

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780075

研究課題名(和文) ビフィズス菌における含硫化合物生合成コンポーネントの探索と機能解析

研究課題名(英文) Sulfur-containing compounds biosynthesis in *Bifidobacterium bifidum*

## 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・准教授

研究者番号：60346707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内では様々な化学反応が生じており、その多くは生体触媒である酵素によって司られている。酵素にはチアミン、ビオチン、鉄-硫黄クラスターなどの含硫補因子を必要とするものがある。ビフィズス菌の含硫化合物生合成機構を理解するためにL-[35S]システインによるトレーサー実験を行ったところ、硫黄受容能を示すタンパク質の存在が確認された。また、システインデスルフラゼ活性はBad0711およびBad0714により増大することが明らかになった。これらのタンパク質によりシステインデスルフラゼの[35S]標識量が著しく減少しており、システインデスルフラゼのターンオーバーを促進している可能性が示唆された。

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 used L-[35S]cysteine as a tracer to identify proteins that accept sulfur atom for the biosynthesis of sulfur-containing cofactors in *Bifidobacterium adorescentis*. We have detected two 35S-labeled proteins by autoradiography. We also focused on the five genes located around cysteine desulfurase gene. Bad0711 and Bad0714 enhanced the cysteine desulfurase activity and diminished the amount of 35S-label on cysteine desulfurases molecule, respectively. These results suggest that Bad0711 and Bad0714 promote the removal of sulfur on cysteine desulfurases.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：含硫化合物

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内では生命の営みを維持するために様々な化学反応が生じており、その多くは生体触媒である酵素によって司られている。酵素がその機能を発揮するためにチアミン、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、硫黄原子を含む補因子(含硫補因子)を要求するものが多く存在していることから、これらの低分子化合物の重要性は広く認知されている。しかしながら、これら含硫化合物の生合成機構については十分に理解できていない。これまで鉄-硫黄クラスターの生合成を対象として研究を行ってきた結果、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なった。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、他の多くの含硫補因子については生合成機構の解明が未だ手つかずのまま残されている状況である。含硫化合物の生合成において反応性の高い“ペルスルフィド”が普遍的に用いられていると考えているが、その全容は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、ビフィズス菌 *Bifidobacterium adolescentis* における含硫化合物生合成系の特徴と機能の解明を目的としている。本菌株はグラム陽性の偏性嫌気性桿菌で、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ゼ相同タンパク質を3つ(Bad0713、Bad0913、Bad1591)有しており、それぞれ含硫化合物の生合成に関与していると考えられている。しかしながら、これらパラログ間における機能特性、生理的役割などの違いについてはよく分かっていない。システインデスルフラゼはL-システインに作用しアラニンと硫黄を生成すること、そしてその硫黄が含硫化合物の生合成に用いられていることが強く示唆されるが実証はできていない(図1)。

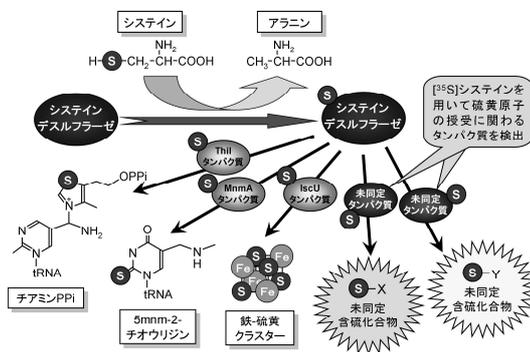


図1 システインデスルフラゼの想定される役割

なかでもシステインデスルフラゼ Bad0713 をコードする遺伝子は、大腸菌の先行研究で報告されている *suf* 遺伝子群と同様のオペロン構造を有しており、含硫化合物の生合成において協調的に機能することが強く示唆されている(図2)。

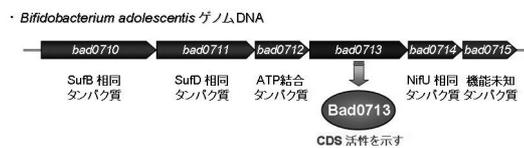


図2 bad0713 遺伝子を含むオペロン構造

これらのタンパク質の間で含硫化合物の生合成に使われる硫黄原子が受け渡されると考えられるため、 $[^{35}\text{S}]$ による標識の有無を調べる。また、各タンパク質間の相互作用を通じて、硫黄原子の転移量や Bad0713 のシステインデスルフラゼ活性値に与える影響を *in vitro* で解析する。

