貯蔵に関する経路であると着想し、研究代表者らは以下の仮説を立てた。(1) 大腸菌は、環境中に $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ が豊富に存在する場合に、PspE のポリスルフィドとして硫黄を貯蔵し、(2) 放出される SO_3^{2-} からは、Cys/CySS シャトルシステムでペリプラズムへ供給された Cys と反応して Cys-SO_3^{2-} が生成し、(3) YdjN によりサイトプラズムに取り込まれて、還元を経て Cys が合成される。このシステムの利点は、ペリプラズムで生じる SO_3^{2-} がそのまま酸化されて同化に不利な SO_4^{2-} に変換される事を避け、 Cys-SO_3^{2-} として取り込み、エネルギー的に有利な Cys 合成が可能な点にある。一方、ポリスルフィド (-S-S-) は、還元的に分解され得る分子なので、PspE ポリスルフィドとして酸化的なペリプラズムに硫黄貯蔵分子として存在することは合理的である。

2. 研究の目的

本研究では、上記の仮説を検証すべく、各反応を分子・遺伝子レベルで解明し、PspE ポリスルフィド化機構や、未知なる「硫黄貯蔵物質」としての生理的機能を明らかにすることに挑戦する。これにより、遅れている硫黄代謝の統合的な理解を加速させる。

3. 研究の方法

PspE に生じるポリスルフィド化機構を理解するために、まずは PspE を発現・精製し、*in vitro* 系で生化学的な特性解析を行う。反応硫黄源については、チオ硫酸をはじめ各種硫黄化合物を検討する。ポリスルフィドの鎖長やその存在比の測定には、マスマスペクトルを用いる。次に、*in vivo* での PspE のポリスルフィド化の挙動を知るために、各種硫黄源での培養後、PspE を精製し、上記の検出法で調べる。このときに、関連する硫黄代謝経路の動態との関係を探るため、研究代表者らが最近確立した「硫黄代謝産物のメタボローム解析」を行う。さらに、関係する代謝酵素、トランスポーターなどの転写およびタンパク質の発現誘導を調べる。以上により、

PspE のポリスルフィドの、硫黄貯蔵物質としての可能性およびその生理的意義を検証する。これ加えて、関連遺伝子の破壊および強制発現株を作製し、同様の解析で再検証し、より確実かつ詳細に、関連する遺伝子や代謝経路およびその制御機構を明らかにする。

4. 研究成果

平成 28 年度は、IPTG 誘導可能な大腸菌発現系のプラスミドで PspE の C 末端 (ペリプラズム移行タンパク質のため) に His tag を導入したコンストラクトを構築した。形質転換株を、IPTG 誘導により、PspE-His tag を大量発現させる培養を行い、その菌体破砕液から Ni アフィニティーカラムで精製し、精製タンパク質の生化学的な活性を調べた。一方で、LC-MS による硫黄分子種のメタボローム解析系の改良 (検出対象分子種の拡充) も行った。例として、硫黄代謝 (同化) における重要な中間体である APS (Adenosine 5'-mophosphosulfate) の標品を用いて、MS/MS における検出条件 (測定電圧、コリジョンエネルギー等) の最適化を行い、引き続き、原稿メソッドでの保持時間を決定し、この分子の検出プログラムとして追加した。また、当該年度のシーズとなった硫黄転移酵素の投稿論文についてもサブミットを完了した。

平成 29 年度は、引き続き、PspE-His tag の発現・精製タンパク質の生化学的な活性 (基質; 無機硫黄種) を調べる実験を行った。しかし、分子量が小さいためか、その発現量は低く、しかも安定しなかった。ゆえに、精製度も低い傾向があり、PspE の活性やポリスルフィド化を示す明快なデータは得られなかった。一方で、前年に続き、LC-MS による硫黄分子種解析系の改良を推進した。例として、硫黄同化経路の中間体として重要な

PAPS (3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate) について、そのリン酸基などの影響により、現行の硫黄メタボローム法での分離・溶出が困難であったが、移動相やカラム種などの条件を検討することで、その検出系を構築した。また、PspE と同タンパク質ファミリーの「チオ硫酸: 硫黄転移酵素」である GIpE に関して、その生理機能と、システイン発効生産への応用工学的な有用性を示した論文が採択された。

平成 30 年度は、上記のように、PspE の発現がうまくいかない状況を鑑み、残りの研究期間で有益に研究を推進する目的で、本課題で注目している PspE の生理機能について、これまでに改良した硫黄化合物種の解析系を活用して、硫黄代謝全般における視点から多角的に明らかにする実験法を再考した。その背景として、近年、大腸菌における有用硫黄化合物の生産技術が進んでいる一方で、その発酵生産時に毒性の硫化水素が発生する問題に焦点を当てた。この現象は、硫黄の「同化」に関わると仮説し、大腸菌において、無機培地における単一硫黄源での硫化水素発生を調べた。すると、硫黄源を「チオ硫酸塩」とすると、硫化水素が発生するが、硫酸塩とすると発生しないことが判明した (図 1)。また、この現象には、転写因子 CRP が関わることを明らかにした (発表論文リスト)。そして、この硫化水素発生は、培養中にグルコースが枯渇することが、引き金となっていることを明らかにした。

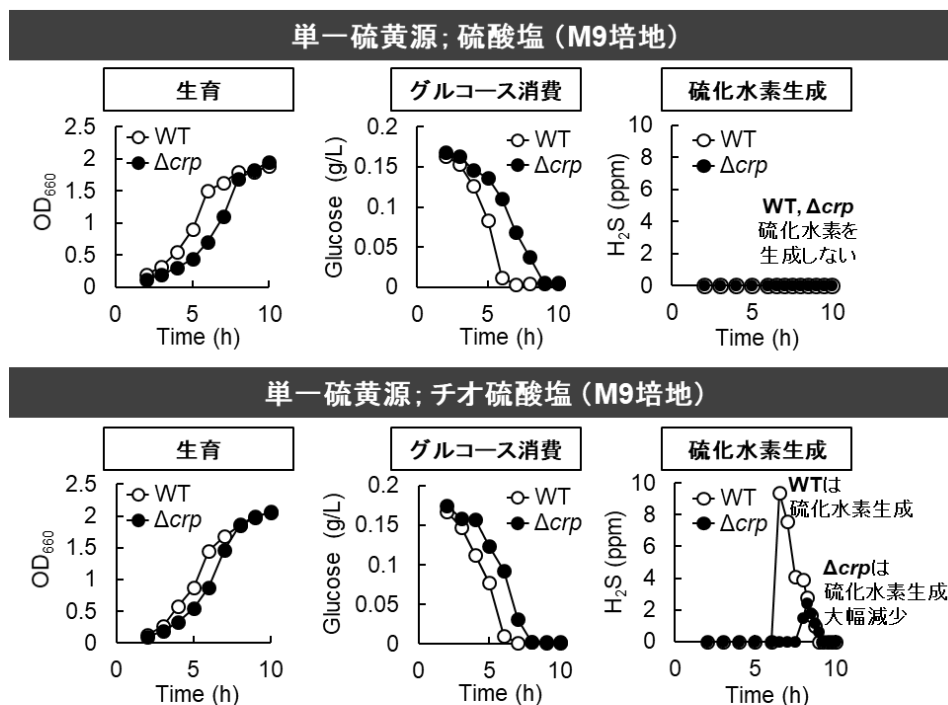


図1. 硫酸塩もしくはチオ硫酸塩を単一硫黄源とするM9培地における大腸菌の野生株(WT)もしくはcrp遺伝子破壊株(Δcrp)の生育、グルコース消費、硫化水素生成

