

機関番号：14603

研究種目：若手研究 B

研究期間：2009～2010

課題番号：21780073

研究課題名 (和文) 大腸菌のジスルフィド結合形成酵素 DsbA の新たな還元ストレス除去機能とその応用

研究課題名 (英文) A novel reduction-stress elimination system by the *Escherichia coli* DsbA and its application to L-cysteine production

研究代表者

大津 巖生 (OHTSU IWA0)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：60395655

研究成果の概要 (和文) : 大腸菌のペリプラズム空間には、ジスルフィド結合形成酵素として DsbA が存在し、基質を酸化して還元型となった DsbA のシステイン (Cys) ペアが内膜タンパク質 DsbB により再酸化される。また、DsbB が受け取った電子は呼吸鎖成分のユビキノン (UQ) に渡され、最終的にはチトクロム酸化酵素を介して酸素が電子受容体となる (DsbA-DsbB-UQ 複合体)。我々は還元ストレス (Cys) に曝すと本来酸化型で存在する DsbA が還元型で蓄積することを明らかにした。さらに DsbA の基質であり、大腸菌の生育に必須な外膜タンパク質 Osta もまた、還元型で蓄積することが判明した。以上の結果から、過剰な Cys が DsbA-DsbB-ユビキノン酸化システムを還元し、ジスルフィド結合不形成タンパク質が蓄積することによって、大腸菌の生育が阻害されると結論づけた。このことは本来、大腸菌が毒性の高い Cys を解毒する機構を備えているとも考えられる。大腸菌の酸化システムに類似した仕組みは、酵母、植物、動物などの真核細胞の小胞体やミトコンドリアにも広く存在する。このことは生物種を超えた Cys の毒性と一致する。

研究成果の概要 (英文) : DsbA oxidizes peptidyl L-cysteine residue into disulfide bridge in the periplasm, and the reduced form of DsbA is re-oxidized by inner membrane protein DsbB. Electron, which is received from ubiquinone, is given to DsbA. Finally, oxygen is an electron acceptor through the terminal oxidase of the respiratory chain (DsbA-DsbB-UQ complex). We find that DsbA, which is normally the oxidized form, is shifted in the reduced form of DsbA in the addition of excess Cys. Furthermore, Osta protein, which is one of the DsbA substrates and is an essential protein for *Escherichia coli* growth, is also accumulated as reduced form into the periplasm. We suggested that the DsbA-DsbB-ubiquinone oxidation system might eliminate reductive stress by oxidizing exogenous reductants and also play an important role in redox homeostasis in the cytoplasm. A similar mechanism to DsbA-DsbB-ubiquinone oxidation system of *E. coli* exists widely also in endoplasmic reticulum of yeast, the plant, and the animal, etc. and mitochondria. This is corresponding to the toxicity of Cys that exceeds the living thing kind.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2010年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：発酵生産

1. 研究開始当初の背景

本研究課題の準備状況として、代謝工学的手法を用いて大腸菌のCys代謝調節機構（生合成・排出）を解析し、以下のような新しい知見を得ている。

1) CysによるSS結合形成への障害が、生育障害の原因であると独自の仮説を立てた。すでに、還元ストレス処理後、還元型DsbAおよび、DsbA-DsbB複合体が過剰に蓄積していることを見出している（図③）。

2) 本研究課題は生体膜における還元ストレスからの防御機構の解明であるが、これまでに細胞内での還元ストレスによる生育障害の回避機構については、Cys排出トランスポーターYdeDの過剰発現株により、ペリプラズムにCysが排出される（図①）。排出されたCysにより、還元型DsbAの蓄積を確認している（図③）。細胞質内のCysがYdeDにより、ペリプラズムに排出され、還元型DsbAが蓄積する一方、CysがCys-Cysへ酸化され、細胞質内に再取り込みされることが強く示唆された（*FEMS Microbiol. Lett.*, in press）。

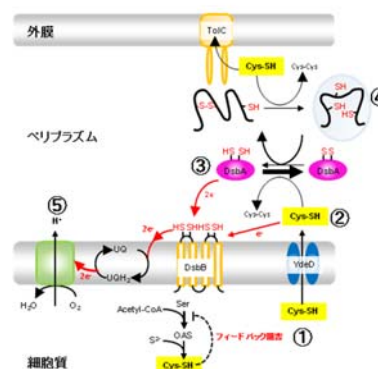
申請者は、大腸菌をモデルに生理的に重要なCysの代謝調節機構を理解し、グルコースからの直接発酵法の確立をめざしている。これまでに、大腸菌を材料に以下の成果を得た。

- 1) 大腸菌の非必須遺伝子欠損株ライブラリー (Keio collection) の中から、Cys耐性に関与する外膜タンパク質 TolC を新規なCysトランスポーターとして同定し、Cys生産性への有用性を実証した（特願 2008-40167）。
- 2) 1) のスクリーニングよりSS結合形成酵素DsbAがCys耐性に関与することを明らかにした（*Appl. Microbiol. Biotech.*, in press）。
- 3) 還元ストレス（Cys）に曝し生育障害が起きているとき、未処理では全く蓄積しない還元型DsbAとDsbA-DsbB