### 3. 研究の方法

ビフィズス菌 *B. adolescentis* のタンパク質のうち、システインデスルフラゼからペルスルフィドを受容する能力を持つものを検出するため、L- $[^{35}\text{S}]$ システインを用いたトレーサー実験を行った。100ml の MRS 液体培地で1週間25℃で静地培養した後、遠心分離によって集菌し、超音波破碎により調製した無細胞抽出液を材料として用いた。プロテアーゼ阻害剤およびタンパク質合成阻害剤存在下でL- $[^{35}\text{S}]$ システインを添加して37℃でインキュベートした。その後試料を二次元電気泳動に供してタンパク質を分離し、オートラジオグラフィーによって $^{35}\text{S}$ 標識されたタンパク質の有無を解析した。ペルスルフィドはジチオスレイトールなどの還元剤により処理することによりタンパク質分子から遊離すると考えられるため、ゲルに認められた $^{35}\text{S}$ がペルスルフィドに由来するものか否か、還元剤未処理区と比較することにより見分けることができる(図3)。また、先行している大腸菌の研究報告にもとづき、ビフィ

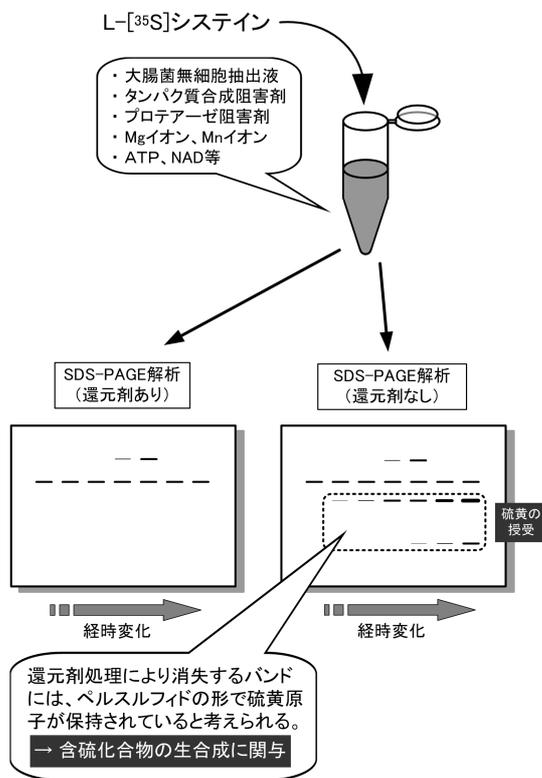


図3 L-[<sup>35</sup>S]システインによるトレーサー実験

ズス菌 *B. adolescentis* のシステインデスルフララーゼ遺伝子 *bad0713* およびオペロンを構成している遺伝子 (*bad0710*、*bad0711*、*bad0712*、*bad0714*、*bad0715*) を PCR にてそれぞれ増幅し、His タグ付きタンパク質の発現系構築を行った (図4)。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。

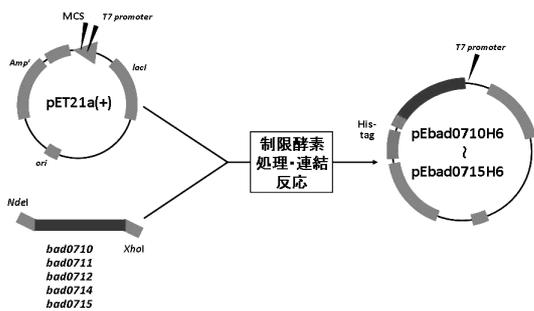


図4 大腸菌を宿主とした各遺伝子の発現系構築

#### 4. 研究成果

L-[<sup>35</sup>S]システインを用いたトレーサー実験の結果、経時的に <sup>35</sup>S 標識量が増大するスポットが検出された。そこで、PVDF 膜に転写した後、プロテインシーケンサーを用いて N 末端配列の解析を試みた。しかしながら、量的に極めて少量であったため、有意な PTH アミノ酸シグナルを得ることはできなかった。

今後、スケールアップし再度プロテインシーケンサーで解析を行うか、MALDI-TOF/MS 等、他の方法にて解析手法を試みる必要があると考えられる。一方、*Bad0713* の遺伝子オペロンに着目した解析では各遺伝子の大量発現系を構築することができた (図5)。これらをもとに金属アフィニティ精製を行い、各遺伝子産物の精製標品を得た。

