

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05345

研究課題名（和文）S-スルフヒドリル化タンパク質の網羅的解析による含硫化合物生合成機構の解明

研究課題名（英文）Biosynthetic mechanism of sulfur-containing compounds by comprehensive analysis of S-sulphydrylated proteins

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） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：大腸菌MG1655の無細胞抽出液を試料としてL-[35S]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35S標識されるタンパク質が見出した。in vitroにおいて、これらとシステインデスルフラゼの間の硫黄原子の受け渡しについて確認を行ったところ、経時的な[35S]標識量の変動が認められた。大腸菌にはIscS、SufS、CsdAの3種システインデスルフラゼの存在が認められており、それぞれを用いた場合の[35S]標識量についても確認を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内には存在量は微量ながら高い生理活性を有するチアミン、ビオチン、リボ酸、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含硫化合物の存在が知られている。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、含硫化合物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示唆された。この知見を生かすことで、含硫化合物の生合成プラットフォームの構築が可能となり、効率的かつ安価な生産が可能になると期待される。

研究成果の概要（英文）：Tracer experiments with L-[35S]cysteine in cell-free extracts of *E. coli* MG1655 revealed proteins that were 35S-labeled over time, and the transfer of sulfur atoms between them and cysteine desulfurase was confirmed in vitro. Variations in the amount of [35S]-labeling over time were observed. Since three cysteine desulfurases, IscS, SufS, and CsdA, are known to exist in *E. coli*, we also confirmed the amount of [35S]-labeling when using each of them.

研究分野：応用微生物学

キーワード：S-スルフヒドリル化 システイン代謝 トレーサー実験

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内において硫黄は多様な分子に含まれており、例えばタンパク質中の含硫アミノ酸やグルタチオン、コンドロイチン硫酸などの形で多量に存在している。一方、存在量は微量ながら、チアミン、ビオチン、リボ酸といったビタミン類、また、鉄-硫黄クラスター、モリブドプテリンなどの補欠分子族、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おり、これらは含硫化合物と称される。含硫化合物の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。これまでに大腸菌の鉄-硫黄クラスター形成において、システインがシステインデスルフラゼである IscS によって酵素的に分解され活性型硫黄“ペルスルフィド”を生成し、特異的なタンパク質間相互作用を介して IscU を S-スルフヒドリル化することで硫黄原子を転移することが示されている。大腸菌には IscS 以外にも CsdA、SufS といったシステインデスルフラゼを有することが知られている。これらはいずれも含硫化合物の生合成に関与していると考えられるものの詳細な生理的機能やターゲットとする含硫化合物生合成タンパク質については未解明な点が残されている。近年、高等生物において S-スルフヒドリル化やポリスルフィド化といったタンパク質などの修飾反応がこれまで考えられていたよりも高頻度で生じていることが注目されており、細胞内における硫黄動態を包括的に理解することが求められている。

2. 研究の目的

大腸菌には未同定のものも含め、様々な含硫化合物が存在している。L-³⁵Sシステインおよびシステインデスルフラゼを用いて *in vitro* で硫黄転移反応を生じさせ、含硫化合物の生合成機構に関わるタンパク質を S-スルフヒドリル化を指標として網羅的に検出、同定することを試みた。含硫化合物の生合成においては、細胞毒性の高い硫化物イオンを生じさせることなく、反応性が高い硫黄原子を含硫化合物、あるいはその前駆物質に効率的かつ確実に導入することが重要であり、この点を考慮するとタンパク質中のシステイン残基を介したペルスルフィドなどの S-スルフヒドリル化は細胞内の含硫補因子の生合成において、普遍的に見出される現象であると想定された。これまでに生理活性の高い多種多様な含硫化合物の存在が明らかにされてきたが、中にはチオウリジンなどの含硫核酸塩基のように、細胞内における存在量が極めて少ないものもある。本研究計画の S-スルフヒドリル化反応を指標とする手法は高感度であるため、これまで検出できなかった新規な含硫化合物の検出についても期待できる。ひいては細胞内の硫黄代謝に軸足を置いたシステム生物学の確立が可能になると考えられ、それを目指すうえで必要とされる基盤的な知見が得られるものと期待される。

3. 研究の方法

大腸菌 MG1655 を LB 培地を用いて培養を行った後、窒素置換して嫌気条件下で菌体を破碎した。これにタンパク質合成阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤を添加し、さらに L-³⁵Sシステインを添加して硫黄転移反応をみるトレーサー実験を行った(図1)。内在性のシステインデスルフラゼである IscS に加え、別途、調製した CsdA や SufS を添加することで S-スルフヒドリル化を促進した。これを SDS-PAGE に供してオートラジオグラフィーにより ³⁵S 標識を検出した。一般的に SDS-PAGE では還元剤としてジチオスレイトールを試料に加えるが、本実験条件では還

元剤無しで解析を行っている。³⁵S 標識されたタンパク質バンドについては、プロテインシーケンサーおよび MALDI/TOF-MS により分析し、同定を試みた。同定された ³⁵S 標識タンパク質については、ゲノム配列情報に基づき遺伝子全長をそれぞれ PCR により増幅して、当該遺伝子の高発現プラスミドを構築した。そして、これらを用いて大腸菌 BL21(DE3)にて ³⁵S 標識タンパク質をそれぞれ発現誘導させて無細胞抽出液を調製し、ニッケルキレートカラムを用いたアフィニティー精製によりそれぞれタンパク質標品を得た。得られたタンパク質標品と調製済みのシステインデスルフラゼを用いて、*in vitro*での硫黄転移反応を経時的に確認するとともに、相互作用の有無をヒスチジンタグ pull-down アッセイにより解析した。また、³⁵S 標識タンパク質の遺伝子欠損株の生育特性や栄養要求性について確認した。

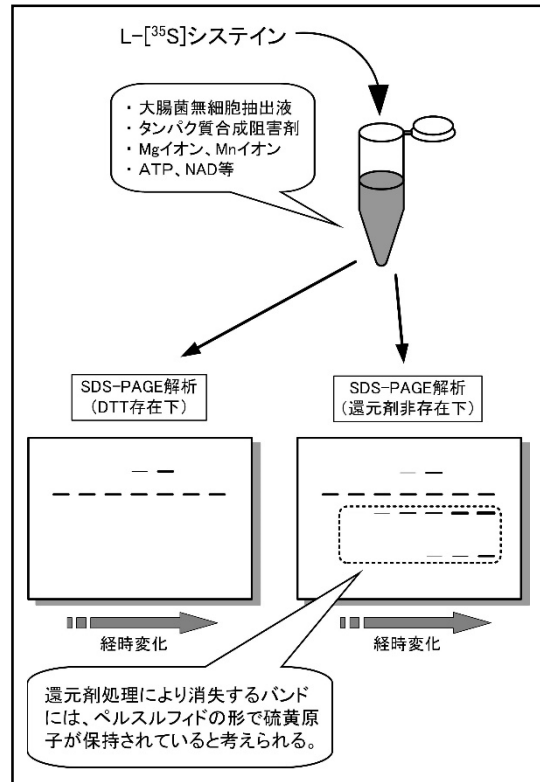


図1 トレーサー実験の概略

4. 研究成果

大腸菌の3つのシステインデスルフラゼ (IscS, CsdA, SufS) の遺伝子をそれぞれ PCR で増幅し、pET21a(+)ベクターの NdeI-XhoI 部位に挿入して高発現プラスミドを調製した(図2)。得られたプラスミドを大腸菌 BL21(DE3)に導入、発現誘導させて無細胞抽出液を調製し、ニッケルキレートカラムを用いたアフィニティー精製によりそれぞれのシステインデスルフラゼ標品を得た。オ

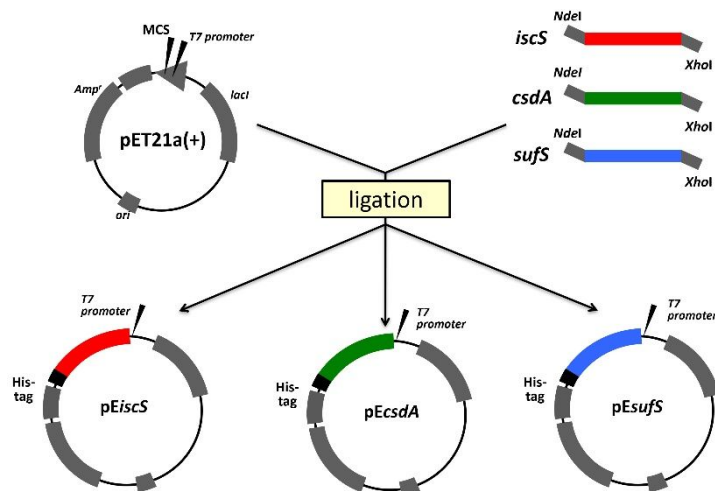


図2 発現ベクターの構築

ートラジオグラフィーはイメージングプレートを用い、BAS2000 システム (富士フィルム社製)にて測定を行った。L-[³⁵S]システインを添加した後の経時的な変化を確認したところ、システインデスルフラゼ IscS が検出された。IscS は活性中心のシステイン残基にペルスルフィドを形成することが知られており、予想された通りの結果と言える。その他に分子質量 16 kDa 付近に ³⁵S 標識タンパク質が確認され、プロテインシーケンサーによる一次構造解析の結果、IscU タンパク質であると同定された。IscS と IscU については特異的相互作用を介して複合体を形成し、鉄-硫黄クラスターの生合成に関与することが示されており、本研究での結果と矛盾しない。また、この他に鉄キレーター2,2'-bipyridyl を終濃度で 1 mM 添加した条件で L-[³⁵S]システイントレーサー実験を行ったところ、新たに分子質量 59kDa、62 kDa、78 kDa、95 kDa 付近に特異的に ³⁵S 標識されたバンドが検出された(図3)。これらは本研究にて検出を目指す S-スルフヒ

ドリル化タンパク質であると考えられたため、プロテインシーケンサーによる一次構造解析を実施し 59kDa および 78 kDa のバンドについては同定済みである（詳細は知財権との関連で未開示）。存在量が微量であるため未同定となっている残りの ^{35}S 標識タンパク質についても同定作業を継続している。同定済みの 59kDa および 78 kDa のタンパク質については発現系を構築し、前述のシステインデスルフラゼと同様の方法で精製標品を調製した。これらとシステインデスルフラゼを用いた *in vitro* 硫黄転移実験において、S-スルフヒドリル化が再現されることを確認している。またヒスチジンタグ pull-down アッセイによる解析の結果、59kDa および 78 kDa タンパク質いずれも IscS と共精製され相互作用していることが示唆されたが精製量が少ないため、IscS と IscU ほどの強い親和性は無いものと考えられた。そして、59kDa および 78 kDa タンパク質の遺伝子破壊株についても解析を進めているが、生育速度および栄養要求性のいずれについても野生型との大きな違いは見られなかった。それぞれが生合成に關与する含硫化合物が分からないため詳細は不明であるが、特定の生育条件下で生理的な機能を示す可能性もあることから、貧栄養培地での培養や酸化ストレス下での培養について、生育特性の検討を継続している。

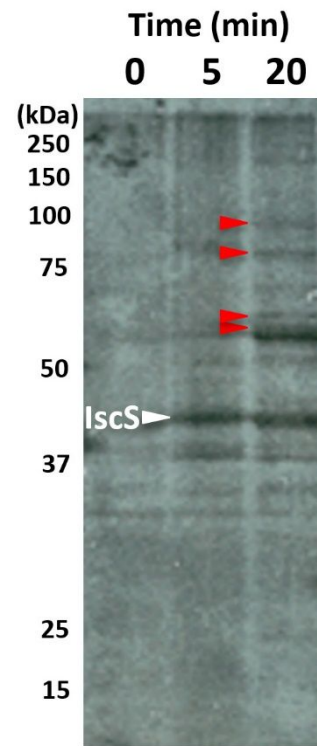


図3 ^{35}S 標識タンパク質の検出

貧栄養培地での培養や酸化ストレス下での培養について、生育特性の検討を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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, Koujitani Akihito, Yamada Masaaki, Maguchi Hiroki, Kashiwagi Takehiro, Kato Shin-ichiro	4. 巻 87
2. 論文標題 Characterization of hydantoin-5-propionic acid amidohydrolase involved in ergothioneine utilization in <i>Burkholderia</i> sp. HME13	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 411 ~ 419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbad002	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Muramatsu Hisashi, Inouchi Daisuke, Yamada Masaaki, Koujitani Akihito, Maguchi Hiroki, Kato Shin-ichiro	4. 巻 88
2. 論文標題 Purification and characterization of 3-(5-oxo-2-thioxoimidazolidin-4-yl) propionic acid desulfhydrase involved in ergothioneine utilization in <i>Burkholderia</i> sp. HME13	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 74 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbad139	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 木和田康太, 山元小楨, 加藤伸一郎
2. 発表標題 大腸菌D-アラニル-D-アラニンリガーゼ変異型酵素の特性解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 廣出隼正, 谷口優人, 加藤伸一郎
2. 発表標題 部位特異的変導入によるL-アラニン脱水素酵の基質特異性改変試み
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部2022年度大会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------