複合体がともに蓄積することが判明した（未発表）。

以上の結果から、これまでにCysトランスポーターを高発現させ、細胞内Cysを積極的に排出させることにより、生育障害の緩和と

還元ストレス除去機構と生育阻害



Cys生産性の向上に成功している。しかしながら、細胞質からペリプラズムに排出されたCysをDsbA-DsbB-ユビキノン酸化システムにより、シスチン（Cys-Cys）に酸化し還元ストレスを除去することが判明した。その後Cys-Cysは再び細胞内に取り込まれる機構が存在する可能性を見出している。本研究では、還元ストレスにより、還元型DsbAが蓄積し、その基質タンパク質の酸化還元状態を詳細に解析するとともに、還元型DsbAの蓄積によるエネルギー生産への影響についても調べる。一方、酸化されたCys-Cysの細胞内への再取り込みについても調べ、ペリプラズムから培地へのCys/Cys-Cysの効率良い排出をめざす。

2. 研究の目的

◆生体膜を還元ストレスから防御するジスルフィド結合形成酵素(DsbA)の機能解析とその応用

これまでに細菌、カビなどで、Cysにより、その生育が阻害されることが知られている。

しかしながら、その理由は全く分かっていない。一方で、ペリプラズムにはジスルフィド (SS) 結合導入酵素としてDsbAが存在し、基質を酸化し還元型となったDsbAのシステインペアは、内膜タンパク質DsbBにより再酸化される。DsbBが受け取った電子は呼吸鎖成分であるユビキノン (UQ) に受け渡され、最終的にはチトクロム酸化酵素を介して酸素が電子受容体となることが知られている。応募者はDsbAがCys耐性に関与すること (*Appl. Microbiol. Biotech.* in press)、さらに還元ストレス (Cys, DTTなど) により還元型DsbAがペリプラズムに蓄積することを見出している。このDsbA-DsbB-ユビキノン酸化システムの還元ストレスに対する防御機構としての役割を解明するとともにCys発酵生産への応用を目的とする。

2. 研究の方法

【平成 21 年度の研究計画】

現在までに培地にCysを添加し、還元ストレスに曝すと還元型DsbAおよび、DsbA-DsbB複合体の蓄積が観られることを見出した(図③)。今後、DsbAのターゲット基質であるタンパク質の酸化還元状態についても調べる(図④)。具体的には、平成 20 年度 9 月より本学バイオサイエンス研究科の門倉 広 (国際リサーチフェロー) の開発したリソースの一つであるプラスミドライブラリー (DsbAの基質タンパク質をMycタグと融合したプラスミドライブラリー; AmpC, DsbB, LivK, OstA, RcsF) を活用して、Myc抗体を用いたウエスタン解析により、その酸化還元状態を明らかにすることで、Cysによる生育阻害機構を実証する。

次に、還元型となったDsbAは膜酵素DsbBにより速やかに再酸化され、DsbBは呼吸鎖複合体の成分であるユビキノンに蓄えられた酸化力を利用して自らのSS結合を創生するので、プロトン勾配によるエネルギー (ATP) 獲得への効果についても調べる(図⑤)。具体的には、野生株とYdeD過剰発現株を用いて、培地へのCys添加有無によるATP生産量をルシフェラーゼアッセイにより測定する。また、得られたエネルギーの利用とCysトランスポーターYdeDの駆動力との関係も明らかにする。

最後に、酸化されて生じるCys-Cysのペリプラズムでの蓄積を明らかにするために、最初にペリプラズム中のCys-Cysを測定する系を確立する。具体的には、培養液に直接TCAを加えて、細胞の全タンパク質を変性・沈殿させ、還元 (DTT) 処理後、SH修飾試薬でラベルし、アミノ酸アナライザーに

より、ラベル化されたCysを定量できる系を確立する。

【平成 22 年度の研究計画】

還元ストレスにより蓄積したCys-Cysの細胞内再取り込みについて解析を行う。Cys-CysトランスポーターFliYの欠損株を用いて、平成 21 年度に確立した測定法により、ペリプラズム中のCys-Cysの蓄積を明らかにする。

次に、Cys発酵生産への有用性の実証

これまでに構築したCys発酵生産菌(生合成系の強化: フィードバック阻害非感受性型変異型セリンアセチルトランスフェラーゼの過剰発現と排出系の強化: CysトランスポーターYdeD過剰発現を有する)に、課題 1)、2) の知見を活用し、DsbB欠損を組み合わせることで、CysのDsbAによるCys-Cysへの酸化を防ぎ、生産性への有用性を実証する。また、空気酸化等によるCys-Cysの蓄積も考えられるので、取り込み系の破壊 (FliY) も併用する。

4. 研究成果

Cysは、大腸菌を含む微生物から哺乳類まで幅広く細胞毒性を示すことが知られているが、その分子機構はほとんど不明である。ラットを用いたLD₅₀ 値 (g/kg体重) は、ほとんどのアミノ酸が 16.0 以上で安全性が高いのに対し、Cysは食塩、酢と同等の低い値 (3.1) であり、毒性が高いことが報告されている。我々は、大腸菌の非必須遺伝子欠損株ライブラリー (奈良先端大・森研究室で作製) を用いてCys感受性を示す菌株を選抜し、ペリプラズムに存在するSS結合形成酵素DsbAがCys添加時の生育に関与することを明らかにした。本研究では、培地に添加したCysがDsbAとその基質の酸化還元状態に及ぼす影響を解析し、Cysによる大腸菌の生育阻害機構について考察した。

大腸菌の非必須遺伝子欠損株ライブラリー (Keio collection: 3,985 株) を用いて、Cys感受性を示す菌株をスクリーニングし、DsbAがCys耐性に関与することを見出した。また、本来酸化型であるDsbAがCysにより還元され、還元型DsbAとして蓄積するために、基質タンパク質 (OstA, PhoA) へのSS結合が正しく導入されず、立体障害が引き起こされると考えられた。さらに、ペリプラズムに局在するプロテアーゼDegPもCys耐性に関与していた。以上の結果から、過剰なCysによりDsbAが還元型にシフトすると、SS結合不形成タンパク質がペリプラズムに蓄積し、大腸菌の生育が阻害されるものと結論づけた。また、それら異常タンパク質の分解にはDegPタンパク質が関与する可能性

が示された。このことは本来、大腸菌は毒性の高いCysを解毒する機構を備えているとも考えられる。大腸菌の酸化システムに類似した仕組みは、酵母、植物、動物などの真核細胞の小胞体やミトコンドリアにも広く存在するため、各オルガネラと細胞質とのレドックス制御にCys排出トランスポーターが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

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 3件)

1. 大津 厳生, 高木博史: システイン/シスチンのシャトルシステムによる新しい酸化ストレス防御機構, 化学と生物, 49, 81-83, (2011).
2. Iwao Ohtsu*, Natthawut Wiriyathanawudhiwong, Susumu Morigasaki, Takeshi Nakatani, Hiroshi Kadokura, and Hiroshi Takagi: The L-cysteine/L-cystine shuttle system provides reducing equivalents to the periplasm in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **285**, 17479-17487 (2010).
3. Natthawut Wiriyathanawudhiwong*, Iwao Ohtsu*, Zhao-Di Li, Hirotsada Mori, and Hiroshi Takagi: The outer membrane TolC is involved in cysteine tolerance and overproduction in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotech.*, **81**, 903-913 (2009).

[学会発表] (計 7件)

◆学会発表 (ワークショップ)

1. 大津 厳生, Natthawut Wiriyathanawudhiwong, 高木博史: 大腸菌ペリプラズム内におけるシステインの生理的役割. 第10回日本蛋白質科学会年会, 「レドックスバイオロジーの最前線ー蛋白質科学と細胞生物学の接点ー」2010年6月16日, 札幌市.

◆学会発表

1. 佐々木翠, 大津 厳生, 高木博史: システインによる大腸菌の生育阻害機構の解析. 日本農芸化学会2011年度大会, 2011年3月28日の予定が地震の影響で中止となり、要旨公開で発表成立, 京都市.
2. 佐々木 翠, Natthawut Wiriyathanawudhiwong, 大津 厳生, 高木博史: システインによる大腸菌の生育阻害機構の解析. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会,

2010年12月9日, 神戸市.

3. 鈴木茉莉奈, Natthawut

Wiriyathanawudhiwong, 大津 厳生, 高木博史: システイン/シスチンのシャトルシステムによるユニークな酸化ストレス防御機構. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月9日, 神戸市.

4. 佐々木 翠, Natthawut

Wiriyathanawudhiwong, 大津 厳生, 高木博史: システインによる大腸菌の生育阻害機構の解析. 日本農芸化学会関西支部例会 (第467回講演会), 2010年12月4日, 神戸市.

5. 大津 厳生, Natthawut

Wiriyathanawudhiwong, 鈴木 茉莉奈, 高木博史: 大腸菌のペリプラズムにおける過酸化水素の消去機構. 第4回ゲノム微生物学会若手の会, 2010年10月1日, 神戸市.

6. 大津 厳生, Natthawut

Wiriyathanawudhiwong, 高木博史: 大腸菌ペリプラズム内におけるシステインの生理的役割. 第57回日本生化学会近畿支部例会, 2010年5月22日, 生駒市.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称: L-システイン生産菌及びL-システインの製造法

発明者: 大津 厳生, 高木 博史, 野中源

権利者: 味の素株式会社

種類、番号: 国際公開 WO 2009/104731 A1

出願年月日: 2009年8月27日

国内外の別: 海外

[その他]

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/takagi/takagi-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大津 厳生 (OHTSU IWAO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ

エンス研究科・助教

研究者番号: 6039565

(2) 連携研究者

森 浩禎 (MORI HIROTADA)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ

エンス研究科・教授

研究者番号: 90182203