

博士論文番号：1181027

大腸菌におけるチオ硫酸イオン優先的な システイン合成制御機構

仲谷 豪

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科
ストレス微生物科学研究室
(高木 博史 教授)

平成 25 年 12 月 3 日

目次

序論	5
第1章 新規システイン合成酵素の探索と発酵生産への応用	
1-1. 緒言	6
1-2. 材料と方法	12
1-2-1. 菌株	
1-2-2. プラスミド	
1-2-3. 培地組成	
1-2-4. プライマー	
1-2-5. 薄層クロマトグラフィーによる <i>S</i> -スルホシステインの非酵素的還元 の検証	
1-2-6. 酵素タンパク質の精製	
1-2-7. グルタレドキシシン活性の測定	
1-2-8. チオレドキシシン活性の測定	
1-2-9. システイン発酵生産	
1-2-10. <i>pcysK-I</i> , <i>pcysK-J</i> , <i>pcysJ-I</i> , <i>pcysK-I-nrdH</i> の構築	
1-2-11. $\Delta cysK\Delta cysM$ 二重欠損株の構築	
1-2-12. $\Delta cysK \times$ Keio collection 二重欠損株ライブラリーの構築とシステイン要 求株の解析	
1-2-12-1. Hfr 株の構築	
1-2-12-2. 接合によるダブルノックアウトライブラリー構築	
1-3. 結果	23
1-3-1. グルタチオン（非酵素的反応）による <i>S</i> -スルホシステインの還元	
1-3-2. 還元酵素による <i>S</i> -スルホシステインからシステインの合成	
1-3-2-1. グルタレドキシシン 1, 2, 3 による <i>S</i> -スルホシステインからシステインへの還元 (<i>in vitro</i>)	
1-3-2-2. チオレドキシシン 1, 2, NrdH, Grx4 による <i>S</i> -スルホシステインからシステインへの還元 (<i>in vitro</i>)	
1-3-2-3. 各還元酵素過剰発現株のシステイン発酵生産	
1-3-2-4. <i>in vivo</i> における Grx1, NrdH による <i>S</i> -スルホシステイン還元 の検証	
1-3-2-5. 亜硫酸イオンリクルート系の検証	
1-3-2-6. 亜硫酸還元酵素過剰発現株におけるシステイン発酵生産	
1-3-2-7. 硫酸イオンを単独硫黄源とした時のシステイン発酵生産	

1-3-3. 二重欠損株ライブラリーを用いたチオ硫酸経路関連遺伝子の探索	
1-3-3-1. $\Delta\text{cysK}\Delta\text{cysM}$ 二重欠損株のシステイン要求性の解析	
1-3-3-2. Hfr ΔcysK 株の構築	
1-3-3-3. $\Delta\text{cysK}\times\text{Keio collection}$ 二重欠損株ライブラリーの構築と システイン要求二重欠損株の解析	
1-4. 考察	37
第 2 章 チオ硫酸イオン優先的なシステイン合成制御機構の解析	
2-1. 緒言	42
2-2. 材料と方法	47
2-2-1. 菌株とプラスミド	
2-2-2. 培地組成	
2-2-3. プライマー	
2-2-4. 遺伝子破壊株の構築	
2-2-5. cDNA マイクロアレイ解析用の RNA 抽出	
2-2-6. RT-PCR による転写量変化の解析	
2-2-7. ^{35}S を用いた硫酸イオン取り込み活性の測定	
2-2-8. $\Delta\text{cysM}\Delta\text{X}$ 二重欠損株ライブラリーの構築とスクリーニング	
2-3. 結果	55
2-3-1. チオ硫酸経路優先的なシステイン合成制御機構 (TSR) の可能性	
2-3-2. チオ硫酸イオンによる硫酸イオン取り込みの抑制	
2-3-3. チオ硫酸イオンによる硫黄同化関連遺伝子群の転写抑制	
2-3-4. チオ硫酸イオンは CysB 依存的に硫黄同化関連遺伝子の転写を抑制 する	
2-3-5. TSR が起こらないサプレッサー変異株 Sup1 の解析	
2-3-5-1. TSR が起こらないサプレッサー変異株 Sup1 の単離	
2-3-5-2. 次世代シーケンサーを用いた Sup1 株の変異点解析	
2-3-5-3. サプレッサー変異による硫酸経路遺伝子群の転写抑制解除	
2-3-5-4. Sup1 株は YeeDE 依存的にチオ硫酸イオンを硫黄源として生育する	
2-3-6. 細胞質内へのチオ硫酸イオンの取り込みは CysPTWA に依存する	
2-3-7. チオ硫酸イオンによる硫黄同化関連遺伝子の転写抑制は細胞質内 で起こる	

2-3-8. $\Delta cysM\Delta X$ 二重欠損株ライブラリーを用いた TSR の制御に 関与する遺伝子のスクリーニング	
2-3-9. チオ硫酸イオンによる生育促進効果の検証	
2.4. 考察	91
総括	99
謝辞	102
参考文献	103

序論

近年、含硫アミノ酸の一種である L-システイン (Cys) について、細胞内における生理的な重要性の理解が急速に深まってきている。Cys はタンパク質・グルタチオンの構成成分、ジスルフィド結合形成による立体構造の維持などについてはよく知られている。しかし、環境変化に応じて生じる活性酸素種に対するセンサー分子としての役割など、Cys に含まれる硫黄分子の酸化還元反応による多様な機能が明らかにされつつある。最近、当研究室では大腸菌において、内膜トランスポーターの働きによって Cys とシスチンが細胞質とペリプラズムの間を循環しながらペリプラズム内の過酸化水素を消去し、細胞を酸化ストレスから防御する新規な機構「Cys/シスチンのシャトルシステム」を見出した (Ohtsu *et al.*, 2010)。

また生理的な重要性だけでなく、Cys は産業においても極めて多岐に亘る分野で広く利用されている (Ikeda, 2003)。食品分野では海外市場を中心にパン生地改良剤・フレーバー原料として、化粧品分野ではパーマ剤原料をはじめとしたヘアケア製品、医薬分野では古くから去痰剤原料として用いられている (Duffy, 1980; Nakamori, 2008)。最近では、市場が急拡大している美白効果を訴求したオーバー・ザ・カウンター製剤の原料として需要が著しく伸びており、Cys の生産量は世界的に年々増加している。

Cys の合成系を理解することは、その生理的機能、及び発酵生産の両面で非常に重要である。大腸菌における硫酸イオンを硫黄源とする Cys の合成機構に関しては、これまでの精力的な研究によって、Cys 合成に必要な多くの遺伝子・酵素などが同定され、分子レベルでその機能や機構が解明されてきた。しかし、硫酸イオン以外の硫黄源からの Cys 合成経路や Cys 合成系全体の制御機構に関しては不明点が多い。その中でも本研究では、チオ硫酸イオンを硫黄源とする Cys 合成経路に着目し、その分子機構や生理的役割を明らかにすることを目的とした。

本研究の第 1 章では、チオ硫酸イオンからの Cys 生合成経路で未解明であった S-スルホシステインから Cys へ還元する酵素の探索とその発酵生産への応用を行った。また、第 2 章では、第 1 章の研究過程で見出したチオ硫酸イオン優先的な Cys の合成制御に関する分子機構とその生理的役割を解析した。

第 1 章

新規システイン合成酵素の探索と 発酵生産への応用

1-1. 緒言

< Cys の製造方法と課題 >

Cys は主に人毛・動物毛に多く含まれるアミノ酸であり、古くからこれらの酸加水分解物からの抽出により、工業的に製造されてきた (Nakamori, 2008)。しかし、この製法は大量の塩酸の使用、異臭や廃液処理等の環境対策、そして狂牛病に関連する可能性のある動物由来原料の使用など、多くの問題がある。これらの問題を解決するため、味の素株式会社 (味の素社) は、化学合成した Cys の中間体であるアミノチアゾリンカルボン酸を出発原料に *Pseudomonas thiazolinophilium* 由来の酵素を用いて、不斉加水分解する製法を 1980 年代前半に開発した (Ohmachi *et al.*, 2002; Sano *et al.*, 1979; Sano and Mitsugi, 1978; Tamura *et al.*, 1998; Ryu *et al.*, 1997)。しかし、この製法に関しても化学合成の原材料を供給する過程において、環境負荷の問題が指摘されている (Nakamori, 2008)。

< Cys の直接発酵法と課題 >

上記の課題を解決するため、当研究室では味の素社と共同で、新規な Cys 製造方法として、微生物を用いたグルコースからの直接発酵法を考案し、①生合成系の強化、②分解系の弱化、③排出系の強化に関する研究を進めている (Wada and Takagi, 2006)。

大腸菌の Cys 生合成とその制御機構は図 1 に示すように、通常野生株では Cys 生合成経路の鍵酵素セリンアセチルトランスフェラーゼ (CysE) に対する Cys の強力なフィードバック阻害によって制御されており、過剰に生産されることはない (Denk and Böck, 1987)。しかしながら、当研究室をはじめ、フィードバック阻害感受性を低下させた変異型 CysE を用いて合成系を強化することで、Cys の過剰生産が可能であることが報告されている (Denk and Böck, 1987; Leinfelder and Heinrich, 1997; Takagi *et al.*, 1999)。また当研究室では、大腸菌には Cys 分解酵素 Cys デスルフヒドラーゼ (CD) が少なくとも 5 種類存在し、これら CD の破壊により、Cys 分解系を弱化することが Cys 生産に効果的であることを明らかにして

いる (Awano *et al.*, 2003; 2005)。さらに最近では、細胞内で過剰生産された Cys を積極的に菌体外に排出するトランスポーター YdeD の強化により、Cys の発酵生産性が向上することが報告されている (DaBler *et al.*, 2000; Ziyatdinov *et al.*, 2005)。当研究室でも、32 種類の薬剤排出トランスポーターの中から、Cys 排出にも関与する内膜トランスポーター Bcr や、大腸菌の非必須一遺伝子欠損株ライブラリー (Keio collection) の中から、Cys 排出に関与する外膜タンパク質 TolC を同定し、Cys 発酵生産に効果的であることを明らかにしている (Yamada *et al.*, 2006; Wiriyathanawudhiwong *et al.*, 2009)。これらの成果により、培地中に Cys を約 2 g/L 蓄積させることに成功している。実際、これらの研究成果の一部を活用することで、味の素社は 2013 年から発酵法による Cys の実生産を開始している。しかし、グルタミン酸発酵やリジン発酵の生産性とは比較にならず、更なる生産性の改善が求められている。

<本研究の目的>

これまで、Cys 合成系の強化は CysE のフィードバック解除による過剰生産が中心であった。そこで本研究では、これまで全く手付かずであったチオ硫酸イオンを硫黄源とするチオ硫酸経路の *S*-スルホシステイン (SSC) から Cys への変換酵素を探索し、その強化により Cys 発酵生産性の向上を目指した。

大腸菌の生合成経路は、まず前駆体である L-セリン (Ser) とアセチル CoA から CysE の触媒反応により *O*-アセチルセリン (OAS) が合成される。次の OAS から Cys への合成経路は 2 つの経路が存在する。Cys 合成酵素 (CysK) により OAS と硫酸イオン由来の硫化物イオンから合成される硫酸経路と、SSC 合成酵素 (CysM) により OAS とチオ硫酸イオンから生じる SSC を経由するチオ硫酸経路が存在する (Kredich, 1992 ; 図 1)。これまで Cys 発酵生産菌の育種は、硫酸経路の制御機構の解除を中心とした菌株の育種が鋭意続けられてきた。しかし、従来の加水分解抽出法を十分には凌駕できておらず、硫酸経路だけでは合成系の強化にも限界がある。一方、チオ硫酸経路は SSC から Cys への還元に関わる酵素やその制御機構が未解明であるが、硫酸経路と比べ硫黄同化にかかるエネルギー消費が少ないという利点を有している。以上のことから、チオ硫酸経路の代謝機構を解明し、その知見を発酵生産へ応用することで Cys 生産性が向上できると考えた。

SSC とは Cys のチオール基に亜硫酸イオンが付加されたスルホン酸であり、このジスルフィド結合を還元することで亜硫酸イオンと Cys が合成される (図 2)。この SSC を含むチオ硫酸経路の存在は、1950 年に明らかにされ (Hockenull *et al.*, 1950)、1985 年に *cysM* 遺伝子がコードする CysM によりチオ硫酸イオンと OAS

から SSC が合成されることが証明された (Nakamura *et al.*, 1985)。しかし、SSC から Cys への変換は、グルタチオン (GSH) や還元酵素などで容易に起こると考えられてきたが、細胞内での変換に関わる酵素や遺伝子は未だ同定されていない。

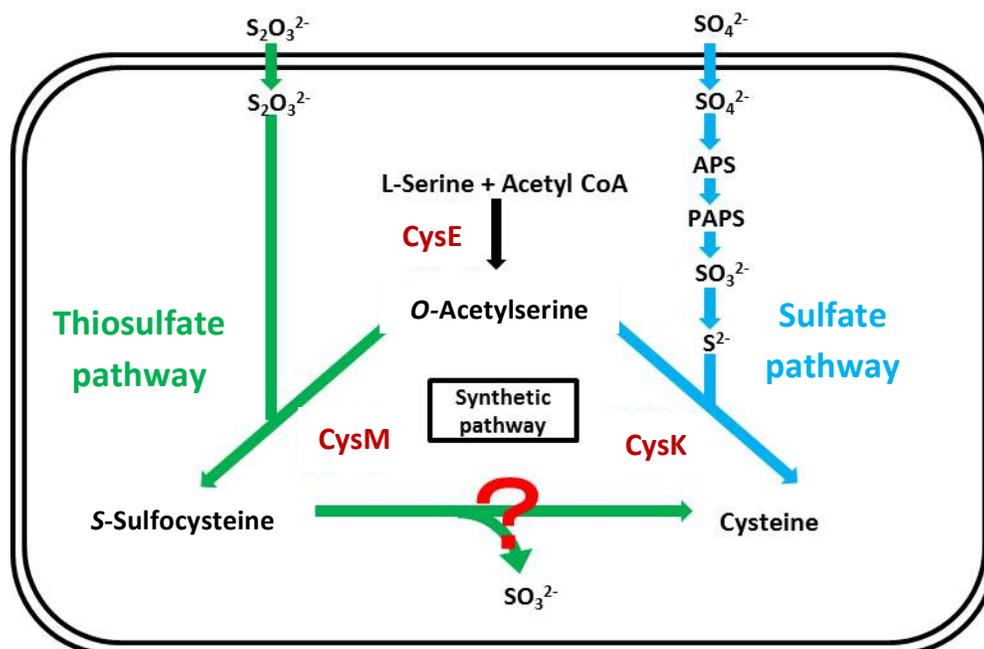


図 1 大腸菌における Cys 生合成経路

本研究に関わる Cys 生合成経路。青線は硫酸経路を、緑色はチオ硫酸経路を表している。本研究では、未解明である SSC から Cys の変換を促進し、発酵生産に有用である遺伝子、タンパク質を同定する。

APS, Adenosine 5-phosphosulfate; PAPS, 3-Phosphoadenosine 5-phosphosulfate; OAS, *O*-Acetylserine

<還元酵素による SSC から Cys への変換の検証>

本研究では、2つのアプローチにより SSC から Cys への変換経路を明らかにすることにした。1つ目は、細胞内における主要なジスルフィド結合の還元酵素であるグルタレドキシシン (Grx)、チオレドキシシン (Trx) が SSC を Cys へと還元できるかを *in vitro*、*in vivo* で検証するアプローチである。既に、哺乳類由来の Grx の特性解析に基質として SSC が使用されており、SSC は哺乳類の Grx により還元されることが知られていた (Vadim *et al.*, 2001)。そこで、大腸菌の Grx でも同様に還元できるのではないかと考えた。また、硫酸経路で働く 3-ホスホアデノシン-5-ホスホ硫酸 (PAPS) 還元酵素は、その活性部位に存在するチオール基がスルホン化 (スルホ基が付加されること) されることで、不活化されることが知られている。Grx と Trx が、これを還元し亜硫酸イオンを遊離させるという SSC の還元と

同様の反応を触媒することも報告されている (Russel *et al.*, 1990)。以上の理由より、大腸菌の Grx、Trx が Cys 発酵生産に有用ではないかと考えた。

実際には、Grx1, 2, 3, 4, Trx1, 2, NrdH という 7 種の還元酵素の SSC の還元活性を解析した (表 1)。このアプローチでは、まず精製したこれらの還元酵素が SSC の還元活性を示すか *in vitro* で確認した。

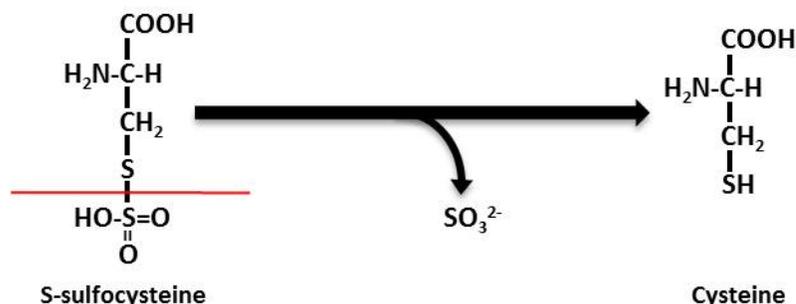


図 2 SSC から Cys への還元

SSC が還元されることで、スルホ基が除かれ亜硫酸イオンと Cys が生じる。

表 1 本研究で用いた還元酵素

還元酵素	遺伝子名	size	活性部位	再還元を行うreductant
Grx1	<i>grxA</i>	85 aa	CPYC	GSH/GSH reductase/NADPH
Grx2	<i>grxB</i>	215 aa	CPYC	GSH/GSH reductase/NADPH
Grx3	<i>grxC</i>	82 aa	CPYC	GSH/GSH reductase/NADPH
Grx4	<i>grxD</i>	115 aa	CGFS	Trx reductase/NADPH
Trx1	<i>trxA</i>	127 aa	CGPC	Trx reductase/NADPH
Trx2	<i>trxC</i>	139 aa	CGPC	Trx reductase/NADPH
NrdH	<i>nrdH</i>	81 aa	CVQC	Trx reductase/NADPH

<SSC を還元する可能性のある Grx>

大腸菌には、Grx1, 2, 3, 4 の 4 種類の Grx が存在する。Grx1, 2, 3 は活性部位に 2 つの Cys 残基から成る-CPYC-というジチオール型のモチーフを、Grx4 は 1 つの Cys 残基からなる-CGFS-というモノチオール型のモチーフをそれぞれ持ち、これらの Cys 残基のチオール基により基質の還元を行う。基質の還元を行うと同時に活性部位の Cys 残基が酸化されるが、GSH により再還元され、基質を還元できるようになる。この時 GSH は酸化型 GSH (GSSG) となるが、NADPH の還元力を利用して GSH レダクターゼにより速やかに還元型の GSH へと再還元され、一連

の反応は完了する。また、Grx4 の基質を還元するメカニズムは未だ明らかにはなっていないが、GSH との結合部位を持たず GSH により還元されないと考えられ、Grx1, 2, 3 とは大きく異なっている。その代り、Grx4 の活性部位の Cys 残基が GSH により酸化された場合に、Trx の再還元酵素である Trx レダクターゼにより還元されることが報告されている (Fernandes *et al.*, 2005)。このことより、本研究では Grx4 による SSC の還元活性測定には Trx レダクターゼを用いることにした。

Grx の主要な機能としては、Grx1, 2, 3 による PAPS 還元酵素の還元や、DNA 合成に関わるリボヌクレオチド還元酵素の還元など、生育に重要な役割を担っている。これ以外にも、タンパク質のジスルフィド結合や、低分子ジスルフィド、タンパク質や低分子物質の Cys 残基と GSH 間の混合ジスルフィドなど、様々な物質を基質として還元することが近年報告されている。本研究では、*in vitro*、*in vivo* での Grx による SSC の還元活性を検証することで、Grx の機能解析も行った。

<SSC を還元する可能性のある Trx>

大腸菌には Trx1, 2 という 2 つの Trx が存在している。Trx は Grx よりも先に発見された還元酵素で、Grx 同様に活性部位には-CGPC-というモチーフが存在し、この Cys 残基により基質を還元する。Trx も基質を還元すると同時に酸化されるが、NADPH を消費して Trx レダクターゼにより再還元される。本研究では、NrdH は Trx レダクターゼにより再還元されることがすでに報告されていたので、NrdH の SSC 還元活性を Trx1, 2 と共に確認した (Jordan *et al.*, 1997)。さらに Grx と Trx の機能には類似している点が多く、Trx も PAPS 還元酵素の還元や、リボヌクレオチド還元酵素の還元、タンパク質のジスルフィド結合の還元を担っており、SSC を還元できる可能性が高いと考えた。

<二重欠損株ライブラリーを用いたチオ硫酸経路関連遺伝子の探索>

大腸菌の非必須一遺伝子欠損株ライブラリー Keio collection を活用し、大腸菌の全非必須遺伝子の中からチオ硫酸経路に関わる遺伝子を網羅的に探索する。具体的には、硫酸経路の CysK をコードする *cysK* 遺伝子の欠損株 ($\Delta cysK$) と Keio collection の各株を接合させることで、二重欠損株ライブラリーを構築する。次に、この構築したライブラリーの中で、Cys 要求性を示す二重欠損株を探索する。この二重欠損株は、 $\Delta cysK$ 由来の硫酸経路の欠損に加え、Keio collection 由来の遺伝子欠損がチオ硫酸経路上に起きたことで、両方の Cys 生合成経路が機能せず Cys 要求性を示したと考えられる (図 3)。つまり、この Cys 要求性を示す二重欠損株を解析することで、チオ硫酸経路に関わる遺伝子を同定することができると考えた。

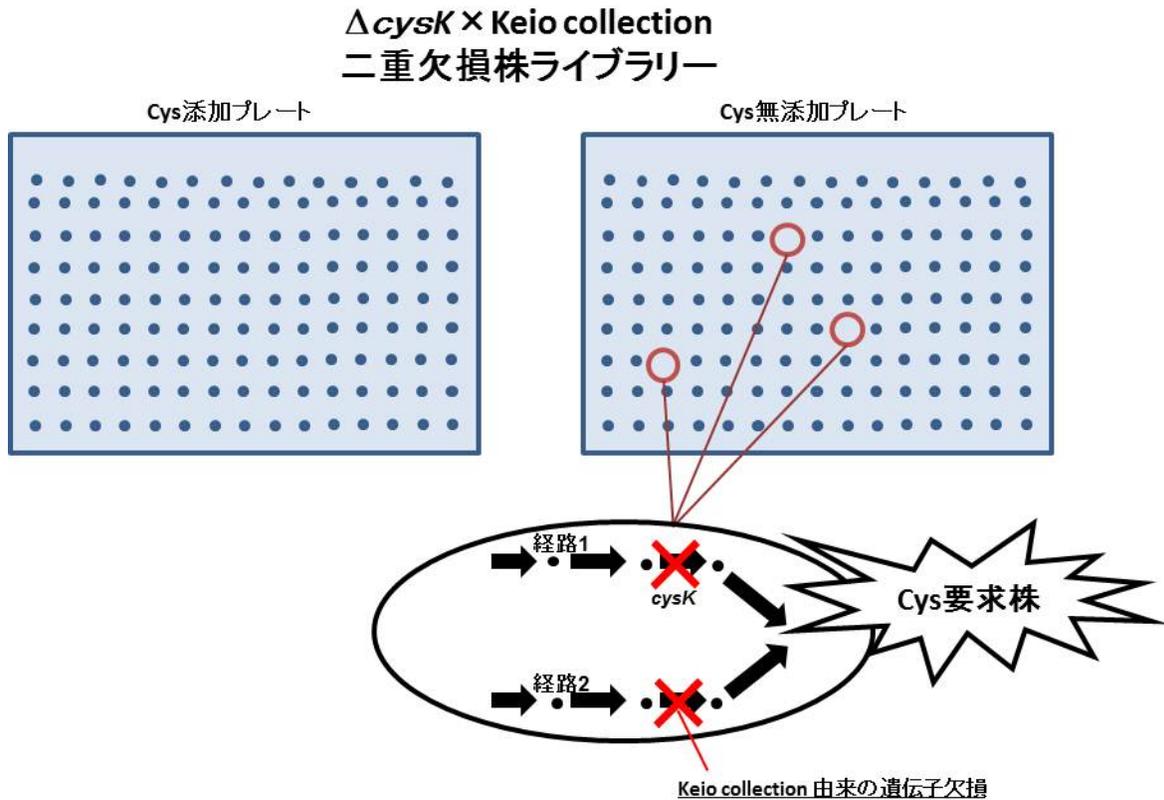


図 3 二重欠損株ライブラリーを用いたチオ硫酸経路関連遺伝子の探索

$\Delta cysK$ 株と Keio collection の各株を接合することで構築した二重欠損株ライブラリーの中で Cys 要求性を示す株は、 $\Delta cysK$ 由来の硫酸経路の欠損に加え、Keio collection 由来の遺伝子欠損がチオ硫酸経路上に起きたことで、両方の Cys 生合成経路が潰れ Cys 要求性を示したと考えられる。つまり、Cys 要求二重欠損株を探索することで、チオ硫酸経路に関わる遺伝子を同定できる。

< Cys 発酵生産菌 >

本論文で述べる Cys 生産菌とは、Cys 生産プラスミド pDES を導入した大腸菌のことを指す。pDES は、内膜の Cys トランスポーター YdeD をコードする *ydeD*、Cys によるフィードバック阻害非感受性変異型 CysE をコードする *cysE*^{T167A}、Ser によるフィードバック阻害非感受性変異型 SerA をコードする *serA*^{410Stop} の 3 つの遺伝子を過剰発現するためのプラスミドである。pDES を導入しなければ、大腸菌は生育に最低限必要な量しか合成せず、Cys が過剰に合成されることはない。pDES を導入した野生株 BW25113 は、培養開始 36 時間後で、培地中 Cys 蓄積量で約 800–900 mg/L、OD₅₆₂ あたりの培地中 Cys 蓄積量で 80–90 mg/L の Cys を生産する。

1-2. 材料と方法

1-2-1. 菌株

本研究で用いた大腸菌の菌株を表 2 に記載する。

また、本実験で用いた各遺伝子欠損株 (Keio collection) は、本学の森 浩禎教授より分譲して頂いた。

表 2 本章で使用した菌株

<i>E. coli</i> strain	Genotype	Reference or source
BW25113	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78}</i>	Baba et al. (2006)
JW2720	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysC::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
JW3582	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysE::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
JW3331	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysG::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
JW2732	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysH::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
JW2733	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysI::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
JW2734	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysJ::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
JW2407	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysK::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
JW2414	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysM::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
JW0833	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} grxA::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
JW1051	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} grxB::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
JW3585	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} grxC::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
JW1646	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} grxD::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
JW3467	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} gor::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
JW5856	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} trxA::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
JW0871	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} trxB::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
JW2566	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} trxC::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
JW2648	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} nrdH::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
JW2663	<i>lac^q rrmB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} gshA::Km^R</i>	Baba et al. (2006)

1-2-2. プラスミド

本研究で用いたプラスミドを表 3 に記載する。

また、本研究で用いたプラスミドクローン (ASKA library) は、本学の森 浩禎教授より分譲して頂いた。

表 3 本章で使用したプラスミド

plasmid	Genotype	Reference or source
pDES	pACYC184 with <i>serA</i> (T410 Stop), <i>ydeD</i> and altered <i>cysE</i> (T167A) genes under the control of the <i>OmpA</i> promoter	Ajinomoto
pCA24N	Cm ^R	Kitagawa et al. (2005)
pcysC	pCA24N, <i>cysC</i> gene on 0.6 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
pcysE	pCA24N, <i>cysE</i> gene on 0.8 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
pcysG	pCA24N, <i>cysG</i> gene on 1.4 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
pcysH	pCA24N, <i>cysH</i> gene on 0.7 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
pcysI	pCA24N, <i>cysI</i> gene on 1.7 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
pcysJ	pCA24N, <i>cysJ</i> gene on 1.8 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
pcysK	pCA24N, <i>cysK</i> gene on 0.9 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
pcysM	pCA24N, <i>cysM</i> gene on 0.9 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
pgrxA	pCA24N, <i>grxA</i> gene on 0.26 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
pgrxB	pCA24N, <i>grxB</i> gene on 0.62 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
pgrxC	pCA24N, <i>grxC</i> gene on 0.25 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
pgrxD	pCA24N, <i>grxD</i> gene on 0.35 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
pgor	pCA24N, <i>gor</i> gene on 1.35 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
ptrxA	pCA24N, <i>trxA</i> gene on 0.33 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
ptrxB	pCA24N, <i>trxB</i> gene on 0.96 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
ptrxC	pCA24N, <i>trxC</i> gene on 0.42 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
pnrhH	pCA24N, <i>nrdH</i> gene on 0.25 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
pcysK-I	pCA24N, <i>cysK</i> , <i>cysI</i> gene on 2.6 kb DNA fragment	This study
pcysK-J	pCA24N, <i>cysK</i> , <i>cysJ</i> gene on 2.7 kb DNA fragment	This study
pcysJ-I	pCA24N, <i>cysJ</i> , <i>cysI</i> gene on 3.5 kb DNA fragment	This study
pcysK-I-nrdH	pCA24N, <i>cysK</i> , <i>cysI</i> , <i>nrdH</i> gene on 3.0 kb DNA fragment	This study

1-2-3. 培地組成

	LB 培地 (1L 中)	L 培地 (1L 中)
Bacto trypton	1 %	1 %
Yeast extract	0.5 %	0.5 %
NaCl	1 %	0.5 %
	pH7.0	pH7.0

SM1 培地 (1L 中)

Potassium phosphate Buffer (pH7.0)	100	mM
NH ₄ Cl	151	mM
NaCl	1.7	mM
MgSO ₄	1.0	mM (注)
CaCl ₂	0.1	mM
FeSO ₄	7.2	μM
Na ₂ MoO ₄	0.6	μM
H ₃ BO ₃	40.4	μM
CoCl ₂	2.9	μM
CuSO ₄	1.0	μM
MnCl ₂	8.1	μM
ZnSO ₄	1.0	μM
Glucose	3	%
L 培地	10	%
Methionine	450	mg/L
Na ₂ S ₂ O ₃	30	mM (注)

(注) Cys 発酵生産の実験に応じて、硫酸マグネシウム、チオ硫酸ナトリウムの濃度は異なり、特に言及しなければ上記の濃度とする。

M9 培地 (1L 中)

Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1 g
Glucose	6 g
1 % Thiamine-HCl	50 μl
	pH7.0

また、特に言及しなければ、前培養、本培養は LB 培地で行ったこととする。上記の各培地は、実験条件に応じて、抗生物質である 30 µg/ml クロラムフェニコール(Cm) , 50 µg/ml カナマイシン (Km), 35 µg/ml ストレプトマイシン (Sm), 10 µg/ml テトラサイクリン (Tet) (二重欠損株ライブラリーの構築に関する実験では、25 µg/ml Cm , 25 µg/ml Km とする) を添加して行った。固形培地では、1.5%寒天を添加した。

1-2-4. プライマー

本研究で用いたプライマーを表 4 に示す。

表 4 本章で使用したプライマー

Primer name	sequence
①ASKA Not1-F32	ttcgtcgcggccgcgaaatcataaaaaatt
②ASKA Not1-R23	aacaatccagatggagtctga
③ASKA Xho1-F30	cgtcttcacctgcgagaaatcataaaaaatt
④ASKA Xho1-R30	tatcaactcgagtccaagctcagctaatta

1-2-5. 薄層クロマトグラフィーによる SSC の非酵素的還元の見証

SSC が GSH により、非酵素的に還元されるかを薄層クロマトグラフィー (TLC) により確認を行った。まずマイクロチューブ内で、10 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8), 10 mM SSC (SIGMA-ALDRICH 社), を混合した反応液に、10 mM GSH もしくは、10 mM ジチオトスレイトール (DTT)-20 mM Tris-HCl を添加し、室温で 30 分反応させた。

シリカゲル 60F₂₅₄TLC プレート (Merck 社) の底辺から 1.5cm の高さに、10 mM Cys, 10 mM シスチン, 10 mM GSH, 10 mM GSSG, 10 mM SSC を標品として、また反応液をそれぞれ 5 µl ずつスポットした。スポットが乾いたことを確認して、展開溶媒 (フェノール : 水 = 4 : 1) を注いだ展開槽で各サンプルを展開した。Gaitonde 試薬 10 ml (250 mg ニンヒドリン, 6 ml 酢酸, 4 ml 塩酸) を作成し、展開後 TLC プレートに散布し、ドライヤーにより加熱し発色させた。

1-2-6. 酵素タンパク質の精製

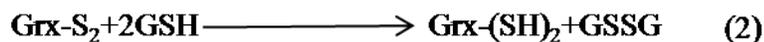
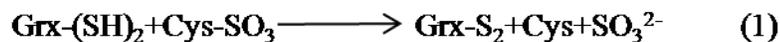
in vitro における Grx 及び Trx の SSC を基質とした時の還元活性を調べるために、各酵素の精製を行った。各酵素は、ASKA library の各プラスミドクローンを培養し、集菌、破碎後、各タンパク質に付加されている HisTag を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

具体的には、各酵素の遺伝子をもつプラスミドクローンを LB+30 $\mu\text{g/ml}$ Cm、37°Cで定常期まで前培養を行い、同培地に 1%植菌し 30°Cで本培養を開始した。OD₆₆₀=0.6 に達した時点で、終濃度 0.1 mM となるようイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) を添加し酵素タンパク質の発現誘導を行い、3 時間培養後、集菌した。集菌した菌体は PBS で洗浄し、結合バッファー (20 mM リン酸ナトリウム, 0.5 M 塩化ナトリウム, 40 mM イミダゾール) を培養スケールの 1/10 量加え、懸濁し SONIFIER 450 (BRANSON 社製) により超音波破碎した。菌体破碎液を遠心分離し、可溶性、不溶性画分に分けた。得られた可溶性画分を HisTrap HP (GE Healthcare 社) に通しカラムに吸着させた。さらに、上記の結合バッファーにより洗浄後、溶出バッファー (20 mM リン酸ナトリウム, 0.5 M 塩化ナトリウム, 0.5 M イミダゾール) により、1 ml を 1 フラクションとし溶出した。各フラクションのタンパク質濃度を Protein Assay Kit (BIO-RAD 社) により測定し、明らかにタンパク質濃度の高いフラクション 2 を精製酵素サンプルとした。得られた酵素の精製度については、SDS-PAGE により確認を行った。

1-2-7. Grx による SSC の還元活性の測定

Grx の活性は既存の方法に従って測定した (Holmgren *et al.*, 1995)。Grx が基質を還元する反応には、ジチオール反応とモノチオール反応の 2 種類が存在する。ジチオール反応は、活性部位の Cys 残基を 2 つ利用して SSC を還元した後、酸化されて生成したジスルフィド結合が GSH により再還元され、生じた GSSG を NADPH の還元力を用いて GSH レダクターゼが還元し、一連の反応が完結する。モノチオール反応は、まず GSH により SSC が非酵素的に還元され亜硫酸イオンが生じ、GSH と Cys の混合ジスルフィドが形成されることにより始まる (次ページ図、反応(1))。次に、この混合ジスルフィドを Grx が還元し、Cys が生じると同時に一時的に Grx と GSH の混合ジスルフィドが形成されるが、別の GSH により還元されることで Grx は再還元され、GSSG が生じる。生じた GSSG は GSH レダクターゼにより NADPH の還元力を用いて還元され、二分子の GSH ができる。以上が Grx による SSC の還元反応機構である。どちらの反応の還元活性も、A₃₄₀ に吸光を示す NADPH の減少量をもとに測定している。

ジチオール反応



モノチオール反応



注) Cys-SO₃ は SSC を意味する。

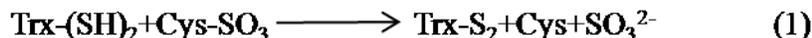
具体的には、0.1 M Tris-HCl(pH8.0), 0.16 mM NADPH (ナカライテスク社), 0.1 mg/L ウシ血清アルブミン, 5.9 μg/ml Yeast GSH レダクターゼ (SIGMA-ALDRICH 社), 50 μM SSC (SIGMA-ALDRICH 社) を含む反応液に、0.5 mM GSH (SIGMA-ALDRICH 社) 添加、混合し、DU800 (Beckman Coulter 社製) により A₃₄₀ の測定を開始した。1 分後 (この間、図の反応(1)が起こる)、精製した任意の濃度の Grx を添加し、さらに 3 分間 A₃₄₀ から NADPH の減少量を測定した。

酵素活性 1 unit とは、1 分あたりに 1 μmol の NADPH が消費されることと定義されており、 $(\Delta A_{340} \times V) / (\text{min} \times 6.2)$ により算出できる (V: セル内の反応液の量 ml, 6.2: NADPH のモル吸光係数)。ΔA₃₄₀ は、基質が十分存在する Grx 添加後 1 分間の傾きより算出した。

1-2-8. Trx による SSC の還元の確認

Trx の活性測定は、Holmgren *et al.* (1979) の手法に従って行った。この反応の第一段階は、還元型の Trx (Trx-(SH)₂) が SSC を還元し、Cys と亜硫酸イオンが生じると同時に Trx が酸化される (Trx-S₂) 反応である。第二段階は、酸化型の

Trx が Trx レダクターゼにより NADPH の還元力を用いて再還元されることで完了する。Trx の活性も Grx 同様に、NADPH の消費量から測定することができる。



Trx による SSC の還元の確認は、0.1 M リン酸カリウム, 2 mM EDTA, 0.32 mM NADPH, 20 mM SSC, 0.2 μM 精製 Trx レダクターゼを含む反応液に各 Trx を添加することで行った。今回は、Trx を添加していないコントロールのサンプル、及び各 Trx を加えたサンプルを 30 分間 30°C で反応させた。反応後の各サンプルをアミノ酸アナライザー JLC500 (日本電子社製) の測定プログラム P-110 を用いて、Cys が合成されているかを確認した。

1-2-9. Cys の発酵生産

Cys の発酵生産を行う菌株には、予め Cys 生産用プラスミド pDES を導入した (Cys 生産性を確認した菌株には、全て pDES が導入されている)。この Cys 生産性を確認したい菌株を LB+Tet (導入したプラスミドに応じて、さらに抗生物質を加える) 培地に植菌し、30°C で 18~22 時間、定常期まで前培養を行った。定常期の培養液の OD₆₆₀ を測定し、OD₆₆₀=0.4→1% シードとして 30 ml SM1+Tet 培地 (必要に応じて抗生物質を添加) に植菌した。植菌後、Cys と同時に合成される酢酸による pH 低下を防ぐために、0.6 g の炭酸カルシウムを添加した。チオ硫酸経路の効果を調べたい場合は硫黄源をチオ硫酸ナトリウムとし、培養後 6, 12, 24 時間目に 10 mM チオ硫酸ナトリウムを添加した。硫酸経路の効果を調べたい場合は、硫黄源を硫酸マグネシウムとして 6, 12 時間目に 10 mM 硫酸マグネシウムを添加した。pCA24N に連結した遺伝子の過剰発現を行う場合は、これらの遺伝子は *lac* プロモーター制御下にあるため、6, 24 時間目に 0.1 mM IPTG を添加し、発現誘導を行った。培養後 12 時間おきに、600 μl ずつサンプリングを行った。各サンプル 40 μl を 0.1N 塩酸 1 ml に懸濁後 OD₅₆₂ を測定し、生育度を確認した (培地中に含まれる炭酸カルシウムを溶解させるため)。残りのサンプルは 12,000 rpm で遠心分離後、培地上清を回収し、酸性ニンヒドリン法 (Gaitonde *et al.*, 1967) を用いて Cys の生産量を測定した。培養上清のサンプル 50 μl を 10 mM DTT (pH8.6) 50 μl と 10 分間反応させ、酢酸 100 μl、12 N 塩酸 100 μl を加えて攪拌後、105°C で 20 分間加

熱した。冷却し、エタノール 1.5 ml を加えた後、OD₅₆₀ を測定し、予め作製した Cys の検量線より Cys 生産量を算出した。

1-2-10. *pcysK-I*, *pcysK-J*, *pcysJ-I*, *pcysK-I-nrdH* の構築

ASKA Library 由来の *pcysI*, *pcysJ* をテンプレートに、プライマー①、②を用いてそれぞれ PCR によって増幅した。得られた *cysI*, *cysJ* の PCR 産物を *pcysK* の *Not* I 認識部位に、*cysI* の PCR 産物を *pcysJ* の *Not* I 認識部位にそれぞれ連結し、*pcysK-I*, *pcysK-J*, *pcysJ-I* を構築した。さらに、*pnrnH* をテンプレートにプライマー③、④を用いて増幅した *nrdH* の PCR 産物を構築した *pcysK-I* の *Xho* I 認識部位に連結することで、*pcysK-I-nrdH* を構築した。

1-2-11. $\Delta cysK\Delta cysM$ 二重欠損株の構築

$\Delta cysK\Delta cysM$ 二重欠損株の構築は、Datsunoko *et al.* (2000) 及び Baba *et al.* (2006) らの方法に従って行った。 $\Delta cysK$ 株 (*cysK* ::Cm^R) に、*cysM* 遺伝子との相同配列とカナマイシン耐性遺伝子 (Km^R) を含む PCR 産物を導入し、*cysM* 遺伝子領域を破壊し、 $\Delta cysK\Delta cysM$ 二重欠損株を構築した。

1-2-12. Cys 要求性二重欠損株のスクリーニング

1-2-12-1. High frequency of recombination $\Delta cysK$ 株の構築

接合に関わる F 因子を有する Chromosome Integration Plasmids (CIPs) が導入された菌株 (CIP 株) と $\Delta cysK$ 株とを接合させ、F 因子を $\Delta cysK$ 株に導入した (図 4)。また、構築した Hfr $\Delta cysK$ 株は、接合、CIP の移動に影響を与えない $\Delta araC$ 株と接合させ、接合効率を確認した。以上の Hfr $\Delta cysK$ 株の構築は、本学生体情報学講座の船岡 (2009) の方法に従った。

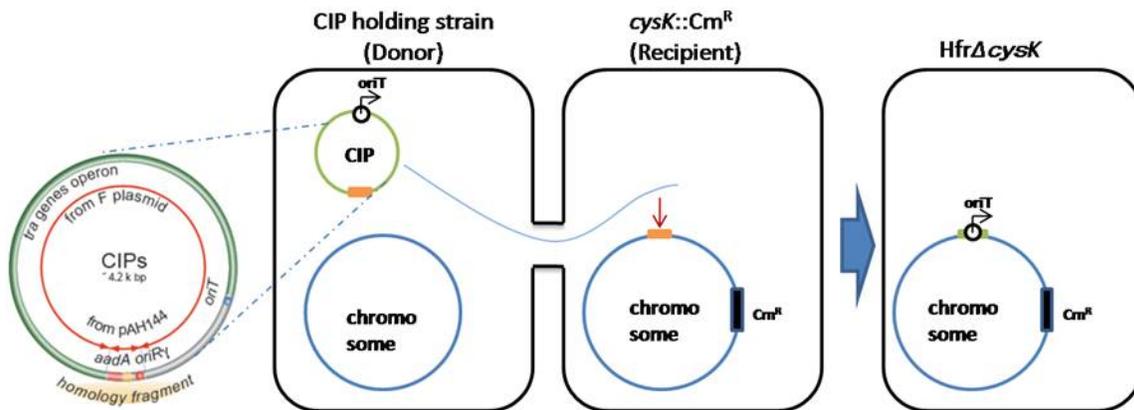


図 4 $\Delta cysK$ 株の High frequency of recombination (Hfr) 化

$\Delta cysK$ 株の Hfr 化は、CIP 保有株と $\Delta cysK$ 株を接合させることで、接合に必要な遺伝子群を $\Delta cysK$ 株のゲノム領域に導入する。CIP は、F 因子由来の *oriT* (伝達開始領域、origin of Transfer) と *tra* 遺伝子群、(伝達に必要なタンパク質をコードする) R プラスミド由来の *oriRg* 複製起点と、ストレプトマイシン耐性遺伝子をもつプラスミド。

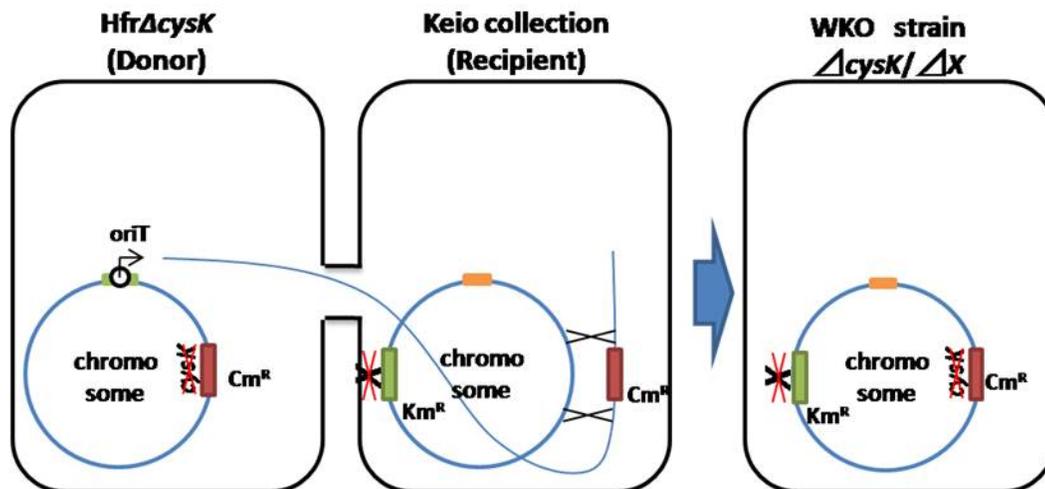


図 5 $\Delta cysK$ 株 × Keio collection 二重欠損株ライブラリー

Hfr $\Delta cysK$ 株と Keio collection の各株を接合させることで、二重欠損株 (DKO) ライブラリーを構築する。

1-2-12-2. 接合による二重欠損株ライブラリー構築と Cys 要求株の解析

構築した Hfr Δ cysK 株と Keio collection の各株を M9、M9+5 mM シスチンプレート上で接合することで、cysK 遺伝子欠損領域を Keio collection 株に伝達、相同組み換えさせ、Keio collection 株の cysK 遺伝子を欠損させた (図 5, 6)。この接合は、実験ロボット BiomekFX (Beckman Coulter 社製) と 384 ピン :FP-4 (V&P Scientific 社製) を利用した自動化システムにより、各プレートにコロニーをスタンプすることで行った。Mating は LB (薬剤なし) プレート、1st セレクション、2nd セレクションは M9 (Cm, Km) もしくは、M9+5 mM シスチン (Cm, Km) でそれぞれ行った。

また構築したライブラリーを、37°C で培養し、プレートの画像を 30 分おきに 48 時間、スキャナー GT-8700F (EPSON 社製)、LED ビュアー A4 プロ (富士フィルムイメージング社製) により撮影し、コロニーの大きさ及び、厚さを測定し、生育度を評価した。画像解析については、python program を用いた。以上の二重欠損株ライブラリー構築は、本学、生体情報学講座の草田 (2008) の方法に従った。

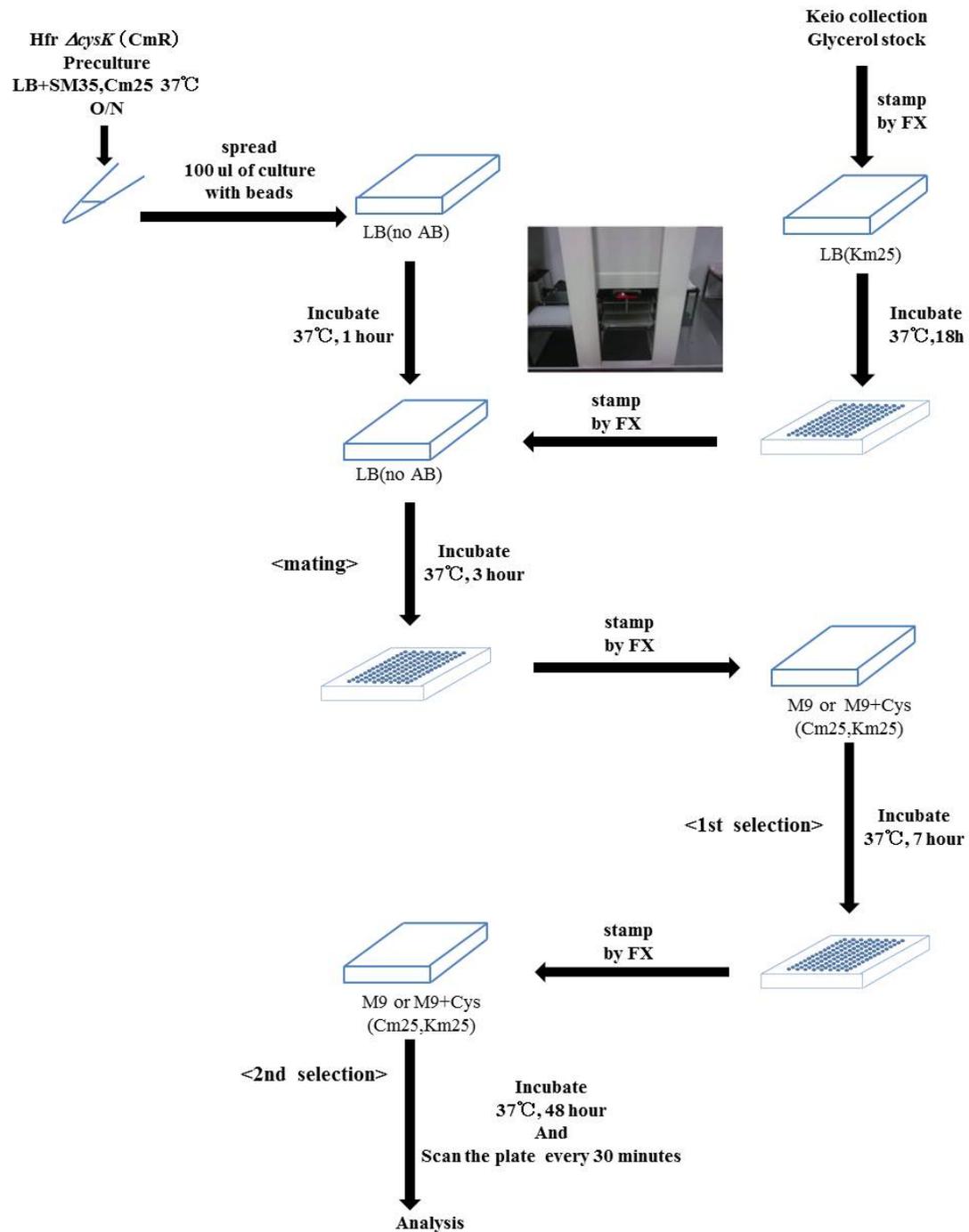


図 6 二重欠損株ライブラリーの構築

Hfr $\Delta cysK$ 株と Keio collection の各株を接合させることで、二重欠損株ライブラリーを構築する。

1-3. 結果

1-3-1. GSH（非酵素的反応）による SSC の還元

本研究の目的は、SSC から Cys への変換を促進する酵素を同定し、Cys 発酵生産への応用を試みることである。しかし、これまでに SSC から Cys の変換は細胞質内に豊富に存在する GSH（約 10 mM）により行われる可能性が指摘されている（Michael *et al.*, 2005）。

そこで、まず *in vitro* で GSH により SSC が Cys へ非酵素的に還元されるのかを確認した。10 mM GSH と 10 mM SSC、さらにコントロールとして 10 mM GSH と 10 mM DTT を室温で 30 分間反応させ、TLC プレートにスポットし、展開溶媒（フェノール：水=4：1）により展開した（図 7）。その結果、10mM DTT により SSC が完全に Cys へと還元されたのに対し、10 mM GSH では一部が Cys へと還元されたものの、大部分は還元されなかった（図 7）。以上の結果より、細胞内に存在し得る GSH 濃度（数 mM）レベルでは、SSC から Cys への変換は十分とは考えられない。従って、何らかの酵素によりこの反応が促進されると考えられる。もし、そのような酵素が存在するならば、その過剰発現により Cys 生産性の向上が期待できる。以降の実験では、この変換を触媒し、Cys 生産性の向上に有効な酵素の探索を行った。

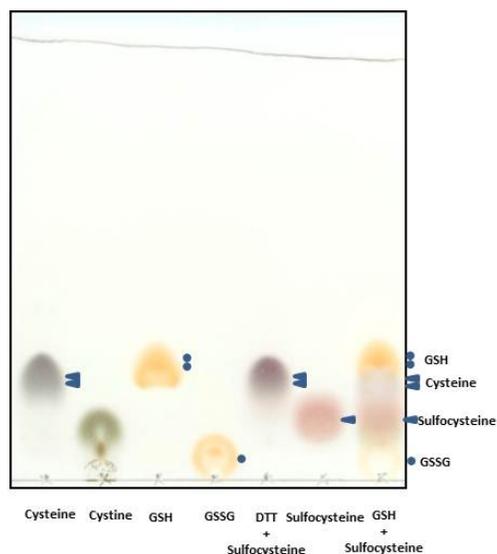


図 7 GSH による SSC から Cys への還元

10 mM GSH と 10 mM SSC もしくは、10 mM DTT を室温で 30 分反応させ、TLC プレートにスポットし、展開溶媒（フェノール：水=4：1）により展開した。コントロールである Cys, シスチン, GSH, GSSG（酸化型 GSH）, SSC は各 10 mM ずつスポットした。発色は Gaitonde 試薬（酸性ニンヒドリン反応）により行った。

1-3-2.還元酵素による SSC から Cys の合成

次に、これまでの報告から SSC から Cys の変換に関与する可能性のある 7 種類の還元酵素 (Grx1, 2, 3, 4, Trx1, 2, NrdH) について、Cys 発酵生産への有用性を評価した。

1-3-2-1. Grx1, 2, 3 による SSC から Cys への還元 (*in vitro*)

まず候補に挙げた 7 種類の還元酵素が SSC を Cys へ還元する活性があるかを *in vitro* で調べた。ASKA library 由来の各還元酵素遺伝子を組み込んだ発現プラスミドを大腸菌 AG1 株に導入し、His タグが付加された各酵素を過剰発現後、集菌、破碎し、ニッケルカラムにより精製した。次に精製した Grx による SSC から Cys への還元活性について検証した。Grx の活性は基質を還元後、再還元される際に働く GSH レダクターゼが消費する NADPH 量を A₃₄₀ で追跡することで測定した。まず、GSH、基質である SSC、NADPH を含む反応液に GSH レダクターゼを添加し A₃₄₀ の測定を開始した。2 分後、各種還元酵素 Grx1, 2, 3 をそれぞれ添加し、さらに 3 分間 A₃₄₀ を測定した (図 8-A)。Grx 添加前の 2 分間での A₃₄₀ の減少は、GSH による SSC の非酵素的還元によるものであり、図 7 で観察された結果とよく一致している。各 Grx1, 2, 3 添加後の 3 分間では、酵素添加無しのコントロールと比較し、急激な A₃₄₀ の減少が見られた。興味深いことに Grx2 の活性は Grx1, 3 に比べ約 3.5 倍高いことが示された (図 8-B)。反応終了後に最終産物としての Cys が生成していることをアミノ酸アナライザーにより確認した。以上の結果から、Grx1, 2, 3 は SSC を Cys へ還元することが明らかとなった。

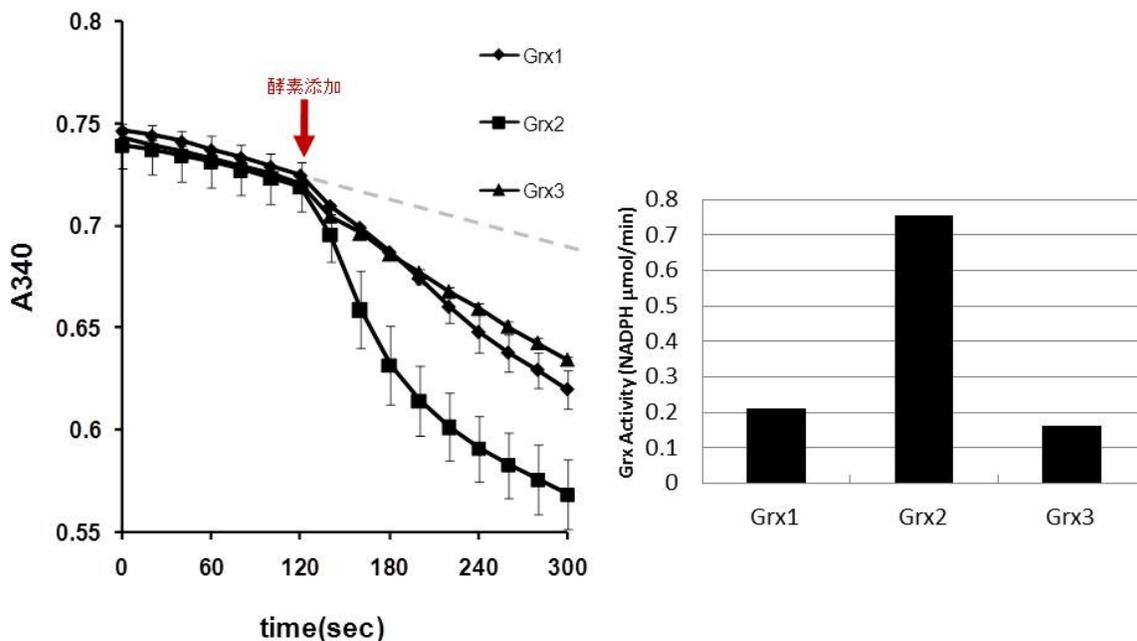


図 8 Grx1,2,3 による SSC から Cys への還元

0.1 M Tris-HCl(pH8.0), 0.16 mM NADPH, 0.1 mg/L BSA, 5.9 μg/ml Yeast GSH レダクターゼ, 50 μM SSC を含む反応液に、0.5 mM GSH 添加、混合し、DU800 (Beckman Coulter 社製) により A₃₄₀ の測定を開始。1 分後、精製した任意の濃度の Grx を添加し、さらに 3 分間 A₃₄₀ から NADPH の減少量を測定した。

1-3-2-2. Trx1, 2, NrdH, Grx4 による SSC から Cys への還元 (in vitro)

Trx1, 2, NrdH, Grx4 も 3.2.1 と同様に精製し、GSH レダクターゼの代わりに Trx レダクターゼを用いて SSC から Cys への還元活性を調べた。なお Grx4 は GSH レダクターゼではなく、Trx レダクターゼによって再還元されることがすでに報告されていたため、本項で Trx 等と共に調べることにした。Trx レダクターゼ、NADPH、SSC を含む反応液に、各酵素 Trx1, 2, NrdH, Grx4 をそれぞれ添加し、30°C で 30 分間反応させた。生成される Cys をアミノ酸アナライザーにより定量することで、各種酵素の SSC から Cys への還元活性の有無を評価した。なおアミノ酸の分離に用いる分離液 (pH2.0) では、Cys は容易にシスチンに酸化されるため、実際にはシスチンを検出した。その結果、酵素添加無し (コントロール) では Cys およびシスチンがともに生成されなかった。一方、Trx1, 2, NrdH を加えたサンプルでは保持時間 53.8 分付近にシスチンのピークが確認できたことから、Cys が合成されたものと考えられた (図 9)。また、Grx4 の添加では、Cys およびシスチンいずれのピークも確認することができなかった。コントロール、Grx4 の反応液で確認できるシスチンの微小なピークは、SSC の標品を解析した際にも確認でき

る。このピークは、SSC の標品中に含まれる Cys のピークであると考えられる。以上の結果から、Trx1, 2 及び NrdH は SSC を還元し、Cys を生成することが明らかとなった。

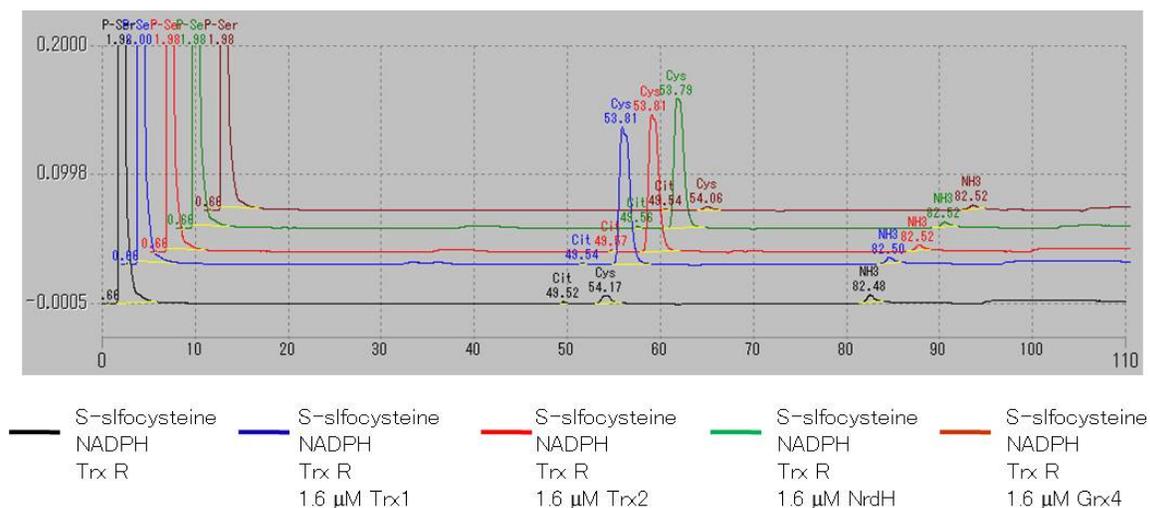


図 9 Trx1,2, NrdH, Grx4 による SSC から Cys への還元

0.1 M Potassium Phosphate, 2 mM EDTA, 0.32 mM NADPH, 20 mM SSC, 0.2 μM 精製 Trx レダクターゼを含む反応液に各 1.6 μM 酵素を添加し、30℃で 30 分反応させた。反応液をアミノ酸アナライザーにかけ、Cys が合成されているかを確認した。

1-3-2-3. 各還元酵素過剰発現株の Cys 発酵生産

候補に挙げた 7 種の還元酵素の内、Grx4 を除く 6 種が SSC を Cys へ還元できることが示された。これらの還元酵素および、これらの酵素の再還元に働く GSH レダクターゼと Trx レダクターゼを Cys 生産菌株で過剰発現することで発酵生産への効果を評価した。その際、硫黄源にチオ硫酸ナトリウムを用いることで積極的にチオ硫酸経路を利用して Cys を生産させた。その結果、Grx1 と NrdH を過剰発現した Cys 生産菌株は、OD₅₆₂あたりの Cys 蓄積量が、空ベクター pCA24N を導入した Cys 生産菌株（コントロール）に比べて、それぞれ約 10%、25%増加した（図 10-C）。他の還元酵素は生産量に効果はなく、むしろ生産量がコントロールに比べて低下した。また、GSH レダクターゼと Trx レダクターゼの過剰発現株は、コントロールに比べて生育が悪く、Cys 蓄積量も大きく低下した（図 10-A, B, C）。以上の結果から、Grx1 と NrdH の過剰発現は、Cys 生産性の向上に寄与することが明らかとなった。

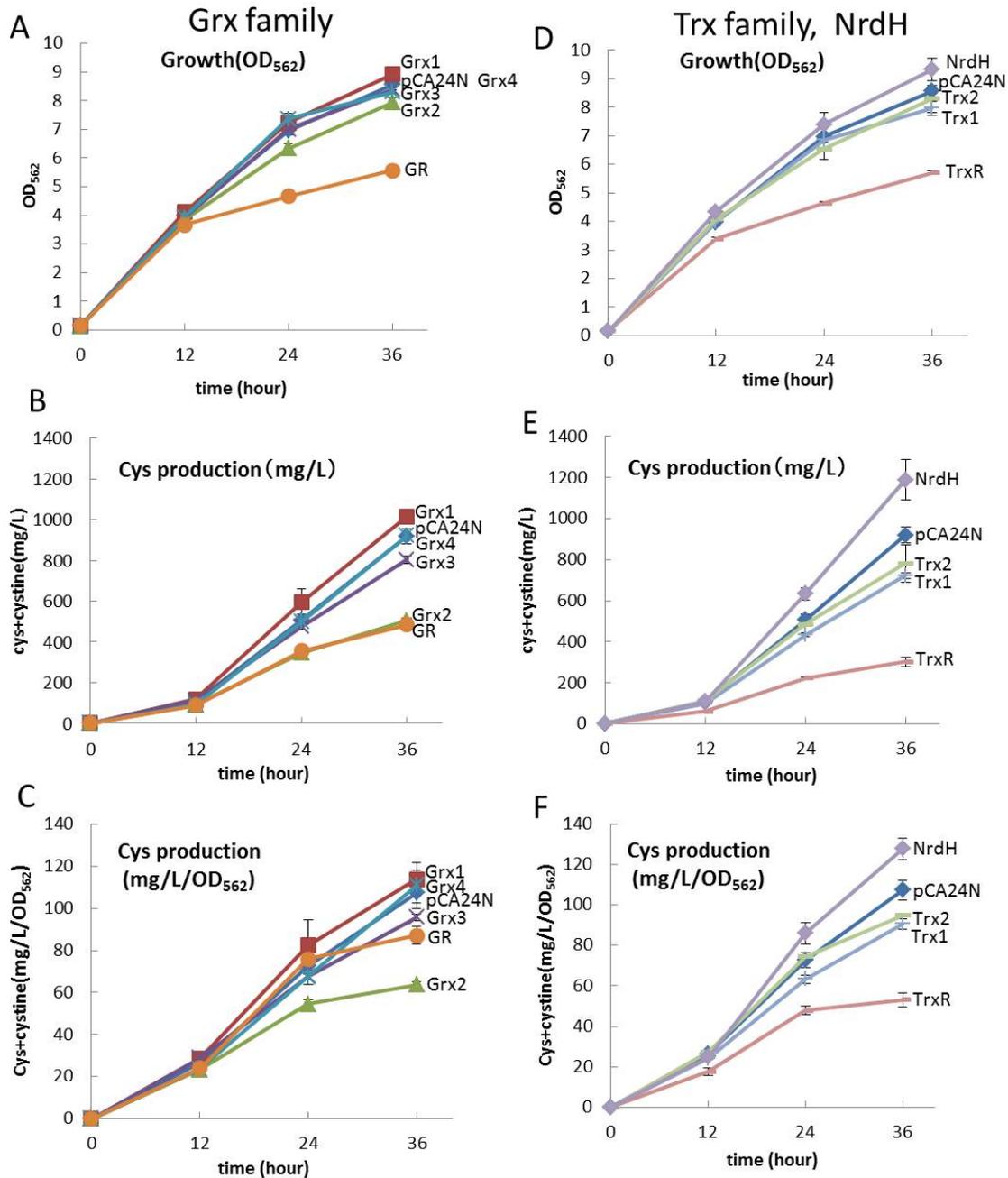


図 10 還元酵素の過剰発現株における Cys 発酵生産 (硫黄源: チオ硫酸ナトリウム)

各菌株には、Cys 生産プラスミド pDES、及び各還元酵素過剰発現プラスミドを導入した。pCA24N は ORF を含まない空ベクターである。定常期まで培養した前培養液を SM1+炭酸カルシウム培地に 1%植菌後、6, 12, 24 時間目に 10 mM チオ硫酸ナトリウムを添加し、6, 24 時間目に 0.1 mM IPTG により発現誘導を行った。サンプリングは培養後 12 時間おきに、600 μ l ずつ行い、生育と培地中の Cys 蓄積量を測定した。A, B, C は Grx family、D, E, F は Trx family を過剰発現した際の結果。A, D は生育曲線、B, E は培地中の Cys 蓄積量、C, F は OD₅₆₂ あたりの培地中 Cys 蓄積量を示した結果である。S 源は 30 mM チオ硫酸ナトリウム、1 mM 硫酸マグネシウムである。

1-3-2-4. *in vivo* における Grx1, NrdH による SSC 還元 の 検 証

Grx1, NrdH の過剰発現による Cys 生産性の向上が、SSC から Cys への還元反応の促進によるものかを確認するために、 $\Delta cysM$ 株または $\Delta cysK$ 株に Grx1 または NrdH をそれぞれ過剰発現し、Cys 生産性に与える影響について調べた。その結果、培養 36 時間で $\Delta cysK$ 株が OD₅₆₂ あたり 16 mg/L 培地中に Cys を生産したのに対し、Grx1 または NrdH を過剰発現している $\Delta cysK$ 株では、それぞれ、19、25 mg/L 培地中に Cys を生産した (図 11-B)。この結果は 1-3-2-3 の野生株での結果と一致し、Grx1, NrdH の過剰発現による Cys 生産性の向上が見られた。一方、 $\Delta cysM$ 株で Grx1, NrdH を過剰発現した場合、過剰発現していない $\Delta cysM$ 株と比べて生産性に差が見られなかった (図 11-B)。以上の結果から、Grx1, NrdH の過剰発現による生産性向上には、*cysM* がコードする CysM が必要であることが明らかとなった。この実験では、 $\Delta cysM$ 株 (チオ硫酸経路) または $\Delta cysK$ 株 (硫酸経路) のどちらでも Cys 生産が行えるよう、硫黄源として 30 mM チオ硫酸ナトリウムと 20 mM 硫酸マグネシウムの両方を培地に加えた。しかしながら、興味深いことに $\Delta cysM$ 株の培地中の Cys 量は約 20 mg/L 以下とほとんど Cys を生産していなかった。

