

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07724

研究課題名(和文) 硫黄転移反応を指標にした含硫化合物合成系の全体像の解明

研究課題名(英文) Study of biosynthesis of sulfur-containing compounds

研究代表者

加藤 伸一郎 (Kato, Shin-ichiro)

高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・准教授

研究者番号：60346707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Clostridium acetobutylicum無細胞抽出液にL-[35S]システインをトレーサーとして加えオートラジオグラフィーにより解析したところ、NifU様タンパク質が35S放射標識されていることが明らかになった。当該遺伝子をPCRにより調製しpCold Iベクターに挿入して発現系を構築し、組換えNifU様タンパク質を得た。大腸菌システイン脱硫フラゼIscSおよびL-[35S]システインを用いた硫黄転移系を用いて、得られたNifU様タンパク質の硫黄受容能をin vitroで解析したところ、35S放射標識量の経時的な増加が認められたことから、硫黄受容能を有することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内には存在量は微量であるものの、高い生理活性を有し生命の維持に不可欠な役割を担う含硫化合物の存在している。代表的なものとして、水溶性のビタミンであるチアミン、リボ酸などが挙げられるが、これら以外にも多様な補因子の存在が知られている。これらの効率的で安価な生産方法が確立されれば、例えばサプリメントの有効成分として添加することが可能になる。本研究は、含硫化合物合成系の全体像を硫黄転移反応を指標として明らかにしようとするものである。

研究成果の概要(英文)：L-[35S] cysteine was added as a tracer to a cell-free extract of Clostridium acetobutylicum, and analyzed by autoradiography. NifU-like protein was found to be radiolabeled with 35S. The nifU gene was amplified by PCR and inserted into the pCold I vector to construct an expression system and recombinant NifU-like proteins were obtained. With sulfur transfer system by E. coli cysteine desulfurase IscS and L-[35S]cysteine, the sulfur accepting capacity of the NifU-like protein was analyzed in vitro. The amount of 35S radiolabeled was increased with time, confirming that it has a sulfur receptor capacity.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：含硫化合物 元素様硫黄 オートラジオグラフィー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内において硫黄は、タンパク質中の含硫アミノ酸をはじめ、グルタチオン、コンドロイチン硫酸などの形で多量に存在している。それ以外に存在量は微量ながら、チアミン、ピオチン、リポ酸、鉄-硫黄クラスター、モリブドプテリンなどの補因子や、tRNA に含まれるチオウリジンなどの核酸塩基にも硫黄が含まれている。これらの補因子に含まれている硫黄原子はチオール基などを形成しており極めて反応性が高く、ホルミル基やカルボキシル基の転移反応や電子およびプロトンの授受に際して重要な役割を担っている。また、チオウリジンは翻訳時のコドン認識に深く関与しており、生理的に重要な役割を担っている。これまでに大腸菌において PLP 酵素である「システインデスルフラゼ」が、鉄-硫黄クラスター生合成の初発段階において硫黄を供給するという、極めて重要な役割を有していることを明らかにした。システインデスルフラゼは、L-システインを L-アラニンと硫黄に分解する反応を触媒し、その過程で生じる硫黄は、システインデスルフラゼの活性中心のシステイン残基に反応性の極めて高い“ペルスルフィド(-S-SH)”の形で一時的に保持されるという特性を有している。そして、このペルスルフィドの硫黄原子は、含硫化合物の生合成に関与する別のタンパク質にシステイン残基を介して受け渡され、最終的に様々な含硫化合物を構成する硫黄原子として使われると考えられている。例えば、鉄-硫黄クラスターの生合成における IscU タンパク質、2-チオウリジンの生合成における MnmA タンパク質、また、モリブデン補因子の生合成における MoaD タンパク質などが硫黄原子の受容能を示すことが報告されている。とりわけ MnmA タンパク質については、システインデスルフラゼとの複合体の立体構造が明らかになっており、より詳細な硫黄受け渡し機構が提唱されている。このような背景から、「転移能が高く不安定な“ペルスルフィド”が様々な含硫補因子の生合成において普遍的に関与している」という仮説に立脚し、硫黄原子の受容能を有するタンパク質を同定し特性を明らかにすることは含硫補因子生合成系の全容を解明するために有意義であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、偏性嫌気性細菌 *Clostridium acetobutylicum* NBRC13948 の無細胞抽出液を材料とし、タンパク質合成阻害剤存在下で L-[³⁵S]システインをトレーサーとして用いることにより、活性型硫黄であるペルスルフィドを保持する能力を有するタンパク質を網羅的に検出する。³⁵S により標識されたタンパク質は、一次構造を解析し同定を行う。機能未知のタンパク質を見いだした場合には、その遺伝子をクローン化して大量発現系を構築し、精製タンパク質を得て *in vitro* でシステインデスルフラゼとの相互作用および硫黄原子授受の有無を確認する。硫黄原子の授受が認められる場合には、経時的な変化を解析する。また、同定されたタンパク質をコードする遺伝子を破壊して、生育速度や栄養要求性など表現型に与える影響を解析し生理的な機能について考察を行う。

3. 研究の方法

本研究課題では、*Clostridium acetobutylicum* NBRC13948 の無細胞抽出液を材料として用い、タンパク質合成阻害剤存在下で L-[³⁵S]システインをトレーサーとして添加し、活性型硫黄であるペルスルフィドを保持する能力を有するタンパク質を網羅的に検出することを試みる。本菌株は偏性嫌気性細菌であり、そのゲノム情報から活性型硫黄の生成タンパク質であるとされるシステインデスルフラゼおよびその相同タンパク質を5つ有しており、これらがそれぞれユニークな含硫化合物の生合成系に関与している可能性も想定される。これらのタンパク質を内在性の活性型硫黄の生成機構とみなしてトレーサー実験を行い、SDS-PAGE を行った後にオート

ラジオグラフィーで ^{35}S により標識されるタンパク質の検出を行った(図1)。この ^{35}S 標識がペルスルフィド様の硫黄であることを確認するために、還元剤 DTT 存在下でも同様の実験を行い、 ^{35}S 標識量に与える影響を確認した。見出された ^{35}S 標識タンパク質は、プロテインシークエンサーおよび質量分析計を用いて一次構造を解析し同定を行った。そのうち機能未知のタンパク質については、塩基配列情報をもとに遺伝子をクローン化し大量発現系を構築して精製タンパク質を調製した。これを用いてシステインデスルフラゼとの相互作用および硫黄原子授受の有無を *in vitro* で確認した。硫黄原子の授受が認められる場合には、作用機序の解明を目的として要求される補因子の有無や経時的な ^{35}S 標識量の変化を解析した。そして、同タンパク質をコードする遺伝子を破壊して、生育速度や栄養要求性など表現型に与える影響を詳細に解析し生理的な機能の解明を試みた。

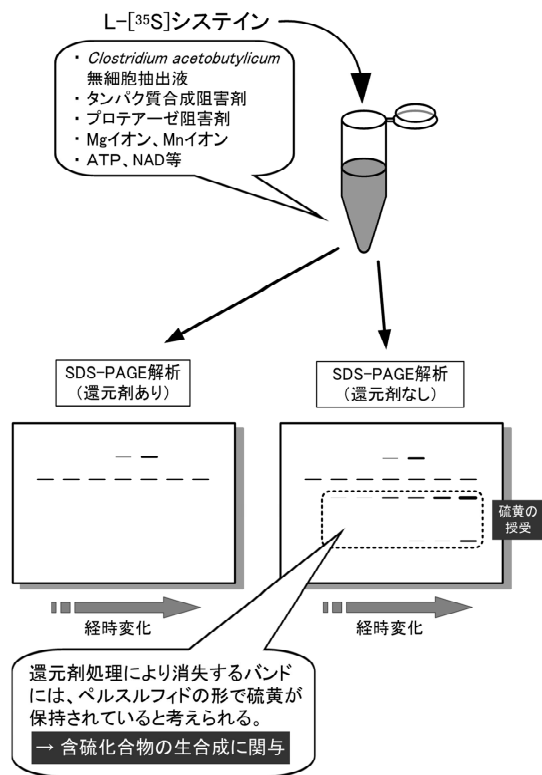


図1 トレーサー実験の概要

4. 研究成果

Clostridium acetobutylicum 無細胞抽出液に L- ^{35}S システインをトレーサーとして加えインキュベートした試料を SDS-PAGE により解析したところ、硫黄の転移反応に関与すると考えられる5つのタンパク質バンドがオートラジオグラフィーにより検出された(図2)。そのうちの一つである分子質量 16 kDa のバンドは NifU 様タンパク質であることが判明したため、当該遺伝子を PCR により調製し pCold 1 ベクターに挿入して発現系を構築した。この発現系より得られた組換え NifU 様タンパク質について、L- ^{35}S システインと大腸菌システインデスルフラゼ IscS を用いた硫黄転移系を用いて *in vitro* で硫黄受容能を解析した結果、 ^{35}S 放射標識量が経時的に増大していることが明らかになった(図3)。この結果から、*C. acetobutylicum* の NifU 様タンパク質は本菌株が生成する含硫化合物の合成初期段階において硫黄を供給する役割を担っていることが示唆された(図4)。一方、昨年度までの L- ^{35}S システイントレーサー実験により ^{35}S 標識されるタンパク質が他に4種見出されていた。これらの同定作業をプロテインシークエンサーを用いたエドマン分解

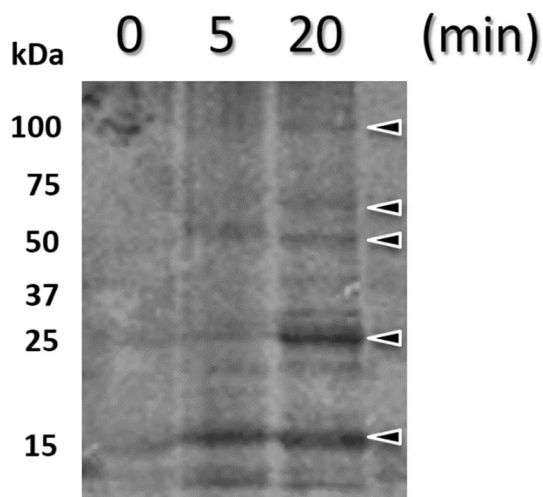


図2 ^{35}S 放射標識されたタンパク質の検出

量が増大していることが明らかになった(図3)。この結果から、*C. acetobutylicum* の NifU 様タンパク質は本菌株が生成する含硫化合物の合成初期段階において硫黄を供給する役割を担っていることが示唆された(図4)。一方、昨年度までの L- ^{35}S システイントレーサー実験により ^{35}S 標識されるタンパク質が他に4種見出されていた。これらの同定作業をプロテインシークエンサーを用いたエドマン分解

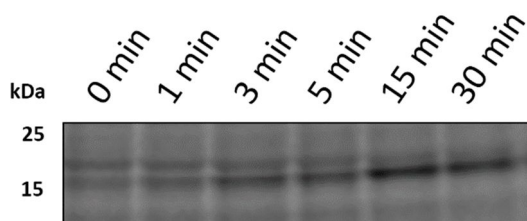


図3 NifU の ^{35}S 放射標識量の経時的変化

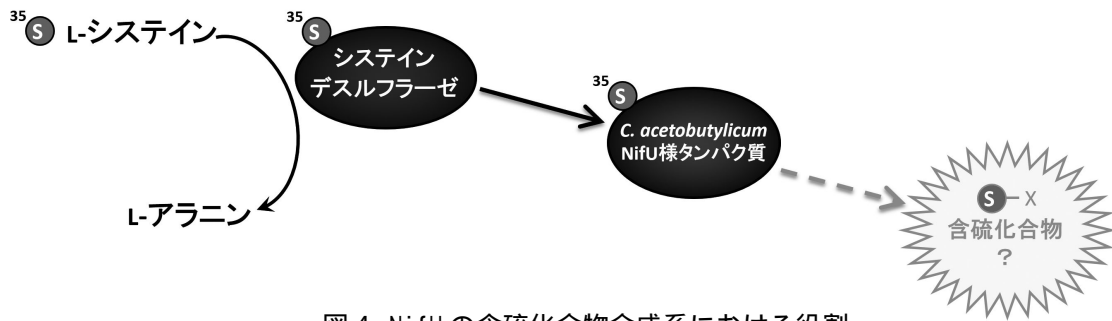


図4 NifUの含硫化合物合成系における役割

により試みたが同定できなかった。その原因として、試料タンパク質がいずれも極めて微量であること、また、タンパク質のN末端がアセチル化やホルミル化によって修飾されている可能性も考えられた。これらのタンパク質もまた、今回同定されたNifU様タンパク質と同様に硫黄受容能を有していると考えられ、含硫化合物合成系において重要な役割を担っていると示唆されるため、生理機能の解明を行っていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Muramatsu Hisashi, Miyaoku Haruna, Kurita Syuya, Matsuo Hidenori, Kashiwagi Takehiro, Kim Chul-Sa, Hayashi Motoko, Yamamoto Hiroaki, Kato Shin-Ichiro, Nagata Shinji	4. 巻 167
2. 論文標題 Gene cloning and characterization of thiourocyanate hydratase from Burkholderia sp. HME13	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 333 ~ 341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1093/jb/mvz098	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 間口洸樹, 村松久司, 原田泰輔, 長峰海斗, 柏木丈拓, 加藤伸一郎, 永田信治
2. 発表標題 Burkholderia sp. HME13のエルゴチオネイン代謝経路の解明: 3-(5-オキソ-2-チオキソイミダゾリジン-4-イル)プロピオン酸代謝酵素遺伝子の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第56回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田彩乃, 高野義人, 遠藤寿, 緒方博之, 櫻井哲也, 加藤伸一郎, 大西浩平, 森澤啓子, 樋口琢磨, 外丸裕司, 高橋迪子, 長崎慶三
2. 発表標題 渦鞭毛藻ウイルスのDNAポリメラーゼ活性中心は生物界の例外的存在か?
3. 学会等名 第44回藻類学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----