

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25850052

研究課題名(和文)エルゴチオネイン代謝酵素群の分子機能、立体構造および生理機能の解析

研究課題名(英文) Characterization, structural analysis and physiological analysis of ergothioneine-metabolizing enzymes.

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Burkholderia sp. HME13のエルゴチオネイン(ERT)分解に関わると推定される新奇酵素遺伝子(ertB、ertC、ertD)を発見した。大腸菌を宿主としてこれらの遺伝子の発現系を構築したところ、ErtBが可溶性タンパク質として発現した。ErtBは新奇酵素チオールウロカニン酸ヒドラーゼであることを明らかにし、その諸性質を調べた。また、Burkholderia sp. HME13においてERTはグルタミン酸に代謝されたことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The novel genes encoding the enzymes (ertB, ertC, ertD) involved in degradation of ergothioneine (ERT) from Burkholderia sp. HME13 were found. The Escherichia coli expression systems of these genes were constructed and only ErtB was expressed as a soluble protein. The novel enzyme, ErtB showed thiolurocanate hydratase activity and the enzyme was characterized. It was showed that ERT was metabolized in glutamate in Burkholderia sp. HME13 cells.

研究分野：微生物学、酵素学

キーワード：エルゴチオネイン

1. 研究開始当初の背景

エルゴチオネイン (ERT、図1) はチオール基を持つヒスチジンペタイン類縁体であり、強い抗酸化力、キレート作用、紫外線や放射線に対する細胞保護作用を示すことが報告されている。¹⁾ERT は微生物から哺乳類まで様々な生物から検出されるが、自然界において ERT を生合成できる生物は一部の細菌、カビ、キノコ類に限られる、とされている。哺乳類は ERT を食物から摂取していると考えられており、肝臓、腎臓、心臓、皮膚、肺、脾臓、小腸、血液、赤血球、眼組織、精漿から ERT が検出される。2005 年にヒトの ERT 特異的トランスポーター (OCTN1) が発見されたことで、ERT は能動的に細胞や器官に取り込まれていることが明らかになった²⁾。また、OCTN1 は慢性関節リウマチやクローン病といった慢性炎症性疾患と関連があると考えられており、関節リウマチ患者の赤血球中 ERT 濃度は健康人よりも高く³⁾、クローン病患者の血中 ERT 濃度は健康人よりも低いことが報告されている。⁴⁾

一方、微生物における ERT 代謝に関する研究も活発に行われており、これまでにマイコバクテリアの ERT 生合成に関わる 5 種類の酵素遺伝子が同定されているが⁵⁾、ERT 生合成酵素の諸性質と立体構造は不明である。また、ERT 分解に関わるエルゴチオナーゼ (ERTase) が 1962 年に発見され⁶⁾、2013 年になってから、土壌から分離した ERT 資化性微生物である *Burkholderia* 属細菌を用いた研究で ERTase 遺伝子が同定され、さらに本酵素の諸性質が明らかにされた。⁷⁾これまでの研究で ERT は ERTase によってチオールウロカニン酸に変換されることが示されているが、その後、どのように代謝されるか、明らかになっていない。また、ERT は微生物によって生合成された後、食物連鎖を介して様々な生物から検出され、ヒトを対象とした前述の研究結果等から、ERT は生物全般にわたって何らかの重要な役割を担っていることが予想され、ERT の生理機能の全容解明が期待されている。

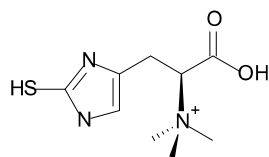


図1 エルゴチオネインの構造

2. 研究の目的

本研究は、微生物の ERT 代謝 (生合成、分解) に関わる酵素の諸性質と立体構造を明らかにするとともに、微生物における ERT の生理的役割について解析することを目的に開始した。しかし、国内外の研究動向や本研究課題の進捗状況から、特に *Burkholderia* 属

細菌の ERT 分解に関与する新奇酵素群の諸性質解明を中心に研究を行った。

3. 研究の方法

申請者が土壌から分離した ERT 資化性細菌 *Burkholderia* sp. HME13 が持つ ERT 分解経路に関わる酵素を研究対象とした。申請者は *Burkholderia* sp. HME13 から ERT 分解経路の最初の反応を触媒する酵素 ERTase を見出し、本酵素遺伝子を同定し、その酵素学的諸性質を明らかにした。本研究では ERTase 遺伝子の上流および下流の塩基配列を決定し、ERT 分解に関わる酵素遺伝子を探索した。*Burkholderia* 属のゲノム DNA を鋳型として、ERT 分解酵素遺伝子と推定される領域を含む DNA 断片を PCR で増幅し、遺伝子発現用ベクターに連結して大腸菌株を形質転換し、常法により導入遺伝子の発現を誘導した。大腸菌形質転換体の粗酵素液を調製し、カラムクロマトグラフィーにより目的酵素を精製した。精製酵素を用いて、基質特異性、熱や pH に対する反応の依存性や安定性、様々な添加物が酵素反応に及ぼす影響、ミカエリス定数などを明らかにした。

