

令和 6 年 6 月 7 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：21K07005

研究課題名(和文) 類鼻疽菌の感染力増強因子エルゴチオネインが細胞内で分解されない仕組みの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism which ergothioneine, a virulence-enhancing factor in *Burkholderia pseudomallei*, is not degraded intracellularly.

研究代表者

村松 久司 (Muramatsu, Hisashi)

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：90437343

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)：Burkholderia sp. HME13の3-(5-オキソ-2-チオキソイミダゾリジン-4-イル)プロピオン酸デスルフヒドラーゼ、ヒダントイン-5-プロピオン酸アミドヒドロラーゼ、N-カルバミル-L-グルタミン酸アミドヒドロラーゼをコードするertCDE遺伝子を同定し、遺伝子産物の機能解析をした。Burkholderia sp. HME13のertCDEの発現はエルゴチオネインとチオウロカニン酸に誘導された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Burkholderia sp. HME13のエルゴチオネイン分解に関わるすべての酵素を明らかにし、それぞれの精製酵素を用いて諸性質を明らかにした。特に、アミノ酸配列から機能を予測することができなかったタンパク質ファミリーに属するErtCの機能を同定したことは大きな成果の1つであり、今後、類似配列のタンパク質の機能同定に貢献するものと考えている。類鼻疽菌が合成した感染力増強因子エルゴチオネインが細胞内で分解されないのはエルゴチオナーゼがペリプラスムに局在するためと考えられ、本研究の成果が類鼻疽の予防法の開発に貢献することを期待している。

研究成果の概要(英文)：The ertCDE genes encoding 3-(5-oxo-2-thioxoimidazolidin-4-yl) propionic acid desulfhydrase, hydantoin-5-propionic acid amidohydrolase, and N-carbamyl-L-glutamic acid amidohydrolase from Burkholderia sp. HME13 were identified, and the gene products were characterized. The ertCDE expression in Burkholderia sp. HME13 were induced by ergothioneine and thiourocnic acid.

研究分野：微生物学、酵素学

キーワード：エルゴチオネイン分解 パークホルデリア属細菌

1. 研究開始当初の背景

エルゴチオネインは抗酸化作用をもつヒスチジン類縁体である。エルゴチオネインは微生物から動植物まで様々な生物から検出されるが、動植物はエルゴチオネインを生合成できず、一部の微生物が合成したエルゴチオネインが食物連鎖で動植物に移行すると考えられている。これまでに、微生物のエルゴチオネイン生合成経路は明らかにされていたが¹⁾、分解経路は不明であった。そこで、我々はエルゴチオネイン分解経路の解明に着手し、エルゴチオネインを窒素源として生育する土壌細菌 *Burkholderia* sp. HME13 のエルゴチオネイン代謝経路に関わると考えられるエルゴチオナーゼ (ErtA)²⁾ とチオウロカニン酸ヒドラターゼ (ErtB)³⁾ を同定し、これらの酵素遺伝子と諸性質を明らかにした (図1)。研究開始当初、以降のエルゴチオネイン代謝経路とその発現制御機構はわかっていなかった。

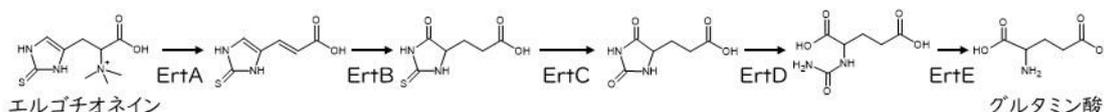


図1 *Burkholderia* sp. HME13 のエルゴチオネイン代謝経路

2018年、類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*) がエルゴチオネインを合成すること、およびエルゴチオネインが類鼻疽菌の感染力を増強することが報告された⁴⁾。また、ゲノムデータベース検索の結果、我々は類鼻疽菌がエルゴチオナーゼやチオウロカニン酸ヒドラターゼと高い相同性を持つタンパク質を持つことを見出したことから、類鼻疽菌はエルゴチオネイン合成経路と分解経路の両方を持つと考えた。類鼻疽菌の感染力に影響するエルゴチオネインの合成と分解がどのように制御されているか解明できれば、類鼻疽菌の感染予防に対する知見が得られると考えた。

