

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究 B

研究期間：2011～2012

課題番号：23780081

研究課題名（和文）細胞膜リン脂質の品質管理に働くシステイン/シスチンのシャトルシステム

研究課題名（英文）A novel oxidative stress defense mechanism of *Escherichia coli* by cysteine/cystine shuttle system play a important role in quality control of membrane phospholipids.

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）：本研究では Cys/CySS シャトルシステムがカタラーゼが存在しないペリプラズム内で生じる過酸化水素の除去に重要な役割を果たすことを明らかにした。なぜペリプラズム中の過酸化水素を消去しなければならないのか、Cys/CySS シャトルシステムの生理機能について解析した。ペリプラズムに蓄積した過酸化水素による細胞膜脂質の酸化が原因である可能性が考えられ、過酸化脂質を定量したところ *ydeD/fliY* の二重破壊株は野生株と比べて過酸化脂質が有意に増加していることを見出した。さらにこの過酸化脂質を分解するペルオキシダーゼ BtuE の発現が過酸化水素によって誘導されることも判明した。

研究成果の概要（英文）： The inducible L-cysteine/L-cystine shuttle system plays an important role on quality control of lipids under oxidative stress. Thiobarbituric acid responsive substances (TBARS) are routinely used to assess oxidative stress damage to membrane lipids in diverse organisms. TBAR content increased ~2-fold when *E. coli* was exposed to H₂O₂, respectively. Even in the absence of toxicant, *E. coli* $\Delta ydeD/fliY$ showed increased (~2-fold) levels of these substances relative to wild-type controls, suggesting that L-cysteine/L-cystine shuttle system may function in controlling the level of membrane peroxidation products that are generated during the normal, basal metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000 円	4,420,000 円

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：応用微生物

キーワード：システイン、ペリプラズム、大腸菌、過酸化脂質、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

システインは大腸菌の細胞内でほとんど検出されないが、ペリプラズムにシステインを輸送するトランスポーターが複数存在しており、その生理的役割に興味を持たれていた。申請者は、トランスポーターの一つ YdeD を欠損した大腸菌は過酸化水素に弱くなると同時に、YdeD を細胞膜に過剰発現させると過酸化水素に耐性を示すことを見出した。また、システインはペリプラズムで過酸化水素を水に還元し、その際自身はシスチンに酸化された後、別のタンパク質 FliY 依存的に細胞質に再び取り込まれること、および FliY を壊した大腸菌も過酸化水素に弱くなることを見出した。

以上の結果は、システインとシスチンが YdeD と FliY の働きによって細胞質とペリプラズムを循環しながら過酸化水素を水へと変換することを示しており、ユニークな酸化ストレス防御メカニズムとして「システイン/シスチンのシャトルシステム」を提唱した (図 1)。また、大腸菌の細胞分裂についても興味深い現象を見出した。細胞質で過酸化水素を除去できない Hpx 変異株 (カタラーゼ、ペルオキシダーゼの機能欠損株) は低濃度 (25-100 \cdot M) の過酸化水素に弱くなっていたが、細胞は分裂が完了せず、伸長したままの状態に死滅することがわかった (図 2 : 緑枠)。しかしながら、この変異株に YdeD を過剰に発現させると細胞形態の異常は見られず、正常に生育できるようになった (図 2 : 赤枠)。

本研究課題では、ペリプラズムに過酸化水素が存在すると、なぜ大腸菌は細胞分裂に障害を来すのか、そのメカニズムを明らかにすることを旨とする。

2. 研究の目的

申請者は、大腸菌におけるシステインの生理機能を研究する過程で、遊離のシステインが細胞表層 (ペリプラズム空間) で存在する有害な過酸化水素を除去し、細胞を酸化ストレスから防御するユニークな機構を明らかにした (*J. Biol. Chem.*, **285**, 17479, 2010)。本研究課題では、1) ペリプラズムに生じた過酸化水素の検出、2) 生じた過酸化水素によるリン脂質の酸化、3) リン脂質の酸化と細胞分裂障害との関連性を評