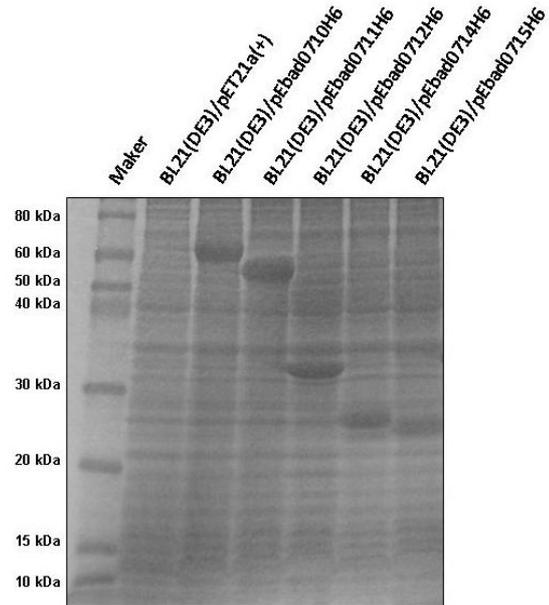


図5 オペロンを構成する各遺伝子の発現の様子

これらを用いて *Bad0713* のシステインデスルフララーゼ活性に与える影響を調べたところ、*Bad0711* を添加した場合に約 4.5 倍、*Bad0714* を添加した場合に約 2.5 倍の活性値が得られた。一方、*Bad0710*、*Bad0712*、*Bad0715* を添加した場合には、活性値に変化はみられなかった (図6)。

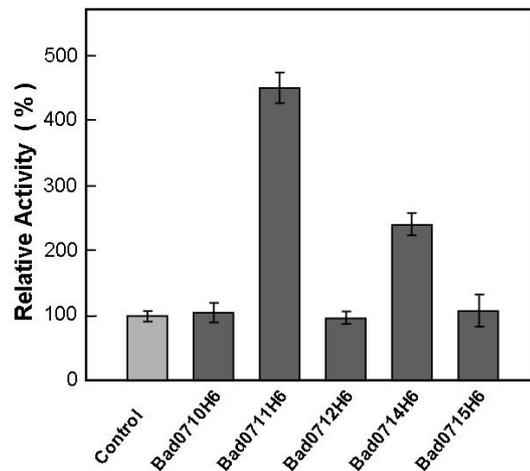


図6 システインデスルフララーゼ活性に対する影響

そこで各遺伝子産物がシステインデスルフララーゼ内に保持されている硫黄に対して与える影響をオートラジオグラフィーで解

析したところ、活性化が認められた Bad0711、Bad0714 においては、システインデスルフララーゼに保持されている硫黄が経時的に著しく減少していることが確認された (図 7)。

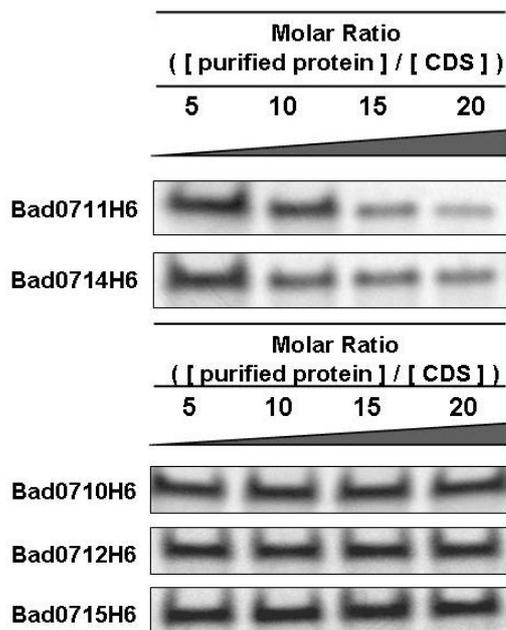


図 7 システインデスルフララーゼの  $^{35}\text{S}$  標識量

これらの結果から Bad0713 の活性化は酵素分子内に保持されている  $^{35}\text{S}$  を Bad0711 および Bad0714 が除去することにより、Bad0713 のターンオーバーが促され、活性型に再生されるというモデルが考えられた (図 8)。



図 8 システインデスルフララーゼの活性化モデル

今後、さらなる活性化と硫黄転移の機構の解明を行うために、Bad0711 および Bad0714 に  $^{35}\text{S}$  標識が転移するかどうか、早急に確認する必要がある。またオペロンに由来する遺伝子産物を複数種組み合わせさせて添加し、システインデスルフララーゼ活性への影響や、二次的な  $^{35}\text{S}$  標識の転移を追跡する必要があると考えられる。

## 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)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

内牧 陽菜、大西 浩平、加藤 伸一郎、ピフィズス菌が有するシステインデスルフララーゼの生理機能と特徴、日本生化学会

第 85 回大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]  
なし

## 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・准教授  
研究者番号：60346707

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし