

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21780077

研究課題名（和文） 含硫化合物の生合成に関わるタンパク質の網羅的解析

研究課題名（英文） Proteins involved in 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・講師

研究者番号：60346707

研究成果の概要（和文）：システインデスルフラゼは、チアミンやビオチンなどの含硫化合物の生合成において活性型の硫黄を供給する役割を担っている。偏性嫌気性細菌クロストリジウムアセトブチリカムのシステインデスルフラゼ相同タンパク質を3種精製し性質を調べたところ、CAC2234が最も高いシステイン分解活性を示した。これを用いて L-[<sup>35</sup>S]システインによるトレーサー実験を行ったところ、経時的に <sup>35</sup>S 標識される5つのタンパク質が見出された。

研究成果の概要（英文）：Cysteine desulfurase is a PLP-dependent enzyme and generates sulfur atom for the biosynthesis of sulfur-containing compounds, such as thiamine, biotin, and FeS cluster. We purified three cysteine desulfurases from obligate anaerobe, *Clostridium acetobutylicum*, and characterized their enzymatic properties. CAC2234 showed highest reactivity on L-Cys, we thus used them to examine the sulfur transfer from L-[<sup>35</sup>S]Cys. We found five proteins specifically time-dependently labeled by <sup>35</sup>S.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 2011年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物酵素、含硫化合物

## 1. 研究開始当初の背景

生体内において硫黄原子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、ビオチン、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。これらの生体分子に存在する硫黄原子は極めて反応性が高く、アルデヒド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。申請者はこれまでに、このような反応性の高い硫黄原子を有する含硫補因子や、生理的重要度の高い含硫化合物の生合成機構の解明を目的とし、主に鉄-硫黄クラスターやチオウリジンの生合成を対象として研究を行ってきた。その結果、システインデスルフラゼが含硫化合物の生合成の初発段階とし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ラーゼは、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ラー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)”の形で保持される。このペルスルフィドは、含硫補因子の生合成に関与している特異的なタンパク質のシステイン残基を介して転移され生合成に利用される。例えば、鉄-硫黄クラスターの生合成においてはIscUタンパク質が、また、2-チオウリジンの生合成にはMnmAタンパク質が関与していることが報告されており、これらのタンパク質においては、システインデスルフララーゼから硫黄原子を“ペルスルフィド”の形で受けとることが明らかにされている。とりわけ後者については、X線結晶構造解析により硫黄原子の導入機構が詳細に解析されている。一方で、核酸塩基など多くの含硫補因子については生合成機構が未だ不明のまま残されている。申請者は、反応性が高く硫黄原子の導入が容易な“ペルスルフィド”が、これらの含硫補因子の生合成においても関与していると考えており、硫黄原子の受け渡しに関与するタンパク質を同定することが、含硫補因子の生合成系の全容を解明するためのブレークスルーになると考えている。

## 2. 研究の目的

本研究課題ではまず、微生物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-[<sup>35</sup>S]システインをトレーサーとして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。特に偏性嫌気性細菌であるクロストリジウムアセトブチリカムは、活性型硫黄の生成タンパク質であるシステインデスルフララーゼ相同タンパク質を5つ有しており、それぞれがユニークな含硫化合物の生合成に関与していると考えられた。<sup>[35S]</sup>により標識されるタンパク質は、一次構造を解析し同定を行う。機能未知のタンパク質が見いだされた場合には、その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得た後、*in vitro*でシステインデスルフララー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。さらに、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る。活性型硫黄の転移を指標にした含硫補因子生合成タンパク質群の網羅的な探索は、これまでに試みられたことのない新奇な研究である。これは、「含硫化合物の生合成では中間体としてペルスルフィドが関与する」という本研究ならではの着想によりもたらされたものである。これにより、タンパク質の相同性やモチ

ーフの情報を元にしたデータベース解析などの手法では見いだすことができない、含硫化合物の生合成に関与する新規タンパク質の知見が得られる。含硫化合物の生合成に関与するタンパク質を同定し、機能および性質を明らかにすることは、生産技術の開発に結びつくものと考えられる。含硫化合物にはビオチンやリポ酸などの水溶性ビタミンのように、いまや社会的に高い認知度を有するものも多く、本研究の成果は当該分野の発展に大きく貢献しうる。

## 3. 研究の方法

本研究課題においては、システインデスルフララーゼの研究が最も良くなされている大腸菌における知見を生かし、放射性同位元素により標識されたL-[<sup>35</sup>S]システインを用いてトレーサー実験を実施して硫黄原子授受に関与するタンパク質の検出と同定を行う。そのためにクロストリジウムアセトブチリカムに存在する5つのシステインデスルフララーゼ遺伝子(*cac2234*, *csc2354*, *cac2805*, *cac2972*, *cac3291*、図1)をPCRにてそれぞれ増幅し、Haloタグ付きタンパク質の発現系構築を行った(図2)。



図1 システインデスルフララーゼの一次構造

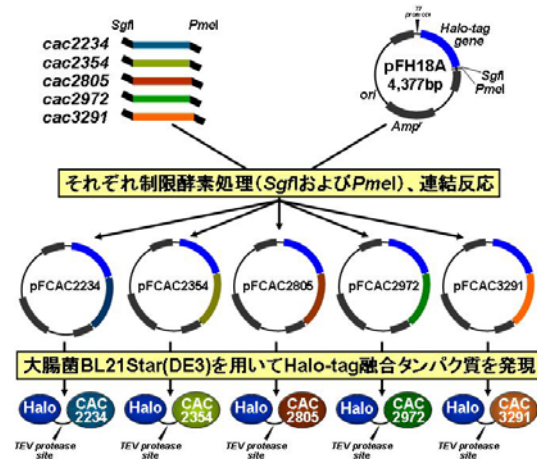


図2 発現系の構築

アフィニティ精製により調製したシステインデスルフララーゼはトレーサー実験に用いるとともに、*in vitro*の系で相互作用の確認およ

び硫黄原子授受の解析に使用した。また、当該タンパク質の遺伝子破壊株を作成し、含硫化合物の生合成系への関与についての考察をする。具体的には、微生物の無細胞抽出液に、タンパク質合成阻害剤（クロラムフェニコール）と、自己消化を防ぐためのプロテアーゼ阻害剤を添加する。そして L-[<sup>35</sup>S]システインを適量加え、一定時間インキュベートする。これを SDS-PAGE に供し、<sup>35</sup>S により標識されたタンパク質を検出する。標識されるタンパク質が多数見られる場合には、二次元電気泳動の実施も検討する。これにより、活性型硫黄の受容能を有するタンパク質が見いだされることが期待される。また、DTT 等の還元剤で処理し同様の実験を行う。これらの実験結果を比較することにより、<sup>35</sup>S による非特異的なタンパク質の標識（翻訳時におけるペプチド鎖へのシステインの取り込み）が仮に生じたとしても、目的とする活性型硫黄に由来するシグナルと明確に区別することができる。また、硫黄の受け渡しに複数のタンパク質が関与する可能性が考えられるため、インキュベートする時間を変えて同様の実験を行

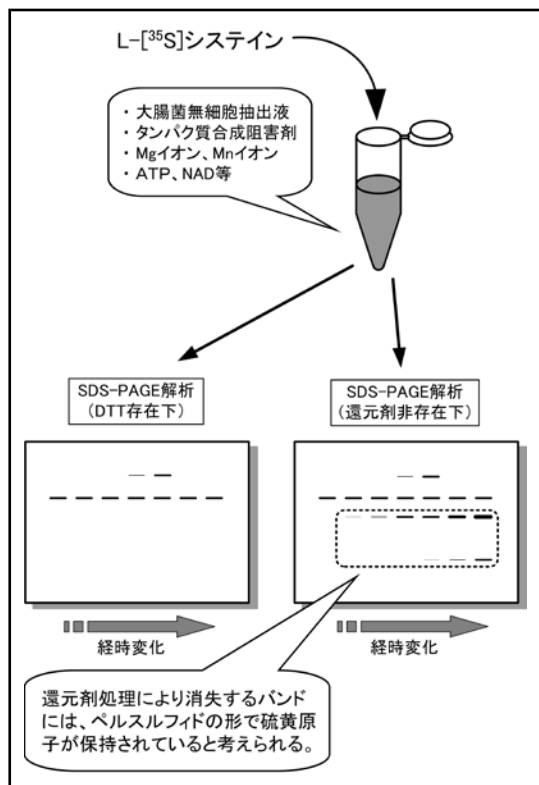


図3 硫黄転移反応の解析

い、<sup>35</sup>S による標識の経時的な変化の有無を調べる (図3)。

これらの実験により見いだされた標識タンパク質をゲルから回収し、MALDI-TOF 質量分析計およびプロテインシーケンサーを用いて一次構造を決定する。得られた一次構造を元にデータベース検索を行い、遺伝子情報を獲

得する。そして PCR により目的のタンパク質をコードする遺伝子を増幅し、T7 プロモータを有するベクターを使用して高発現プラスミドを構築する。これを用いて大腸菌内で誘導・発現させたのちに遺伝子産物の精製を行う。得られた遺伝子産物を用いて、*in vitro* でシステインデスルフラゼとの相互作用の有無を、SPR 解析装置および既に取り得済みの抗システインデスルフラゼ抗体を用いた免疫沈降により調べる。見いだされた標識タンパク質とシステインデスルフラゼの間の硫黄受け渡しの有無をオートラジオグラフィにより確認する。硫黄原子の授受に必要なとされる因子（ヌクレオチドや金属など）の探索を行うとともに添加の効果を解析する。また、得られた遺伝子産物とシステインデスルフラゼを L-[<sup>35</sup>S]システイン存在下で一定時間インキュベートした後、プロテアーゼ処理を行い、<sup>35</sup>S により標識されたペプチドを高速液体クロマトグラフィーにより単離する。このペプチドを MS/MS 解析することにより活性型硫黄の保持に関与するシステイン残基の同定を行う。また、見いだされたタンパク質は、その遺伝子を相同組換えにより破壊し、遺伝子破壊株を調製する。得られた遺伝子破壊株の生育速度や栄養要求性などの表現型を調べる。さらに、各種の含硫化合物の存在量を高速液体クロマトグラフィーや、酵素活性を指標としたバイオアッセイにより解析し、同定された標識タンパク質がどの含硫化合物の生合成に関与しているか明らかにする。同定された標識タンパク質に対する抗体を作成し、システインデスルフラゼ以外に相互作用するタンパク質がないか、免疫沈降実験により確認する。

#### 4. 研究成果

大腸菌のシステインデスルフラゼ (IscS) および無細胞抽出液を用いた活性型硫黄転移反応の解析結果から、既報の通り IscU タンパク質への硫黄転移反応が確認できた。そこで、5つのシステインデスルフラゼを有しながら、それぞれの生理的役割が未解明である偏性嫌気性細菌クロストリジウムアセトブチリカムを対象として、硫黄転移反応の解析を試みた。まず、5つのシステインデスルフラゼ遺伝子をそれぞれ PCR により増幅し、pFH18A プラスミドの *SgfI*・*PmeI* サイトに挿入し、発現用プラスミドをそれぞれ作成した。これらを用いて大腸菌で Halo タグ付システインデスルフラゼとして発現させたところ、3つのシステインデスルフラゼ遺伝子 (*cac2234*, *csc2354*, *cac3291*) の遺伝子産物の過剰発現が認められた。そこでアフィニティカラムに無細胞抽出液をそれぞれ供し、TEV プロテアーゼにより Halo タグを切断しシステインデスルフラゼ標品を調製した (図4)。



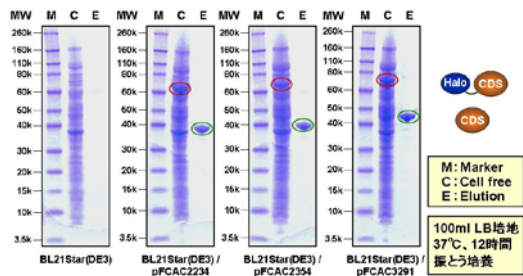


図4 システインデスルフララーゼの調製

得られた精製標品の吸光スペクトルを測定したところ、いずれも波長 420nm 付近において吸収が認められたことから、PLP を結合しているものと考えられた (図5)。

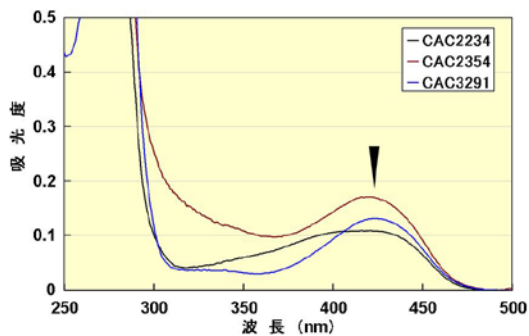


図5 精製標品の吸光スペクトラム

また、3種のシステインデスルフララーゼの基質特異性を解析したところ、大腸菌などのシステインデスルフララーゼと同様に L-セレノシステインに対しても高い反応性を示した。一方、L-システインに対する反応性をそれぞれ調べた結果、CAC2234 が CAC2354、CAC3291 よりも6倍以上高い活性を示すことが分かった。このことから、CAC2234 が偏性嫌気性細菌クロストリジウムアセトブチリカムの含硫化合物の生合成において重要な役割を担っている可能性が示唆された (図6)。

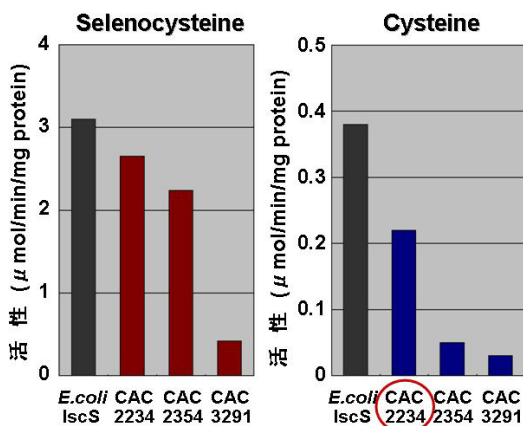
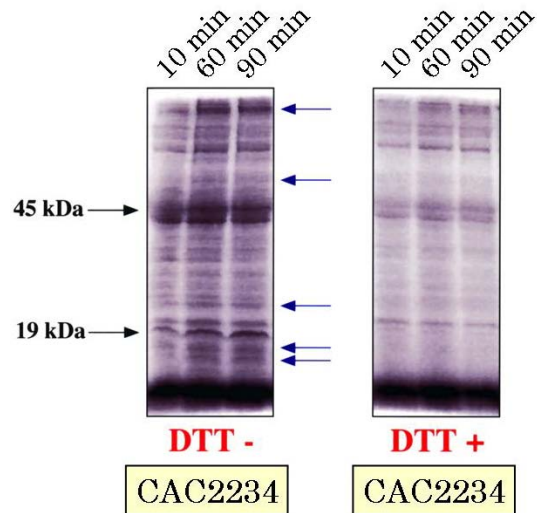


図6 精製標品の各基質に対する反応性

これらの精製標品を培養したクロストリジウムアセトブチリカムより調製した無細胞抽出液にそれぞれ添加し、さらに L-[<sup>35</sup>S]システインを加えて、<sup>35</sup>S 標識の経時的な変化をオートラジオグラフィーにより解析した (図7)。その結果、CAC2234 を添加した場合に CAC2234 および IscU 相同タンパク質以外に少なくとも5つのタンパク質 (図7矢印) が特異的に <sup>35</sup>S 標識されていることが明らかになった。



この <sup>35</sup>S による標識は試料中に還元剤である DTT を添加することにより消失することから、タンパク質にペルスルフィドの形で保持されている硫黄であることが強く示唆された。これらの5つのタンパク質についてアミノ酸シーケンサーを用いて一次構造を解析し同定作業を行ったところ、24 kDa 付近に認められたタンパク質は、plant defensin に見られるタンパク質モチーフを有しており、一次構造では高度に保存されている8つのシステイン残基を含んでいた。このタンパク質の生理的な機能については不明であり、さらなる解析が必要である。また、5つのシステインデスルフララーゼおよびこの 24 kDa タンパク質についてはそれぞれ遺伝子の破壊を試みているが、破壊株は取得できていない。遺伝子破壊により致命的な影響がある可能性も考えられるため、プラスミドにより各遺伝子の相補しながら、破壊株を探索することを検討している。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計4件)

① 加藤 伸一郎、梅川 美沙、浜田 朋江、

相川 良雄、岩崎 貢三、スズシロソウ  
由来 plant defensin の昨日と特徴、日本  
生化学会 第84回大会、2011年9月22日、  
国立京都国際会館

② 内牧 陽菜、大西 浩平、加藤 伸一郎、  
ビフィズス菌が有するシステインデスル  
フラゼの生理機能と特徴、日本生化学  
会 第84回大会、2011年9月24日、国立  
京都国際会館

③ 加藤 伸一郎、梅川 美沙、浜田 朋江、  
相川 良雄、岩崎 貢三、Molecular  
characterization of plant defensin  
from *Arabis flagellosa*、日本生化学会  
第83回大会、2010年12月8日、神戸国  
際会議場

④ 梅川 美紗、浜田 朋江、加藤 伸一郎、  
相川 良雄、岩崎 貢三、カドミウム処  
理により誘導されるスズシロソウの  
plant defensin の構造と特徴、日本土壤  
肥料科学会 2009年京都大会、2009年9月  
15日、京都大学農学部

## 6. 研究組織

### (1) 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・講師  
研究者番号：60346707

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし