

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15803

研究課題名(和文)イオウ依存型エネルギー代謝機構の解明：発酵科学・医学生物学のニューパラダイム

研究課題名(英文)Analysis of sulfur-dependent energy metabolism in yeast

研究代表者

西村 明(Nishimura, Akira)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：30781728

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)：本研究では、活性イオウ分子を発酵生産に応用するために、これまで未解明であった出芽酵母における活性イオウ分子の生成経路の同定および、その経路を破壊した変異体の表現型の探索を行った。まず、出芽酵母における活性イオウ分子の産生系が哺乳類や細菌類と同様であり、cysteinyI-tRNA synthetase(CARS)によって産生させることを見いだした。さらに、この経路の欠損株は寿命が大幅に短縮することを発見し、活性イオウ分子が寿命の新規制御因子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、発酵科学へ応用のみならず、エネルギー代謝異常に関わる各種疾患(加齢、ミトコンドリア病、生活習慣病、がん等)の発症機構の理解と予防・治療法の開発に大きく寄与することが期待される。また、活性イオウ分子の産生系をターゲットにした抗真菌薬の開発も抗菌・真菌薬開発も期待される。

研究成果の概要(英文)：we attempted to understand physiological functions of reactive sulfur species (RSS) using yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a useful model for eukaryotic biology. First, we found that yeast has a pyridoxal phosphate (PLP)-dependent biosynthesis of RSS by cysteinyI-tRNA synthetase (CARS), similar to bacteria and mammal. Next, our study indicated that a yeast mutant of PLP-binding site, which possessed the intact protein synthesis, dramatically reduces chronological aging, compared with wild-type, suggesting that CARS-produced RSS may play an important role in regulating longevity and sustaining the life span.

研究分野：発酵科学

キーワード：活性イオウ エネルギー代謝 イオウ呼吸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

発酵生産は生育に必要なエネルギーを目的の有用物質の代謝に活用するため、目的物質の生産性が増加するに伴い、生育遅延がしばしば起こる。従って、目的物質の生産性の向上は、細胞の生育と生産性のバランスを上手く維持しながら、これまで進められてきた。しかし、細胞が有するエネルギーの総量が決まっているため、従来の代謝工学を活用した方法には限界がきている。

最近、研究代表者は、活性イオウ分子：システインパースルフィド (CysSSH) がシステイニル tRNA 合成酵素 (cysteinyI-tRNA synthetase; CARS) によって生合成されることを報告した (cysteine persulfide synthase:CPERS と命名)。さらに、哺乳類において、新規なエネルギー代謝である「イオウ呼吸」の存在を発見した。イオウ呼吸は電子伝達系において、イオウ代謝物 (CysSSH) が酸素の代わりに働き、さらに副次的に生成する硫化水素が sulfide-quinone reductase (SQR) を介して NADH の代わりに膜電位形成に寄与する新規なエネルギー代謝である。すなわち、イオウ呼吸は NADH と酸素に依存した従来のエネルギー代謝と完全に独立しているエネルギー産生経路である。

2. 研究の目的

本研究では、酵母におけるイオウ呼吸の解析を通して、「イオウ呼吸エネルギー代謝理論」を確立・応用することで、生育と生産性を共に増強させる育種方法を構築し、発酵生産を飛躍的に改良する手段を提唱する。

3. 研究の方法

(1) 菌株

本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の BY4743 株 (二倍体) と BY4742 株 (一倍体) を親株 (それぞれ、WT/WT と WT) として用いた。酵母の CPERS ホモログである *Crs1* の K109A 変異体発現株 (K109A) は CRISPR/Cas9 システムを利用して、BY4742 から構築した。また、*CRS1* のヘテロ破壊株 ($\Delta crs1$ /WT) は BY4743 の *CRS1* を G418 耐性カセットと相同組換えによって置換することで構築した。

(2) *Crs1* の大腸菌発現

酵母に存在するオリジナルの DNA 配列をもつ *CRS1* は大腸菌内で複製できないため、コドンで大腸菌に合わせた *CRS1* DNA を化学合成した。この *CRS1* の DNA 配列を pET53 に導入し、pET53-CRS1 を作製した。pET53-CRS1 を導入した大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3) の形質転換体を M9+CA 液体培地に植菌し、37°C で OD₆₀₀=0.4-0.8 になるまで培養を行った。培養液を 18°C まで冷却した後、Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 0.2 mM で添加し、18°C でタンパク質発現誘導を行った。20 時間後に集菌し、培養液 50 mL 分の菌体を Buffer A (100 mM 4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazineethanesulfonic acid [HEPES]-KOH [pH 7.5], 300 mM KCl) 7 mL に再懸濁し、超音波破碎機 (SONIFIER450, BRANSON 社製) を用いて細胞破碎を行った。破碎液を遠心した後、上清を φ0.45 μm のフィルターで濾過し、粗酵素液とした。粗酵素液を Buffer A で平衡化したニッケルカラム (Ni Sepharose 6 Fast Flow, GE Healthcare 社) (カラム体積: 400 μL) に通して、His-tag 付き Lys20 を吸着させた後、80 mM imidazole を含む Buffer A 2 mL で洗浄した。500 mM imidazole および 10 %グリセロール を含む Buffer A 1 mL で溶出し、精製サンプルとした。

タンパク質濃度をブラッドフォード法で測定した後、精製度合いを SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)によって確認した。

(3) CysSSH の定量

CysSSH の定量は LC-ESI-MS/MS を使用して行った。LC-ESI-MS/MS は LCYMC triart C18 カラム (50 mm × 2.0 mm, YMC, Kyoto, Japan) を装備した Nexera UHPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) に 0.1% ギ酸 (溶媒 A) と 0.1% ギ酸を含むメタノール (溶媒 B) を移動相に用いて、流速 0.2 ml/min、15 分間で移動相 B の濃度が 5%から 90%になるように設定した。質量分析装置には、LCMS-8060 (Shimadzu) を用いて、ESI probe、desolvation line、heat block の温度をそれぞれ 300°C、250°C、400°Cに設定した。また、Nebulizer ガス、heating ガス、drying 窒素ガスは、それぞれ 3、10、10 liter/min に設定した。定量解析は、安定同位体希釈法を用いて濃度既知の安定同位体標識標準標品のピークエリア面積との割合より算出した。測定化合物の MRM パラメーターは表 2 に記した。

(4) ミトコンドリア膜電位の測定

ミトコンドリア膜電位は JC1 (Molecular Probes) を用いて行った。各酵母株を YPD 培地で培養し、酵母細胞を回収した。PBS で洗浄後に、細胞数を 1×10^6 /mL に合わせ、その懸濁液に JC1 を 5 μ M になるように添加した。室温で 30 分間処理した後、PBS で洗浄し、解析用サンプルとした。サンプルはフローサイトメトリーで解析し、FL2/FL1 をミトコンドリア膜電位の指標とした。

(5) ATP の定量

細胞内 ATP 含量はルシフェラーゼ法を利用して定量した。各菌株を PBS で洗浄した後、精製水で懸濁した。100°Cで 10 分間ヒートショックを行い、上清に ATP を抽出した。上清を ATP 測定キット (Toyo B-net) によって測定した。

(6) 経時寿命の解析

SC 培地で培養した各菌株を再度 SC 培地に OD=0.1 で植菌した。3 日間 30°Cで培養した時点を day0 として、経時寿命の解析を開始した。各時間の菌液を回収し、コロニー形成能から生存率を算出した。なお、day0 の生存率を 100%とした。

4. 研究成果

(1) 酵母における CysSSH 産生経路

先ず、酵母 CARS/CPERS である *Crs1* の CysSSH 合成活性を検討した結果、組換え *Crs1* は他の生物と同様に CysSSH 合成活性を有していることがわかった。さらに、CARS/CPERS ヘテロ破壊株 (二倍体) を構築し、この株の細胞内 CysSSH を LC-MS/MS により定量した結果、野生株に比べて CysSSH 量が約半分に減少することを確認した。以上より、出芽酵母にも CARS/CPERS による CysSSH 合成経路が保存されていることが明らかとなった。

(2) CysSSH 合成欠損株の構築

CRSI 遺伝子は細胞のタンパク質翻訳機構にも重要であるため必須遺伝子であり、単純な遺伝子破壊株ができない。これまでの研究で、CPERS 活性にはピリドキサルリン酸 (PLP)

が補酵素として必須であり、PLP 結合部位は大腸菌 CPERS の解析からすでに判明している。様々な CPERS のアミノ酸配列を比較した結果、PLP 結合部位は高度に保存されていることがわかった。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いて、酵母ゲノム中の *CRS1* にアミノ酸置換を伴う変異 (PLP 結合部位のリジンアラニンに置換) を導入した株 (K109A 変異体) を構築した。まず、この変異体と野生株の細胞内タンパク質の存在量を検討したところ、両者のタンパク質発現量に有意な差は認められず、構築した変異体の翻訳活性は正常であることが強く示唆された。次に、細胞内 CysSSH 含量を測定した結果、変異体は野生株より CysSSH 含量が劇的に低下していることがわかった。以上より、K109A 変異体は CysSSH 合成欠損株であり、CysSSH 研究の良いモデル系であることが示唆された。

(3) K109A 変異体のミトコンドリア機能

これまでに、酵母のイオウ呼吸については全く解析が行われていない。そこで、酵母のイオウ呼吸の存在を検討するために、K109A 変異体のミトコンドリアのエネルギー代謝の解析を行った。まず、JC1 を用いて、定常期の細胞のミトコンドリアの膜電位を測定した結果、K109A 変異体は野生株に比べて、顕著に膜電位が低下していることが判明した。さらに、細胞全体の ATP 含量を測定した結果、対数増殖期における野生株と K109A 変異体でその含量に差が認められなかった。一方、定常期の細胞においては、野生株より K109A 変異体の ATP 含量が低いことが判明した。酵母は、対数増殖期において主に解糖系のエネルギー代謝を、定常期において主にミトコンドリアのエネルギー代謝を利用することが知られている。このため、酵母のイオウ呼吸は主に定常期に働くことが予想された。

(4) CysSSH による寿命制御

CysSSH の生理機能はほとんどわかっていない。そこで、K109A 変異体の表現型解析を様々な角度から検討したところ、K109A 変異体は若干の酸化ストレス感受性を示すことや、定常期における生存率が低いことがわかった。そこで、CysSSH が経時寿命に影響を与えている可能性を考え、K109A 変異体の寿命を測定した。その結果、K109A 変異体は野生株に比べて、顕著に経時寿命が低下していることが判明した。また、低下した寿命は野生型の *CRS1* を導入することで回復することもわかった。さらに、活性イオウのドナーである Na_2S_2 を添加することで、濃度幅は狭いものの野生株の寿命まで回復することが判明した。これらの結果から、CARS/CPERS によって産生される CysSSH は内因性の寿命制御因子であることが考えられた。

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Doka E., Ida T., Dagnell M., Abiko Y., Luong N. C., Balog N., Takata T., Espinosa B., Nishimura A., Cheng Q., Funato Y., Miki H., Fukuto J. M., Prigge J. R., Schmidt E. E., Arnr E. S. J., Kumagai Y., Akaike T., Nagy P.	4. 巻 6
2. 論文標題 Control of protein function through oxidation and reduction of persulfidated states	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 8358-8358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aax8358	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 該当する

1. 著者名 Nishimura Akira, Nasuno Ryo, Yoshikawa Yuki, Jung Minkyung, Ida Tomoaki, Matsunaga Tetsuro, Morita Masanobu, Takagi Hiroshi, Motohashi Hozumi, Akaike Takaaki	4. 巻 294
2. 論文標題 Mitochondrial cysteinyl-tRNA synthetase is expressed via alternative transcriptional initiation regulated by energy metabolism in yeast cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13781-13788
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.009203	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akira Nishimura, Tomoaki Ida, Masanobu Morita, Tetsuro Matsunaga, Hiroshi Takagi, Hozumi Motohashi, Takaaki Akaike
2. 発表標題 Biosynthesis and physiological functions of reactive cysteine persulfides
3. 学会等名 SFRR Asia（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村 明、井田 智章、守田 匡伸、松永 哲郎、高木 博史、本橋 ほづみ、赤池 孝章
2. 発表標題 活性パースルフィドの種横断的な生理機能の解明
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019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
---------	---------