Mycobacterium smegmatis の ERT 生合成酵素のアミノ酸配列をもとにデータベース検索し、*Geodermatophilus obscurus* NBRC13315 ゲノムに、ERT 生合成に関与すると推定される 5 種類の酵素遺伝子を見出した。*G. obscurus* NBRC13315 のゲノム DNA を鋳型にして、PCR で目的の酵素遺伝子を含む DNA 断片を増幅して pET21(a) に連結し、大腸菌株を形質転換して常法により導入遺伝子の発現を誘導した。5 種類の酵素遺伝子のうち 1 種類のみ可溶性タンパク質として発現させることができたので、粗酵素液から Ni-NTA カラムで目的酵素を精製して機能解析した。

4. 研究成果

(1) *Burkholderia* sp. HME13 の ERT 分解に関わる酵素遺伝子の探索

Burkholderia sp. HME13 の ERTase 遺伝子 (*ertA*) の周辺約 10 kb の塩基配列を解析したところ、ERT 分解に関わると推定される 3 種類の新奇酵素遺伝子 (*ertB*, *ertC*, *ertD*) および ERT 輸送に関わると推定されるタンパク質遺伝子とオペロンを形成していると予想された。また、このオペロンの発現を制御すると推定され、LysR 型転写調節因子と相同性を示すタンパク質遺伝子 (*ertR*) も発見した。(図2)

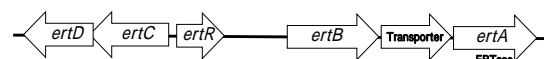


図2 ERTase 遺伝子 (*ertA*) 周辺の解析結果

(2) 新奇酵素チオールウロカニン酸ヒドラーゼの分子機能

ERT 分解に関わると推定される 3 種類の新

奇酵素のうちの ErtB は *Pseudomonas putida* 由来ウロカナーゼのアミノ酸配列と相同性を示したことから、チオールウロカニン酸に作用する酵素であると考えた。そこで、本酵素遺伝子を含む DNA 断片を PCR で増幅して pSE420U の *Nde* -*Hind* 部位に連結し、*Escherichia coli* JM109 を形質転換してアンピシリンを含む LB 培地で培養し、イソプロピルー-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) で導入遺伝子の発現を誘導した。培養菌体を 20% グリセロールと 50mM NaCl を含む 20mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) に懸濁し、氷上で超音波破碎して粗酵素液を調製し、トヨパール-DEAE 650M カラム、トヨパール-Butyl 650M カラム、トヨパール-AF-Blue 650M カラムに供したところ、目的酵素を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動的に均一に精製することができた。精製酵素はウロカニン酸には作用せず、チオールウロカニン酸に作用し、予測した通り ERT 分解経路の第 2 段階の反応を触媒する酵素であった。チオールウロカニン酸を含む溶液に精製酵素を加えて 30 で加温した後、反応生成物を LC/MS と NMR で分析したところ、3-(2-メルカプト-4-オキソ-4,5-ジヒドロ-1*H*-イミダゾール-5-イル)-5-プロピオン酸であることが明らかになったことから、本酵素はチオールウロカニン酸ヒドラーゼ活性を持つことがわかった。(図 3)

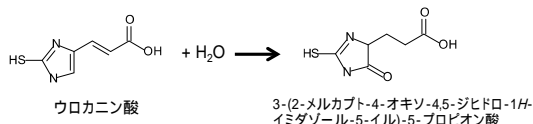


図 3 チオールウロカニン酸ヒドラーゼが触媒する反応

本酵素は 55、pH7.5 で最も高い活性を示し、50 以下、pH5.0~11.0 で安定であった。チオールウロカニン酸に対する K_m 値は 30 μ M、 V_{max} は 7.1 μ mol/min/mg であった。本酵素の反応は Cu^{2+} と Hg^{2+} に阻害された。

ERT を単一の窒素源とした培地で培養した *Burkholderia* sp. HME13 の粗酵素液中には ERTase 活性、チオールウロカニン酸ヒドラーゼ活性が検出されたが、LB 培地で培養するとこれらの酵素活性は検出されなかった。

(3) *Burkholderia* sp. HME13 の ERT 分解経路の推定と関連酵素

ERT を含む培地で培養した *Burkholderia* sp. HME13 を 1mM フッ化フェニルメチルスルホニル、20% グリセロール、50m NaCl を含む 20mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) に懸濁して、氷上で超音波破碎して粗酵素液を調製した。10mM チオールウロカニン酸を含む 20mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) に粗

酵素液を加えて 30 で 15 分間反応させ、HPLC で反応液を分析したところ、グルタミン酸のピークを確認したことから、*Burkholderia* sp. HME13 において ERT はチオールウロカニン酸を経て、グルタミン酸に代謝されることがわかった。

ERT 分解に関与すると推定される、残りの 2 種類の酵素遺伝子を PCR で増幅して pET21a(+) に連結し、*E. coli* BL21(DE3) を形質転換した。LB 培地で形質転換体を培養し、IPTG で目的タンパク質の発現を誘導したが可溶性画分には発現しなかったため、遺伝子産物の機能の同定にはいたらなかった。今後、宿主ベクター系を変えて目的タンパク質の取得を試みる必要があると考えている。

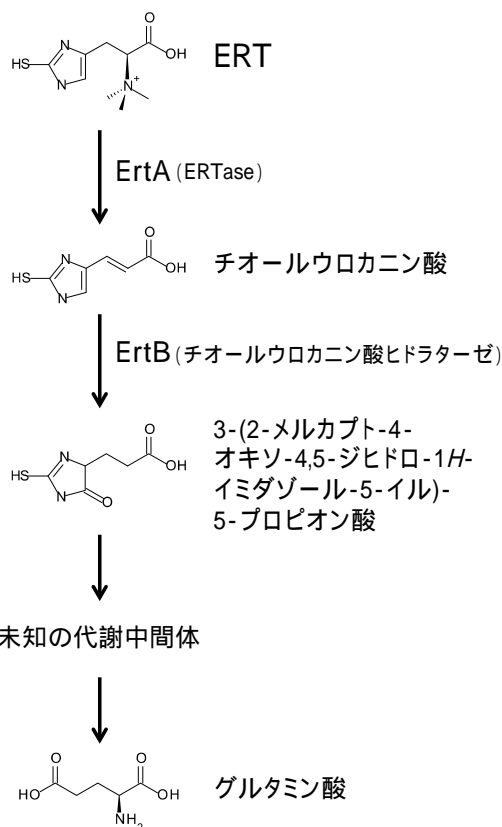


図 4 本研究で明らかにした *Burkholderia* sp. HME13 の ERT 代謝経路

(4) *G. obscurus* NBRC13315 の ERT 生合成酵素遺伝子発現系と機能解析

G. obscurus NBRC13315 において ERT 生合成に関与すると予想された 5 種類の遺伝子のうち、*M. smegmatis* の EgtD と相同性を示すタンパク質のみ可溶性画分に発現させることができたので、この EgtD ホモログを Ni-NTA カラムで精製した。0.5mM *S*-アデノシル-L-メチオニン (SAM) と 0.5mM ヒスチジンを含む 10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) に精製酵素を加えて、30 で 2 時間反応させ、HPLC で反応液を分析したところ、SAM のピークが減少し、*S*-アデノシル-L-ホモシステイン

(SAH)のピークが現れた。また、ヒスチジンを含まない反応液に精製酵素を加えて、同様にインキュベートしてもSAHのピークは観察されなかったことから、*G. obscurus* NBRC13315のEgtDホモログはSAMのメチル基をL-ヒスチジンのアミノ基に転移する反応を触媒する酵素と考えられた。

引用文献

- 1) Paul BD *et al.*, *Cell Death and Differentiation*, 17 巻, p. 1134-1140, 2009.
- 2) Gründemann D *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 102 巻, p. 5256-5261, 2005.
- 3) Taubert D *et al.*, *J. Rheumatol.*, 33 巻, p.2139-2145, 2006.
- 4) Kato Y *et al.*, *Pharm. Res.*, 27 巻, p.832-840, 2010.
- 5) Seebeck F. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 132 巻, p. 6632-6633, 2010.
- 6) Wolff J. B., *J. Biol. Chem.*, 237 巻, p.874-881, 1962.
- 7) Muramatsu *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97 巻, p.5389-5400, 2013.

5. 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

村松久司、宮奥晴菜、栗田周哉、松尾英典、加藤伸一郎、山本浩明、永田信治
Burkholderia sp. HME13 由来チオールウロカニン酸代謝酵素の遺伝子クローニングと精製
日本生化学会(一般講演)2013年9月13日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

宮奥晴菜、村松久司、柏木丈弘、加藤伸一郎、山本浩明、永田信治
Burkholderia sp. HME13 に由来するチオールウロカニン酸ヒドラターゼの性質
日本生化学会(一般講演)2014年10月15日-18日、京都国際会館(京都府京都市)

村松久司、宮奥晴菜、栗田周哉、松尾英典、柏木丈弘、加藤伸一郎、金哲史、永田信治
Burkholderia sp. HME13 由来チオールウロカニン酸ヒドラターゼの諸性質と
Burkholderia sp. HME13 のエルゴチオネイン代謝経路の予想
第57回日本生化学会 中国・四国支部例会、2016年5月27、28日、高知大学(高知県南国市)

招待講演

村松久司

Burkholderia 属細菌のエルゴチオネイン代謝関連酵素を用いたエルゴチオネインの定量

日本農芸化学会中四国支部 第23回若手シンポジウム

(第8回農芸化学の未来開拓セミナー)

2016年5月20、21日、岡山大学(岡山県岡山市)

6. 研究組織

(1)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