2. 研究の目的

実験者の安全に配慮して、類鼻疽菌と同じ *Burkholderia* 属に分類され、エルゴチオネイン分解経路を持つ土壌細菌 *Burkholderia* sp. HME13 を実験に用いた。本菌株は *B. arboris* や *B. stabilis* と近縁である。本研究は、*Burkholderia* sp. HME13 のエルゴチオネイン分解経路の全容を解明するとともに、細胞内で合成されたエルゴチオネインが分解されない仕組みを分子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 微生物の培養

Burkholderia sp. HME13 はエルゴチオネイン培地 (0.023% エルゴチオネイン、0.5% グルコース、1.0% KH_2PO_4 、0.2% クエン酸、0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、pH 7.2)、または Luria-Bertani (LB) 培地に植菌し、30°Cで振とう培養した。

抗生物質を加えた LB 培地に形質転換した大腸菌を植菌し、37°Cで16時間振とう培養した後、1 mM イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを加えてから37°Cで3時間振とうし、導入した遺伝子の発現を誘導した。培養した大腸菌を遠心分離で集菌し、0.85% NaCl で洗浄してから-80°Cで保存した。

(2) 大腸菌を宿主とした遺伝子発現系の構築と遺伝子産物の精製

Burkholderia sp. HME13 のゲノム DNA を鋳型にして、PCR で *ertC* (アクセッション番号 LC540446)、*ertD* (アクセッション番号 LC728362)、*ertE* (論文準備中のため、アクセッション番号は非公開) 遺伝子を増幅し、得られた PCR 産物を pET21a に連結して大腸菌を形質転換した。

ErtD はヒスチジntag融合タンパク質として発現させたため、形質転換した大腸菌の粗酵素液を Ni-NTA His-Bind Resin カラムと Toyopearl DEAE-650M カラムに供して ErtD を均一に精製した。また、ErtC と ErtD は Toyopearl Butyl-650 M カラム、Toyopearl DEAE-650 M カラム、CHT ceramic hydroxyapatite Type I カラムを用いて均一に精製した。

(3) 酵素活性測定

(1) 3-(5-オキソ-2-チオキソイミダゾリジン-4-イル)プロピオン酸デスルフヒドラーゼ活性の測定

0.3 mM 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、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) から成る反応液に ErtC を加えて30°Cでインキュベートし、280nm の吸光度を連続的に測定することで、酵素反応で消費された 3-(5-オキソ-2-チオキソイミダゾリジン-4-イル)プロピオン酸を定量した。

(2) ヒダントイン-5-プロピオン酸アミドヒドロラーゼ活性の測定

15 mM ヒダントイン-5-プロピオン酸、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) から成る反応液に ErtD を加えて 30°C でインキュベートした。Inertsil ODS-4 カラム (GL Science) を備えた高速液体クロマトグラフ装置を用いて、酵素反応で消費されたヒダントイン-5-プロピオン酸を定量した。

(3) *N*-カルバミル-L-グルタミン酸アミドヒドロラーゼ活性の測定

10 mM *N*-カルバミル-L-グルタミン酸、0.1 M HEPES 緩衝液 (pH 7.2)、1.0 mM CoCl₂ から成る反応液に ErtE を加えて 30°C でインキュベートし、アンモニア-テストワコー (富士フィルム和光純薬工業株式会社) を用いて、酵素反応で生成したアンモニアを定量した。

4. 研究成果

(1) 3-(5-オキソ-2-チオキソイミダゾリジン-4-イル)プロピオン酸デスルフヒドラーゼ (ErtC) の諸性質^{5,6)}

ErtC の 3-(5-オキソ-2-チオキソイミダゾリジン-4-イル)プロピオン酸に対する K_m 、 V_{max} はそれぞれ 0.16 mM と 15 U/mg であった。ErtC は 35°C、pH 8.0 で最大の活性を示し、40°C 以下、pH 6.5~8.0 で安定であった。3-(5-オキソ-2-チオキソイミダゾリジン-4-イル)プロピオン酸の代わりに、L-エルゴチオネイン、D-エルゴチオネイン、*N,N*-ジメチル-L-2-チオヒスチジン、*N*-メチル-L-2-チオヒスチジン、L-2-チオヒスチジン、2-チオヒダントインを基質として酵素活性を測定したが、活性は検出されなかった。反応液に様々な金属イオンを加えて酵素活性を測定した結果、FeCl₂ と CuCl₂ が強く反応を阻害することがわかった。エルゴチオネインおよび、その代謝中間体であるチオウロカニン酸、ヒダントイン-5-プロピオン酸は ErtC による反応をそれぞれ 37%、68%、26% 阻害したが、エルゴチオネイン代謝中間体である *N*-カルバミル-L-グルタミン酸と L-グルタミン酸は ErtC の反応に影響しなかった。さらに、エルゴチオネインと構造が類似した D-エルゴチオネイン、*N,N*-ジメチル-L-2-チオヒスチジン、*N*-メチル-L-2-チオヒスチジン、L-2-チオヒスチジンも ErtC による反応をそれぞれ 52%、46%、51%、46% 阻害した。

