

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450091

研究課題名(和文) 亜硫酸シグナルによる環境中の硫黄センシングと同化制御機構の解明

研究課題名(英文) Environmental sulfur sensing by sulfite signaling, and control mechanism of sulfur assimilation

研究代表者

大津 徹生 (OHTSU, Iwao)

筑波大学・国際産学連携本部・准教授

研究者番号：60395655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では環境中に含まれる硫黄源の変化に対して大腸菌の炭素同化経路がどのように調節されているのかについて理解を深めることを目的とした。その結果、チオ硫酸を単一硫黄源とした場合と、培地中のグルコースが完全に消費された直後に硫化水素が生成されることを見出した。一方、大腸菌のグルコース枯渇時の硫化水素生成には、チオ硫酸イオンの同化経路反応が関与していることが判明した。さらに、Crpがこの硫化水素生成に必須であることを見出した。以上の結果からCrpが環境中の硫黄源を感知することによって硫黄同化経路と炭素同化経路を協調的に制御しており、代謝経路間の調節メカニズムのシグナル因子として機能すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We report the identification of a novel regulation system of sulfite (S03) or hydrogen sulfide (H2S) production in E. coli. We have measured the capacity of H2S generation in the medium containing glucose, and showed that glucose limitation induces abundant production of H2S from E. coli cells. No requirement of cysteine degradation for this inducible H2S generation because effect of deletion of genes involved cysteine degradation is negligible. Experiments using minimal synthetic medium containing inorganic sulfur compounds as a sulfur source revealed that the H2S is produced by assimilation of thiosulfate, but not by sulfate. We also found that Crp is required for the H2S production to response in glucose limitation. These results indicates that, in E. coli, carbon and sulfur metabolism are likely to be coordinately controlled by sensing starvation for nutrients.

研究分野：応用微生物学

キーワード：硫黄同化経路 チオ硫酸イオン 亜硫酸イオン 硫化水素 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

生物地球化学的サイクルの中で、生命活動に必須な「硫黄」の循環に着目すると、微生物、植物には土壌中の無機硫黄（主に硫酸塩）を取り込み、有機硫黄化合物に固定する「硫黄同化経路」が存在する。一方、ヒトを含めた哺乳類には、この硫黄同化経路は存在しておらず、哺乳類は生命活動の維持に必要な硫黄源を微生物や植物に依存している。したがって、地球上の硫黄は、微生物・植物による有機硫黄化合物への固定と哺乳類による無機硫黄への異化という一方向に循環している。そこで、生命活動に必須な『硫黄』の同化に着目する。炭素源・窒素源における選択的な利用機構が微生物には存在する一方、これまで硫黄源に関する選択的な利用機構は知られていない。最近、応募者は *cysM* 株が硫酸塩を含む最少培地で良好に生育するのに対し、チオ硫酸塩を添加した条件では感受性を示すことから、チオ硫酸塩が硫酸塩の利用を抑制することで、チオ硫酸経路優先的にシステインを合成する硫黄源の選択的利用機構「チオ硫酸リプレッション (Thiosulfate repression: TSR)」を世界で初めて発見した (図1)。

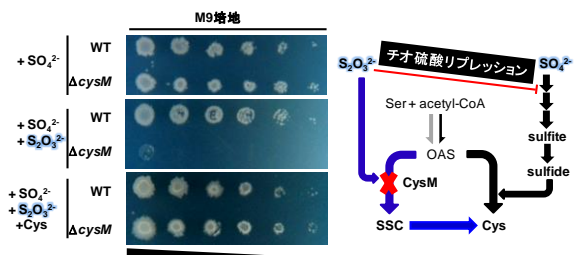


図1. チオ硫酸塩による硫酸塩の利用抑制

次に、この TSR の普遍性について検討した結果、大腸菌と同様のシステイン代謝経路を有する 分裂酵母がチオ硫酸塩単一硫黄源で生育できること、<sup>35</sup>S アイソトープラベルした硫酸塩の取り込み実験から TSR が存在することを見出した。硫酸塩から 1 分子の Cys を合成するのに、2 分子の ATP と 4 分子の NADPH を要する一方、チオ硫酸塩では、1 分子の NADPH の消費のみで Cys を合成できる。すなわち、硫黄の酸化数が +6 の硫酸イオンより、+2 のチオ硫酸イオンを利用する方が、同化的還元に要するエネルギーも少なくなる点で、原核・真核微生物が硫酸塩よりチオ硫酸塩の利用を優先することは合目的である。本研究課題では、微生物の硫黄同化に着目し、硫黄同化経路から生じる低分子硫黄化合物 (H<sub>2</sub>S, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) が、セカンドメッセンジャーとして機能し、環境中の硫黄のセンシングや炭素・窒素代謝との共役機構を明らかにし、有用物質生産への応用が期待できる。中央代謝経路と硫黄代謝及び硫黄源の選択的利用機構の関係に着目する。大腸菌はシステインを合成する二つの異なる硫黄同化経路を有する。一つは

2 分子の ATP と 4 分子の NADPH の消費を伴う硫酸からシステインを合成する経路と、1 分子の NADPH の消費により、システインを合成するチオ硫酸経路である。これら 2 つの硫黄同化経路は、中央代謝経路のエネルギー生産状況に応じて使い分けられる。そのためには、硫黄代謝と中央代謝経路を結ぶシグナルについて解析を行い、代謝の変化が増殖の制御機構とどのように共役するのか、その仕組みを明らかにする。

2. 研究の目的

大腸菌は、硫酸塩とチオ硫酸塩が同時に存在すると、チオ硫酸塩からシステインを優先的に合成する硫黄源の選択的利用機構を有していることを見出した。さらに、硫酸経路からシステインを合成するには、2 分子の ATP の消費を伴う一方、チオ硫酸経路は ATP 消費を伴わない。生物は、栄養を外界から取り込み、代謝して細胞構成成分を合成し、エネルギーを生産する。これは生命の根本性質の一つである。本研究では、①外界のチオ硫酸と硫酸の異なる 2 つの硫黄源をどのように大腸菌がセンシングしているのか、②二つの異なる硫黄同化経路と異化（中央代謝）経路との共役機構を司る因子の探索、③これら共役機構を人為的に脱共役させることで、増殖に必要な異化を伴わず基質から有用物質を生産し続ける大腸菌株の育種に取り組む。本研究課題は、微生物・植物に共通の硫黄同化経路から生じる低分子硫黄化合物 (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) のセカンドメッセンジャーとしての役割、環境中の硫黄のセンシング、炭素・窒素代謝との共役機構を明らかにし、それらシグナル分子の高度利用化による有用物質生産への有用性を評価することを目的とする。

3. 研究の方法

主に 2 つの方法論を確立し、低分子硫黄化合物 (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) のセカンドメッセンジャーとしての役割の解明に活用した。

(1) 硫黄分子センシング機構

①サルファーインデックスの構築と育種戦略への活用

細胞内の含硫黄化合物は細胞内含量が低く、炭素や窒素代謝産物のようなメタボロミクスの理解は遅れていた。しかし、最近、応募者は各硫黄分子のチオール基を Bromobimane 試薬で修飾し、LC-MS/MS で分離・選択的検出・定量可能な新たな方法を確立した (慶応大学医学部末松教授らとの共同研究)。この方法では、低分子の硫黄化合物を修飾試薬により検出しやすい高分子へと変換し、さらに LC-MS/MS の MRM 解析による高選択性かつ高感度な検出系を組み合わ

せることで、硫黄分子種の網羅的な検出を世界に先駆けて可能にした (図 2)。

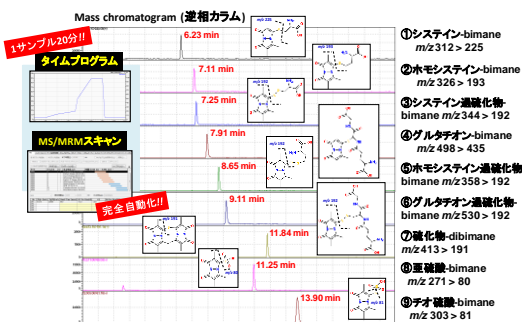


図3. Bromobimane修飾した硫黄代謝産物のLC-MS/MSによる分離および検出  
測定サンプルの作製も簡便であり、細胞を有機溶媒処理して低分子化合物を抽出するのみである。検出に関しては、システインやグルタチオンの他にも、チオ硫酸イオンや亜硫酸イオン、硫化物イオンなどの硫黄同化経路の主要な中間体が、網羅的に(現在、計9種)、数百 n ~  $\mu$ M レベルで、一度に定量可能であり、スループット性も高い(20分/ラン)。このシステムを用いることで、各種微生物のサルファーインデックスを構築できる。この診断結果を育種戦略へと活用する。

## (2) 硫黄分子センシング機構

### ②硫黄代謝関連酵素群のタンパク質発現プロファイリングシステムの構築

メタボロミクスによるアプローチ以外に、中央代謝経路のエネルギー産生、生育の状況に応じて外界の硫黄源をセンシングし、取り込まれた硫黄を同化しているならば、硫黄同化に関連する遺伝子群の発現変化や中央代謝経路に関連する遺伝子群の発現が大きく変化する。そこでルシフェラーゼを発現するプラスミド pLux にシステイン関連遺伝子上流配列を連結し、代謝変化による遺伝子の発現プロファイルを経時的に解析するシステムも構築する。そこで、自発的に発光するルシフェラーゼを発現するプラスミド (pLux) を用いて、システイン・グルタチオン代謝、硫黄同化経路で働くタンパク質の発現変動を経時的にモニターできるシステムを構築する。具体的には、プラスミド *luxCDABE* オペロンに硫黄代謝に関わる遺伝子上流配列を連結したプラスミドライブラリーを構築する。これらプラスミドライブラリーを導入した形質転換体を 96 穴プレートにて培養し、発光量をルミノメーターで測定し、硫黄代謝に関わるタンパク質群の発現量を経時的にモニターし、炭素源と硫黄代謝との関係 (共役) について解析する。

## 4. 研究成果

亜硫酸イオンの検出よりもその下流の硫化水素生成生成を見ることは簡易的な方法で目視できるため、最初に硫化水素生成前後におけ

## る代謝経路の変化

S1 と S2 (S1-S2)、S1 と S3 (S1-S3)、S1 と S4 (S1-S4) の間の発現状態を視覚的に捉えるためにスクアッタープロット解析を行った。スクアッタープロットは、2 群間のデータ比較の際に用いられるグラフの表示方法である。本解析では、S1 の蛍光強度を X 軸に分布し、S2, S3, S4 の蛍光強度を Y 軸に分布している。各サンプルの発現レベルが同程度であれば、プロットは中心 45 度のラインに乗るが、発現レベルに差があれば、中心ラインから外れていく。S1-S2 と S1-S3 では 45 度のラインに殆どのプロットが収束したが、S1-S4 については 45 度のラインにプロットが収束せず、プロットが全体に散乱してしまった。この結果は、S4 のサンプルで正常に測定できていないことを示している。以降、S4 を除いて解析を進めた。

次に、Pathway tools software (<http://bioinformatics.ai.sri.com/ptools/>) を用いて各代謝経路の遺伝子発現変化を調べた。このパスウェイ解析では、発現変動遺伝子がどの代謝経路に集中しているかを視覚的にとらえることができる。S1 に対する S2、あるいは S3 の遺伝子発現変化についてパスウェイ解析したところ、変動する遺伝子が僅かに確認されたものの、硫黄同化経路や中央代謝を含めて、いずれの代謝経路にも代謝変動をもたらすような大きな変化は認められなかった。今回の解析では硫化水素ガスが発生する直前と直後のサンプルを用いたが、大きな代謝変動を捉えるためには、サンプリングを硫化水素発生前後のより長い時間幅で経時毎で行うことや、培養条件を変えるなどの条件検討が必要であると考えられる。

### 発現変動が認められた遺伝子の機能分類解析

次に、遺伝子の発現変動が 2 倍以上に変化した、あるいは 1/2 以下に変化した遺伝子を調べた。S1 と S2 を比較すると、48 種類の遺伝子の発現が増加し、29 種類の遺伝子の発現が減少していた。また、S1 と S3 の比較では 166 種類の遺伝子の発現が増加し、109 種類の遺伝子発現が減少していた。S2 と S3 の比較を行ったところ、119 種類の遺伝子の発現が増加し、76 種類の遺伝子発現が減少しており、発現変動が認められた遺伝子は、S1 と S3 のときとほぼ同じであることがわかった。そこで、硫化水素発生前の S1 と硫化水素発生後の S3 の間で発現変動が認められた遺伝子について、DAVID を用いて機能分類解析を行ったところ、硫化水素生成後では細胞膜に局在するタンパク質をコードする遺伝子 (トランスポーターや機能未知タンパク質を含む) の発現増加が顕著に認められた。一方、タンパク質合成系やアルギニン代謝、ヌクレオシド代

謝、プリン代謝に関与する遺伝子群の発現が減少していた。

【研究背景】で述べたように、チオ硫酸硫黄転移酵素はチオ硫酸同化に関与していることが示されているが、硫化水素の生成反応への関与は不明である。発現量が増加した遺伝子の中には、ローダナーゼをコードする遺伝子 *pspE* と *sseA* が含まれており、*pspE* は 2.23 倍、*sseA* は 2.86 倍にそれぞれ増加していた。そこで、これらの変化が有意な発現変動であるか調べるために、R ソフトにてウィルコクソンの順位和検定 (Wilcoxon rank sum test) を行ったところ、*sseA*、*pspE* については *p* 値が 0.01646 であり、有意な差 ( $p < 0.05$ ) であることが判明した。したがって、大腸菌が持つ複数のローダナーゼのうち、*sseA* と *pspE* は硫化水素の生成前後で発現量が増加すると考えられる。これらの結果は、ローダナーゼの機能が大腸菌の  $S_2O_3^{2-}$  由来の硫化水素生成に関与している可能性を示している。第 2 項では、ローダナーゼの機能と硫化水素生成機能の関連について具体的に解析を進めた。

発現が減少した遺伝子群に目を向けると、タンパク質合成系に関与する遺伝子が数多く見られた。この点に着目して、スキッタープロット解析でタンパク質合成系に関与する遺伝子群について洗い直してみると、リボソームタンパク質をコードする 10 種類の遺伝子に加え、43 種類の tRNA をコードする遺伝子についても発現量が減少していることが分かった。Wilcoxon rank sum test においても、これら一群の発現量の変化が  $p = 2.2 \times 10^{-16}$  と有意な差であることが判明した。グルコースが枯渇した条件下 (S3 のような条件) ではタンパク質合成が停滞する傾向にあることを示している。タンパク質合成系では膨大なエネルギー (ATP) を必要とする。エネルギー源の枯渇状態を耐え忍ぶために、大腸菌はタンパク質合成系を一時的に停滞させていると考えられる。環境中の ATP、あるいは栄養飢が餓状態に変化する際に、硫化物イオン (あるいは硫化水素) がシグナル分子として機能して、遺伝子の転写系やタンパク質翻訳系などの細胞内機能を制御しているのかもしれない。

#### 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 4 件)

- ① Hiroshi Takagi & Iwao Ohtsu, L-cysteine metabolism and fermentation in microorganisms, Adv. Biochem Eng. Biotechnol., 159, 129-151, 2017. doi: 10.1007/10\_2016\_29.
- ② Yusuke Kawano, Iwao Ohtsu, Ai Tamakoshi, Maeka Shiroyama, Ai Tsuruoka, Kazuhiro

Takumi, Gen Nonaka, Tsuyoshi Nakanishi, Takako Hishiki, Makoto Suematsu, and Takagi Hiroshi, Involvement of the *yciW* gene in L-cysteine and L-methionine metabolism in Escherichia coli, J. Biosci. Bioeng., 119, 310-313, 2015. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.08.012. Epub 2014 Sep 29.

- ③ Yusuke Kawano, Iwao Ohtsu, Kazuhiro Takumi, Ai Tamakoshi, Gen Nonaka, Eri Funahashi, Masaki Ihara, and Takagi Hiroshi, Enhancement of L-cysteine production by disruption of *yciW* in Escherichia coli, J. Biosci. Bioeng., 119, 176-179, 2015. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.07.006. Epub 2014 Aug 4.
- ④ Iwao Ohtsu, Yusuke Kawano, Marina Suzuki, Susumu Morigasaki, Kyohei Saiki, Syunsuke Yamazaki, Gen Nonaka, and Hiroshi Takagi, Uptake of L-cystine via an ABC transporter contributes defense of oxidative stress in the L-cysteine export-dependent manner in Escherichia coli, PLOS One, 10, 1-14, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0120619. eCollection 2015.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 三浦雅史, 田中尚志, 鈴木園枝, 石井寛子, 河野祐介, 大津巖生, 第 55 回日本栄養・食糧学会近畿支部大会 (大阪府堺市), 2016
- ② 西口みゆ, 城山真恵加, 河野祐介, 高木博史, 大津巖生, 第 11 回トランスポーター研究会 (京都府宇治市), 2016
- ③ 石井寛子, 河野祐介, 大津巖生, 第 11 回トランスポーター研究会 (京都府宇治市), 2016
- ④ 河野祐介, 仲谷豪, 西口みゆ, 鶴岡愛, 高木博史, 大津巖生, 第 68 回日本生物工学会大会 (富山県富山市), 2016
- ⑤ 西口みゆ, 城山真恵加, 河野祐介, 高木博史, 大津巖生, 第 68 回日本生物工学会大会 (富山県富山市), 2016
- ⑥ 大津巖生, 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会 (神奈川県藤沢市), 2017
- ⑦ 西口みゆ, 田中尚志, 三浦雅史, 河野祐介, 大津巖生, 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会 (神奈川県藤沢市), 2017
- ⑧ 氏本貴仁, 田中尚志, 尾崎由佳梨, 河野祐介, 阿部哲也, 大津巖生, 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会 (神奈川県藤沢市), 2017

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
大津 巖生 (OHTSU, Iwao)  
筑波大学・国際産学連携本部・准教授  
研究者番号: 60395655