これに対し、*pspE*の転写量は、野生株では、硫化水素発生時に約7倍に増加していたが、*crp*では、この増加が生じなかった。そこで*pspE*がこの硫化水素発生に関わると考え、*pspE*破壊株で硫化水素発生を調べたところ、予想に反して、野生株と同様の硫化水素生成が見られた。よって、PspEは、他の未知因子との複合的な機能として、*crp*に依存する硫化水素発生に関わっている可能性が高いことが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Naoyuki Tanaka, Tomoyuki Hatano, Soshi Saito, Yukari Wakabayashi, Tetsuya Abe, Yusuke Kawano, Iwao Ohtsu, Generation of hydrogen sulfide from sulfur assimilation in *Escherichia coli*, J. Gen. Appl. Microbiol., 査読有、in press、2019

doi: 10.2323/jgam.2018.11.001

Naoyuki Tanaka, Yusuke Kawano, Yasuharu Satoh, Tohru Dairi, Iwao Ohtsu, Gram-scale fermentative production of ergothioneine driven by overproduction of cysteine in *Escherichia coli*, Sci Rep., 査読有、Vol.9, No.1, pp.1895、2019

doi: 10.1038/s41598-018-38382-w

Yusuke Kawano, Kengo Suzuki, Iwao Ohtsu, Current understanding of sulfur assimilation metabolism to biosynthesize L-cysteine and recent progress of its fermentative overproduction in microorganisms, Appl. Microbiol. Biotechnol., 査読有、Vol.102, No.19, pp.8203-8211、2018

doi: 10.1007/s00253-018-9246-4

河野祐介、山田康嗣、鈴木健吾、大津巖生、微生物が有する硫黄代謝の魅力と展望、ケミカルエンジニアリング、査読無、63巻、11号、pp.66-72、2018

大津巖生、河野祐介、佐藤康治、大利徹、抗酸化機能を有するエルゴチオネインのシステイン生産大腸菌による発酵生産、フレグランスジャーナル、査読無、46巻、7号、pp.65-70、2018

Yusuke Kawano, Fumito Onishi, Maeka Shiroyama, Masashi Miura, Naoyuki Tanaka, Satoshi Oshiro, Gen Nonaka, Tsuyoshi Nakanishi, Iwao Ohtsu, Improved fermentative L-cysteine overproduction by enhancing a newly identified thiosulfate assimilation pathway in *Escherichia coli*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 査読有、Vol.101, No.18, pp.6879-6889、2017

doi: 10.1007/s00253-017-8420-4

〔学会発表〕(計18件)

Yusuke Kawano, Kengo Suzuki, Iwao Ohtsu, Sulfur index[®] for metabolomic analysis of comprehensive biological sulfur compounds using LC-MS/MS system, The 7th International Selenium Conference (SHIMADZU SEMINAR)、2018

河野祐介、大津巖生、生体内硫黄化合物の見える化「サルファーインデックス[®]」、平成30年度(2018年度)遺伝研研究会「微生物生態から見えてくる新しい生理機能とその応用」、2018

河野祐介、田中尚志、城山真恵加、大城聡、佐藤康治、大利徹、大津巖生、システイン生産大腸菌によるエルゴチオネインの発酵生産、日本農芸化学会2018年度大会、2018

河野祐介、仲谷豪、西口みゆ、鶴岡愛、高木博史、大津巖生、硫黄代謝関連遺伝子の改変による大腸菌のシステイン発酵生産性の向上、第68回日本生物工学会大会、2016

河野祐介、三浦雅史、中嶋孝嗣、大津直子、大津巖生、生物界における硫黄代謝の基本原則(共通性と特異性)を探る~動物・植物・微生物を対象としたサルファーインデックス解析への挑戦~、2015年度生物工学若手研究者の集い 夏のセミナー、2016

Miyu Nishiguchi, Naoyuki Tanaka, Yusuke Kawano, Yasuharu Satoh, Tohru Dairi, Iwao Ohtsu, Ergothioneine fermentative production in *Escherichia coli*, 13th Biotechnology Congress、2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:エルゴチオネイン合成微生物、及びエルゴチオネインの製造方法

発明者:大津巖生、河野祐介、田中尚志、大利徹、佐藤康治

権利者:同上

種類:特許

番号:特願2018-038057

出願年:平成29年

国内外の別:国内

取得状況（計0件）

〔その他〕
該当なし

6．研究組織

(1)研究分担者
該当なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：大津 徹生
ローマ字氏名：(OHTSU, iwao)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。