価する。以上のことから、ペリプラズム空間で発生する過酸化水素の除去に重要な役割を果たしているシステインの生理的役割について明らかにすることを旨とする。

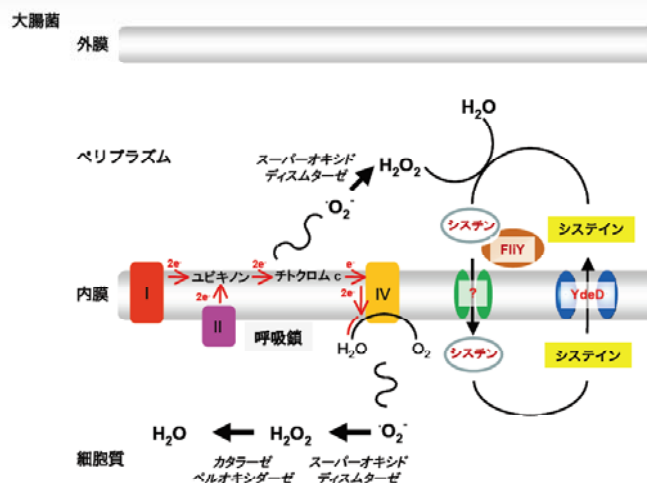


図 1 : システイン/シスチンのシャトルシステムによる酸化ストレス耐性機

3. 研究の方法

【平成 23 年度の研究計画】

1) ペリプラズムに蓄積する過酸化水素の検出 : Hpx 変異株 (カタラーゼ、ペルオキシダーゼの機能欠損株) は、1 \cdot M 程度の過酸化水素を細胞質に蓄積することがすでに明らかにされています。過酸化水素は、

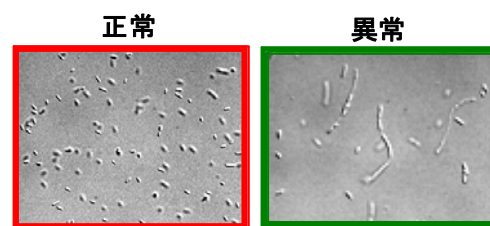


図 2 : Hpx 変異株の過酸化水素感受性を YdeD

の過剰発現により機能相補

細胞膜を自由に通り抜けることができるので、ペリプラズムにも 1 \cdot M 程度の過酸化水素が蓄積していると考えられます。この Hpx 変異株と比較して、さらに過酸化水素除去に働くシステイントランスポーター YdeD を欠損させた変異株では、ペリプラズムに過酸化水素が蓄積すると予想されます。申請者は内膜を通過できない過酸化水素特異的検出試薬 (非細胞膜透過性 BES) を用いることで、大腸菌のペリプラズムに生じ

ている過酸化水素の検出を蛍光顕微鏡観察により明らかにする。

a) Hpx・ydeD/・fliY株の構築：研究協力者(森浩禎)の開発したKeio collectionから・ydeD::Km領域をP1ファージを用いて、Hpx株に形質導入する。その後、Km耐性遺伝子を切り出し、再び・fliY::Km領域をHpx・ydeD株に形質導入する。

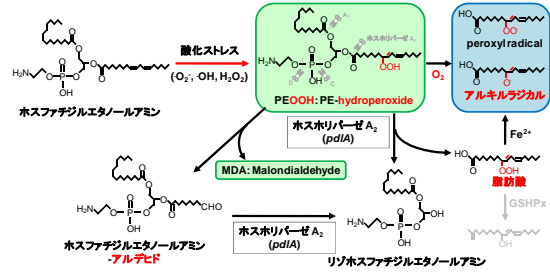
b) ペリプラズムに蓄積した過酸化水素の検出：Hpx株とHpx・ydeD/・fliY株を対数増

殖期まで培養後、培地に直接、非細胞膜透過性BES試薬を加えさらに1時間培養する。集菌後、リン酸バッファー(pH7.0)で4回洗浄し、過酸化水素の局在を蛍光顕微鏡下で観察する。

2) 過酸化脂質の定量：申請者は、細胞膜の主成分はリン脂質であることから、そのリン脂質(LPSも含む)が過酸化水素によって酸化され、過酸化脂質が生じ、細胞にダメージを与えるのではないかと予想している。そこで1)で構築したHpx・ydeD/・fliY変異株とHpx変異株を過酸化水素添加培地(75・M)で10時間培養後、細胞膜リン脂質を調製し、過酸化脂質の非酵素的分解産物であるマロンジアルデヒドなどのアルデヒドとチオバルビツール酸を酸性条件で反応させ、生成する赤色の色素を分光学的に定量することで、過酸化水素による過酸化脂質の生成量について調べる。

【平成24年度の研究計画】

3) 過酸化脂質と細胞分裂との関連性：過酸化水素に曝し、細胞伸長を引き起こしたHpx変異株と過酸化水素処理をしていない細胞からリン脂質を調整し、薄層クロマトグラフィー(TLC)およびガスクロマトグラフ質量分析法を用いて、リン脂質(大腸菌の主要なリン脂質であるホスファチジルエタノールアミン)の酸化の割合と細胞伸長との相関関係を評価する。



ここで真核生物の過酸化脂質の生成の鍵酵素はホスホリパーゼA₂であり、大腸菌にもホスホリパーゼが存在するが、A₁またはA₂活性のいずれを有しているかは分かっていない。さらに、真核生物では酸化された過酸化脂質からホスホリパーゼA₂により、酸化された脂肪酸鎖が切断され、グルタチオンペルオキシダーゼ(GSHPx)により修復される。しかしながら、大腸菌はこのGSHPxを有していません。そのため過酸化脂質を分解するホスホリパーゼが存在するにもかかわらず修復経路がないため、システインの重要な役割があるのではないかと考えられる。そこで**大腸菌のホスホリパーゼをHis-タグ精製し、その酵素の特性を解析**する。

大腸菌をモデルに遊離のシステインが、リン脂質のクオリティーコントロールに重要な役割を担っている可能性を示し、システインによる新たな酸化ストレス防御機構を明らかにする。

4. 研究成果

1. 大腸菌におけるシスチン取り込み因子の同定

1-1. ATP依存的な高親和性シスチンインポーターFliY-YecSC

これまでに*Lactobacillus fermentum* BR11のCySS取り込みに関与する遺伝子群は、*cyuABC*オペロンを形成し、CyuAは内膜タンパク質、CyuBはATP-結合タンパク質、CyuCはCySS結合タンパク質をそれぞれコードしているATP-結合カセット(ABC)スーパーファミリーに属するトランスポーターであると報告されている。また、*Bacillus subtilis*では3種のCySS取り込み系(YckKJI, YtmJKLMN, TcyP)が既に明らかにされており、この内、YckKJIとYtmJKLMNはABCトランスポーターである。さらに、これら3つの欠損株では、CySSを唯一の硫黄源で生育できないことも知られている。

大腸菌のペリプラズムタンパク質FliYは、

*Lactobacillus*由来のCyuCや*Bacillus*由来のYecK、YtmJ、YtmKといったCySS結合タンパク質と30~40%の相同性があり、さらに、CySSと結合することが*in vitro*の実験で既に示されている。これらのことから、FliY依存的なCySS取り込み機構の存在が示唆されていた。そこで我々は、野生株および・*fliY*株を用いて、アイソトープラベルされた¹⁴C-CySSを培地に添加し、細胞内に取り込まれるCySS量を経時的に測定した。その結果、・*fliY*株は野生株と比べて、CySSの取り込み量が有意に減少したことから、FliY依存的なCySS取り込み系の存在が明らかとなった。次に、*fliY*の下流にある*yecS*と*yecC*に着目した。当初、*fliY*は下流にターミネーター配列があり、単独で発現していると考えていたが、大腸菌のYecSとYecCは、*Lactobacillus*属細菌の内膜タンパク質CyuAとATP-結合タンパク質CyuBとそれぞれ49、51%の相同性が見られた。さらに、YecCのアミノ酸配列上には、生物間で高く保存されたABCトランスポーターに特異的なモチーフ（Walker AおよびB motif、ABC signature motif）が存在していた。以上の知見から、YecSCがABCトランスポーターであり、FliY依存的なCySSインポーターであると予想した。実際に、・*fliY*、・*yecS*、・*yecC*各単独破壊株における¹⁴C-CySS取り込み量は、野生株と比較して著しく減少した。また、・*yecS*・*yecC*二重破壊株のCySS取り込み量も単独破壊株のものと同程度であったことから、FliY、YecSおよびYecCの三者が、いずれも協調的にCySS取り込みに関与していると考えられた。さらに、FliY-YecSCが、グルコース由来のATP依存的にCySSを取り込むことも確認できた。ABCトランスポーターの輸送機能を支える最小ユニットは、6回の膜貫通領域と1つのATP結合部位が2つ結合したものと考えられており、YecSは3回膜貫通型内膜タンパク質であることから、YecSCは二量体以上を形成して機能すると考えられた。また、・*fliY*、・*yecS*、・*yecC*各単独破壊株には、CySS取り込み活性が残っていることから、大腸菌にはFliY-YecSC以外にCySSのインポーターが存在することが明らかとなった。

1-2. Na⁺またはH⁺依存的な低親和性シスチンインポーターYdjN

最近、野中らはSATをコードする*cysE*の欠損株から構築したトランスポゾン (Tn5) 変

異株ライブラリー (約 1,000 クローン) を用い、Cysを含む最少培地では生育するが、S-スルホシステインを単一Cys源として利用できない変異株を取得し、その原因遺伝子として*ydjN*を同定した。まず、培地に添加したS-Cys濃度の経時変化を解析したところ、野生株では徐々に減少するのに対して、*ydjN*欠損株では全く減少しなかった。一方、YdjNを過剰発現させた菌株では野生株に比べ、S-Cys量の低下が促進された。これらのことから、*ydjN*がS-Cysのインポーターをコードすると考えられた。さらに、S-Cysの代わりにCySSを培地中に添加した場合でも、同様の結果が得られたことから、YdjNはCySSの取り込みにも関与する可能性が示された。

そこで我々は、上記の方法によりYdjNタンパク質に依存したCySS取り込み活性を測定した。その結果、 $\Delta ydjN \Delta yecS$ 株はほとんどCySSを取り込めず、唯一の硫黄源としてCySSを含む最少培地においても生育できないことから、大腸菌のCySS取り込み系には、FliY-YecSCを介する系とYdjNを介する系の2つしか存在しないと結論づけた。また、高濃度 (165 nM以上) のCySSを添加すると、 $\Delta ydjN$ 株はほぼ一定量しか取り込まなかったが、 $\Delta yecS$ 株では濃度依存的に取り込み量も増加した。また、低濃度 (165 nM以下) のCySSを添加した場合、 $\Delta ydjN$ 株の取り込み量は野生株の約3倍に増加していたが、 $\Delta yecS$ 株では野生株よりも取り込み量は減少した。また、*fliY*の転写量を定量的PCRにより解析したところ、 $\Delta ydjN$ 株では野生株の約10倍に上昇していた。したがって、 $\Delta ydjN$ 株のCySS取り込み活性の増加は、FliY-YecSCの発現上昇に起因すると考えられた。

膜タンパク質の予測プログラム SOSUI や BLAST 検索では、YdjN はカルボキシル末端側がペリプラズム側に存在する 10 回膜貫通型内膜タンパク質であり、ATP を利用せずに促進拡散を担う SLC (Solute Carrier) ファミリーに属する Na⁺または H⁺依存性のジカルボン酸 (カルボキシル基を 2 個もつ有機酸) シンポーターであると予測された。実際に、YdjN はグルコース由来の ATP に非依存的に CySS を取り込むことを確認した。また、真核生物における CySS 取り込みは、Na⁺依存的、またはグルタミン酸などのアミノ酸との交換輸送によって行われ、ATP 非

依存的であることが知られている。ヒトでは SLC ファミリーの一つである SLC1 (高親和性グルタミン酸・中性アミノ酸トランスポーターファミリー) が YdjN と約 30% の相同性を示すことから、YdjN は原核生物から真核生物まで広範囲な生物種で重要な機能を果たしていると考えられる。

2. 2つのシスチンインポーターの反応速度論的解析

野生株、*ydjN* 株、 $\Delta yecS$ 株を用いて、各濃度の CySS (15-1, 200 nM) で 10 分後の取り込み量を測定後、Hanes-Woolf plot により各 K_m 値と V_{max} 値を算出した。2.2 でも述べたように、 $\Delta ydjN$ 株では *fliY-yecSC* の転写量が野生株より増加していた。この増加がタンパク質レベルでも見られるならば、 $\Delta ydjN$ 株の *FliY-YecSC* の V_{max} 値 (6.4) は、野生株ではさらに低いと考えられる。また、*FliY-YecSC* は CySS に対する K_m 値が非常に小さく (110 nM)、高い親和性で CySS を取り込むことが示された。Cys は強い還元力のため、アミノ酸の中で最も毒性が高い。一方、Cys 合成の鍵酵素 SAT は低濃度 (0.6-1・M) の Cys によりフィードバック阻害を受けるため、細胞内に遊離する Cys 濃度は 1・M 以下に調節されている。これらの知見と我々の結果を考え合わせると、*FliY-YecSC* によって取り込まれる CySS は、単に硫黄源としてだけでなく、別の目的で大腸菌が利用しているものと考えられる。一方、YdjN の CySS に対する K_m 値は *FliY-YecSC* の 10 倍を示し (1.1・M)、*FliY-YecSC* と比べて低い親和性で CySS を取り込むことが明らかとなった。また、CySS の総取り込み量 (V_{max} 値) で考えると野生株と変わらないことから、YdjN は *FliY-YecSC* と役割が異なり、栄養が豊富な条件で CySS を硫黄源として取り込んでいる可能性が考えられる。

3. 過酸化水素により誘導される2つのシスチンインポーター

Cys トランスポーター YdeD だけではなく、これら 2 つの CySS インポーターも H_2O_2 消去に必要であるか調べるために、 H_2O_2 添加による *ydeD*、および CySS インポーター関連遺伝子について定量的 PCR を用いて解析した。その結果、Cys トランスポーターをコードしている *ydeD* と同様に、*ydjN*、*fliY*、*yecS*、および *yecC* の転写が、 H_2O_2 によって誘導されることが判明した。一方、Cys 合成の鍵酵素

(SAT) をコードする *cysE* とグルタチオン (GSH) 合成の鍵酵素 (γ -グルタミルシステイン合成酵素) をコードする *gshA* については、ともに転写誘導は見られなかった。したがって、大腸菌は酸化ストレスに曝されても、Cys や GSH を新規に合成するのではなく、細胞内に存在する遊離の Cys を循環させることで、細胞を酸化ストレスから保護していると考えられる。このことは、Cys 合成によって生じる毒性の回避や、Cys 合成に必要な ATP の消費を伴わない点で、非常に効率的なメカニズムである。また、真核生物は酸化ストレスに曝されると、SLC ファミリーに属する Xc⁻ トランスポーターを介して積極的に CySS を取り込み、GSH 生成の基質に利用する。それに伴い、抗酸化酵素グルタチオンペルオキシダーゼの発現も上昇し、酸化ストレスから細胞を防御することが報告されている。しかしながら、大腸菌では、*gshA* を欠損させても H_2O_2 に感受性を示さないことから、原核生物と真核生物の間では、CySS 取り込み後の Cys の利用に違いがあるのかも知れない。

4. 酸化ストレス防御にシスチン排出トランスポーター YdeD と協調的に働くシスチン取り込みトランスポーター

唯一の硫黄源として硫酸イオンを用い、生育に必須な Cys を大腸菌に新規合成させる培養条件で、 H_2O_2 が $\Delta ydjN \Delta yecS$ 株の生育に与える影響について調べた。その結果、野生株、 $\Delta ydjN \Delta yecS$ 株ともに、対数期への移行が遅延しており、培地中の H_2O_2 を一定レベルまで消去することが、誘導期から対数期への移行に必要であると考えられる。 $\Delta ydjN \Delta yecS$ 株はこの遅延時期が野生株より長く、この誘導期での H_2O_2 消去に Cys 排出トランスポーターだけでなく、CySS インポーターが関与する。以上のことから、大腸菌において Cys と CySS が、Cys トランスポーター YdeD と CySS インポーターによって細胞質とペリプラズムを循環しながら H_2O_2 を非酵素的に水へと還元する新規な酸化ストレス防御機構を見出し、「Cys/CySS シェトルシステム」と名付けた。大腸菌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 や CySS を排出する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された。

5. 過酸化脂質生成の抑制に働く Cys/CySS シャトルシステム

H₂O₂ は一般的に DNA、タンパク質、脂質の酸化を引き起こすことで細胞にダメージを与えることが知られている。細胞膜の主成分はリン脂質であることから、そのリン脂質が H₂O₂ によって酸化され、過酸化脂質が生じ、細胞にダメージを与えている可能性がある。そのため、過酸化脂質の生成を抑制するメカニズムの一つとして、Cys/CySS シャトルシステムが機能しているのではないかと考えている。そこで、過酸化脂質のバイオマーカーであるマロンジアルデヒド (MDA) の量を測定したところ、 $\Delta ydeD\Delta fliY$ 株は野生株と比較して約 1.5 倍の MDA 量が検出された。したがって、Cys/CySS シャトルシステムの生理的意義の一つとして、細胞膜の構成物質である脂質の酸化を未然に防ぐことが明らかとなった。

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. Takeshi Nakatani, Iwao Ohtsu¹, Gen Nonaka, Natthawut Wiriyathanawudhiwong, Susumu Morigasaki, Hiroshi Takagi: Enhancement of thioredoxin/glutaredoxin-mediated L-cysteine synthesis from S-sulfocysteine increases L-cysteine production in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.*, **11**, (2012). 査読有
2. 大津巖生, 鈴木茉里奈, 高木博史: 大腸菌の内膜輸送体を介したシステイン関連化合物のシャトルシステムによる酸化ストレス防御機構. *化学と生物*, **50**, 370-377 (2012). 査読無
3. 大津巖生, 鈴木茉里奈, 仲谷豪, 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. *バイオインダストリー*, **29**, 53-60 (2012). 査読無

[学会発表] (計 6 件)

1. 大津巖生, 高木博史: 大腸菌における硫黄源の選択的利用機構とシステイン代謝との共役. 日本農芸化学会 2013 年

度大会, 「バクテリア・コード: バクテリアの基本 OS とは何か?」2013 年 3 月, 仙台市.

2. 大津巖生, 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大腸菌の新しい酸化ストレス防御機構. 日本農芸化学会 2012 年度大会, 「トランスポーター研究からの微生物物質生産の効率化へ向けた新たな挑戦」2012 年 3 月, 京都府.
3. 大津巖生, 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大腸菌の新規な酸化ストレス防御機構. 第 2 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム, 2012 年 3 月, 東京都.
4. 鈴木茉里奈, 大津巖生, 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 8 回大腸菌研究会, 2011 年 5 月, 木曽郡.
5. 仲谷豪, 大津巖生, 高木博史: 大腸菌における新規システイン生合成酵素の探索と発酵生産への応用. 第 8 回大腸菌研究会, 2011 年 5 月, 木曽郡.
6. 佐々木翠, 大津巖生, 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, 京都市.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

1. 名称: L-システイン生産能が高められた腸内細菌科に属する細菌
発明者: 大津巖生, 高木博史, ほか 3 名
出願番号: 特願 2013-056247
出願日: 2013-03-19
国内

[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 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: 6039565