Burkholderia sp. HME13 の *ertC* 発現量をリアルタイム PCR で測定した結果、エルゴチオネイン培地で培養した *Burkholderia* sp. HME13 細胞中の *ertC* 量は、LB 培地で培養した *Burkholderia* sp. HME13 細胞よりも約 17~20 倍高いことがわかった。また、LB 培地で培養した *Burkholderia* sp. HME13 の粗酵素液中には 3-(5-オキソ-2-チオキソイミダゾリジン-4-イル)プロピオン酸デスルフヒドラーゼ活性が検出されなかったが、エルゴチオネイン培地で培養した *Burkholderia* sp. HME13 の粗酵素液中には 0.0059 U/mg の 3-(5-オキソ-2-チオキソイミダゾリジン-4-イル)プロピオン酸デスルフヒドラーゼ活性が検出された。これらの結果から、*Burkholderia* sp. HME13 の *ertC* の発現は培地中のエルゴチオネインに誘導され、*ertC* はエルゴチオネイン資化に関わることを強く示唆された。

(2) ヒダントイン-5-プロピオン酸アミドヒドロラーゼ (ErtD) の諸性質⁷⁾

EDTA を含む緩衝液で ErtD を透析すると活性を失い、Mn²⁺を加えるとヒダントイン-5-プロピオン酸から *N*-カルバミル-L-グルタミン酸への反応を触媒することから、ErtD は金属依存性酵素であることがわかった。また、Mn²⁺の代わりに Co²⁺を加えた反応液でも比較的高い活性を示し、Mg²⁺、Fe²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺を加えた反応液では弱い活性を示した。さらに、Ca²⁺、Cu²⁺、Ba²⁺、Na⁺、Rb⁺、Cs⁺を加えた反応液では活性を示さなかった。ErtD のヒダントイン-5-プロピオン酸に対する K_m 、 V_{max} はそれぞれ 2.8 mM と 16 U/mg であった。ErtD は 45°C、pH 8.5 で最大の活性を示し、45°C 以下、pH 5.5~10.5 で安定であった。

Burkholderia sp. HME13 の *ertD* 発現量をリアルタイム PCR で測定した結果、エルゴチオネイン培地で培養した *Burkholderia* sp. HME13 細胞中の *ertD* 量は、LB 培地で培養した *Burkholderia* sp. HME13 細胞よりも約 3.3 倍高かった。また、LB 培地で培養した *Burkholderia* sp. HME13 の粗酵素液中にはヒダントイン-5-プロピオン酸アミドヒドロラーゼ活性が検出されなかったが、エルゴチオネイン培地で培養した *Burkholderia* sp. HME13 の粗酵素液中には 0.018 U/mg のヒダントイン-5-プロピオン酸アミドヒドロラーゼ活性が検出された。これらの結果から、*Burkholderia* sp. HME13 の *ertD* の発現は培地中のエルゴチオネインに誘導され、*ertD* はエルゴチオネイン資化に関わることを強く示唆された。

(3) *N*-カルバミル-L-グルタミン酸アミドヒドロラーゼ (ErtE) の諸性質

EDTA を含む緩衝液で ErtE を透析すると活性を失い、Co²⁺を加えると *N*-カルバミル-L-グルタミン酸から L-グルタミン酸への反応を触媒することから、ErtE は金属依存性酵素であることがわかった。また、Co²⁺の代わりに、Mn²⁺、Ni²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、Mg²⁺でも活性を示した。ErtE の *N*-カルバミル-L-グルタミン酸に対する K_m 、 V_{max} はそれぞれ 0.74 mM と 140 U/mg であった。ErtE は 60°C、pH 7.0 で最大の活性を示し、55°C 以下、pH 6.0~8.0 で安定であった。

Burkholderia sp. HME13 の *ertE* 発現量をリアルタイム PCR で測定した結果、エルゴチオネイン培地で培養した *Burkholderia* sp. HME13 細胞中の *ertE* 量は、LB 培地で培養した *Burkholderia* sp. HME13 細胞よりも高かった。また、LB 培地で培養した *Burkholderia* sp.

HME13 の粗酵素液中には *N*-カルバミル-L-グルタミン酸アミドヒドロラーゼ活性が検出されなかったが、エルゴチオネイン培地で培養した *Burkholderia* sp. HME13 の粗酵素液中には活性が検出された。これらの結果から、*Burkholderia* sp. HME13 の *ertE* の発現は培地中のエルゴチオネインに誘導され、*ertE* はエルゴチオネイン資化に関わることが強く示唆された。

(4) エルゴチオネイン分解関連酵素群の誘導因子

エルゴチオネイン培地のエルゴチオネインをチオウロカニン酸に置き換えた培地で *Burkholderia* sp. HME13 を培養し、粗酵素液中のエルゴチオナーゼ活性、チオウロカニン酸ヒドラターゼ活性、3-(5-オキソ-2-チオキソイミダゾリジン-4-イル)プロピオン酸デスルフヒドラーゼ活性、ヒダントイン-5-プロピオン酸アミドヒドロラーゼ活性、*N*-カルバミル-L-グルタミン酸アミドヒドロラーゼ活性を測定した。その結果、すべての酵素活性がエルゴチオネイン培地で培養した *Burkholderia* sp. HME13 細胞と同程度検出されたことから、*ertA*、*ertB*、*ertC*、*ertD*、*ertE* はエルゴチオネイン代謝中間体であるチオウロカニン酸に誘導されることが示唆された。

タンパク質のシグナルペプチド配列を予想する SignalP と細胞内局在を予想する PSORTb で解析した結果、*Burkholderia* sp. HME13 のエルゴチオナーゼ (*ErtA*) の N 末端にはシグナル配列があり、ペリプラズムに局在すると予想された²⁾。また、*ErtB*、*ErtC*、*ErtD*、*ErtE* は細胞質に局在すると予想された。これらの予想から、*Burkholderia* sp. HME13 細胞に取り込まれたエルゴチオネインはペリプラズムでチオウロカニン酸に変換され、その後、細胞質内に輸送されてグルタミン酸にまで代謝されると考えた。類鼻疽菌の細胞内で合成されたエルゴチオネインが分解されないのは、エルゴチオネイン代謝関連酵素群のうち、エルゴチオナーゼのみがペリプラズムに局在するためであると考えている。

引用文献

1. Seebeck F. P., *J Am Chem Soc* (2010) 132:6632
2. Muramatsu H. *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* (2013) 97:5389
3. Muramatsu H. *et al.*, *J Biochem* (2020) 167:333
4. Gamage A. M. *et al.*, *FASEB J* (2018) 32:6395
5. Muramatsu H. *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem* (2021) 85:626
6. Muramatsu H. *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem* (2024) 88:74
7. Muramatsu H. *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem* (2023) 87:411

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hisashi Muramatsu, Akihito Koujitani, Masaaki Yamada, Hiroki Maguchi, Takehiro Kashiwagi, Shin-ichiro Kato	4. 巻 87
2. 論文標題 Characterization of hydantoin-5-propionic acid amidohydrolase involved in ergothioneine utilization in Burkholderia 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 Hisashi Muramatsu, Daisuke Inouchi, Masaaki Yamada, Akihito Koujitani, Hiroki Maguchi, Shin-ichiro Kato	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 Burkholderia sp. HME13	5. 発行年 2024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 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田 雅彬, 梶谷 啓仁, 柏木 丈弘, 加藤 伸一郎, 村松 久司
2. 発表標題 Burkholderia sp. HME13由来ヒダントイン-5-プロピオン酸アミドヒドロラーゼの諸性質
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023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
研究 分 担 者	柏木 丈弘 (Kashiwagi Takehiro) (60363256)	高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・教授 (16401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	若松 泰介 (Wakamatsu Taisuke) (60597938)	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 (16401)	

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