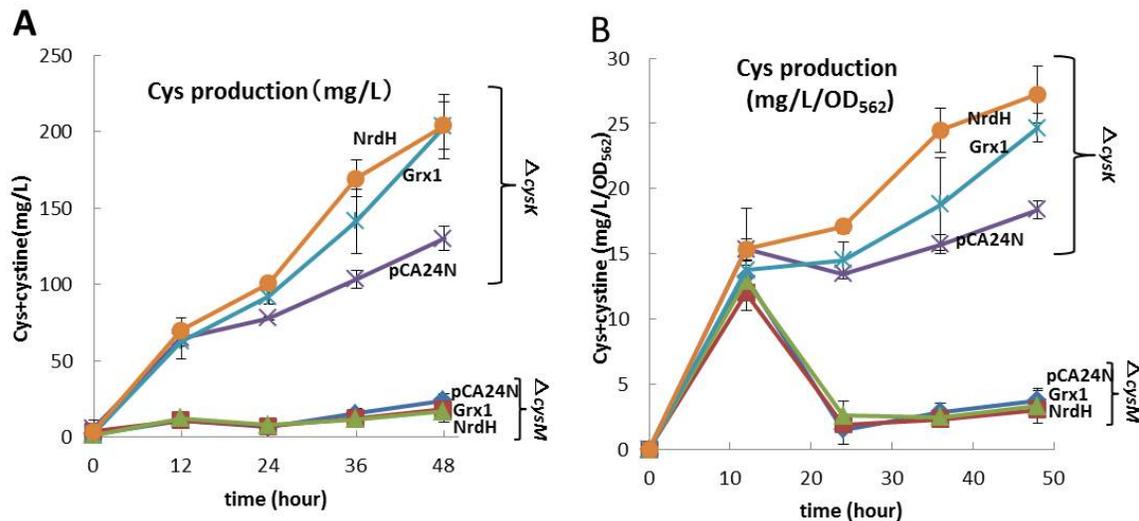


図 11 Grx1, NrdH を過剰発現した $\Delta cysK$, $\Delta cysM$ における Cys 発酵生産 (硫黄源 チオ硫酸ナトリウム + 硫酸マグネシウム)

各菌株は、Cys 生産プラスミド pDES 及び、各還元酵素過剰発現プラスミドを導入。pCA24N は空ベクターである。定常期前培養液を SM1+炭酸カルシウム培地に 1% 植菌後、6, 12, 24 時間目に 10 mM チオ硫酸ナトリウム、6, 12, 24 時間目に 10 mM 硫酸マグネシウムを添加し、6, 24 時間目に 0.1 mM IPTG により発現誘導を行った。サンプリングは培養後 12 時間おきに、600 μ l ずつ行い、生育と培地中の Cys 蓄積量を測定した。A, は培地中の Cys 蓄積量、B は OD₅₆₂ あたりの培地中 Cys 蓄積量を示した結果である。S 源は 30 mM チオ硫酸ナトリウム、20 mM 硫酸マグネシウムである。

1-3-2-5. 亜硫酸イオンリクルート系の検証

以上の結果より、Grx1 または NrdH を過剰発現することで Cys 生産性を向上できることが明らかとなった。これらの還元酵素は 1 分子の SSC を還元し 1 分子の Cys を生成する。その際に生じる 1 分子の亜硫酸イオンが硫酸経路に流れ込み、この亜硫酸イオンを硫黄源として硫酸経路からもう 1 分子の Cys が合成されているのではないかと考えた (図 12-A)。この仮説を検証するために、硫酸経路における亜硫酸イオンの還元に関与する亜硫酸還元酵素 (α subunit : *cysI*, β subunit : *cysJ*) の欠損株を用いて、Cys の生産性に及ぼす影響を検証した (図 12-B)。本 Cys 生産実験は、硫黄源としてチオ硫酸ナトリウムを用いた。その結果、亜硫酸イオンの還元に関わる遺伝子 *cysI*, *cysJ* 及び、その下流で働く遺伝子 *cysK* を破壊した株では、Cys 蓄積量が野生株に比べ、約半分量に低下した (40~60 mg/L) (図 13)。また、硫酸イオン同化経路における亜硫酸イオンより上流で働く *cysC*, *cysH* 欠損株の Cys 蓄積量は、野生株と大きな差はなかった。以上の結果から、SSC から Cys への還元の際、生じた亜硫酸イオンが硫酸経路で利用され、もう 1 分子の Cys が合成されていること強く示唆された。

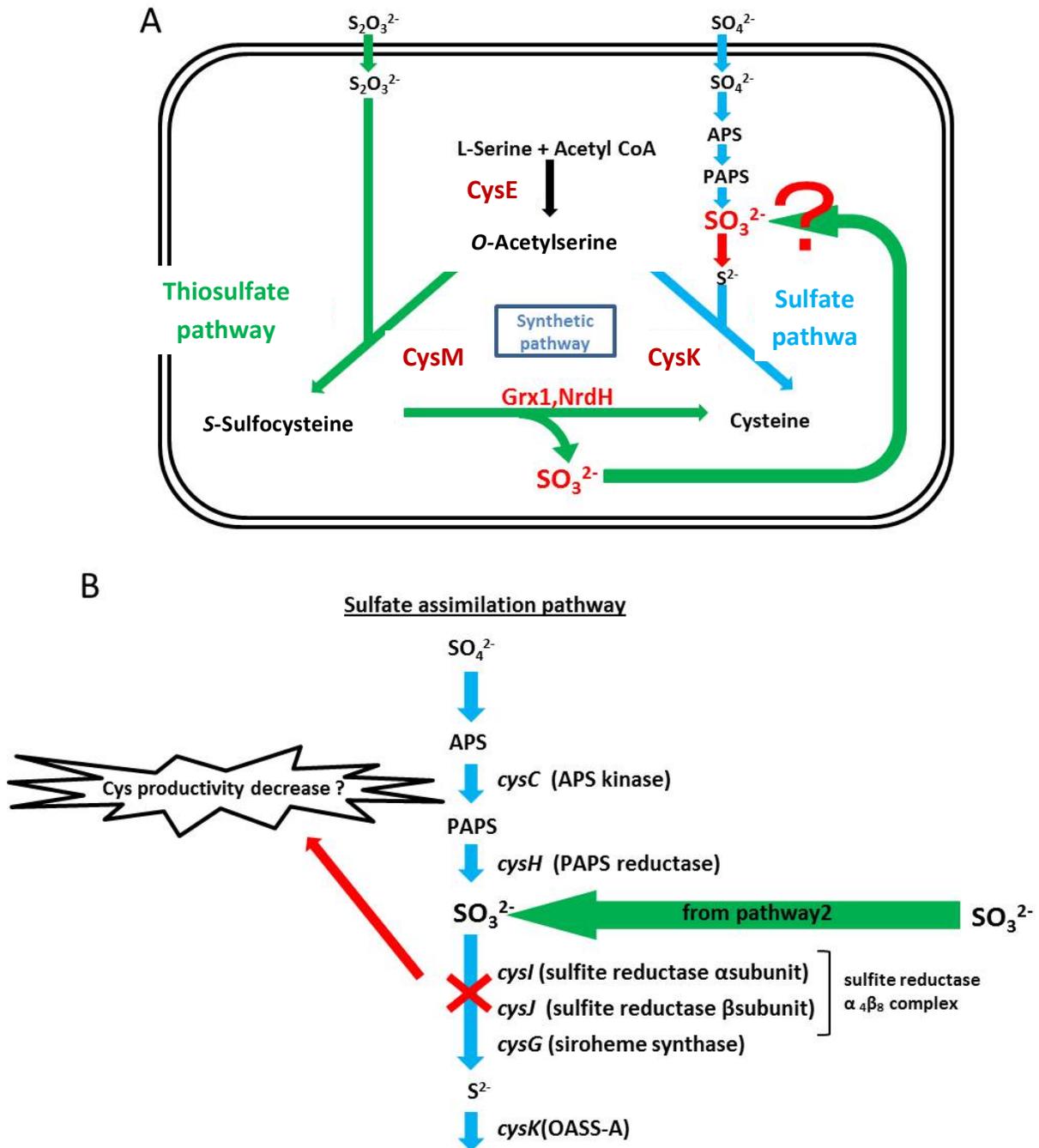


図 12 亜硫酸イオンのリクルートに関するモデル図

A; SSC の還元で生じた亜硫酸イオンが硫酸経路の硫酸イオン同化経路で利用されているという仮説を示す図。
 B; 硫酸イオン同化経路における各タンパク質をコードする遺伝子。

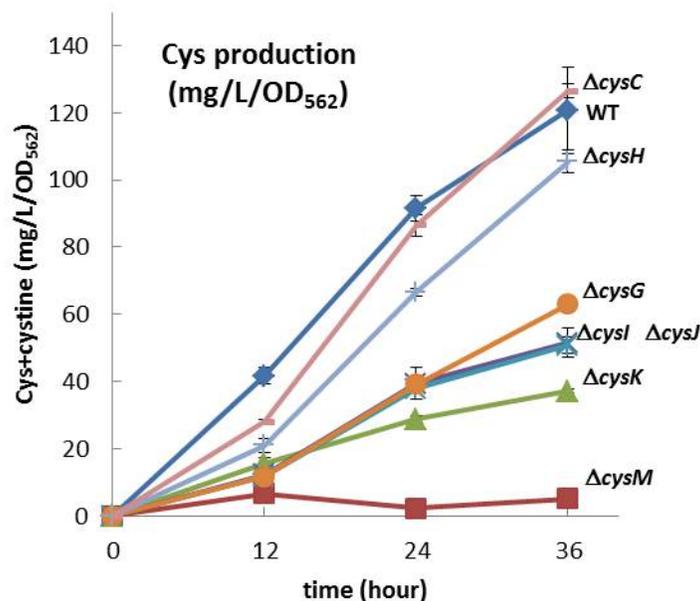


図 13 硫酸イオン同化経路関連遺伝子の欠損株における Cys 発酵生産（硫黄源：チオ硫酸ナトリウム）

野生株 (WT), $\Delta cysC$, $\Delta cysH$, $\Delta cysG$, $\Delta cysI$, $\Delta cysJ$, $\Delta cysK$, or $\Delta cysM$ の各菌株は、Cys 生産プラスミド pDES を導入。定常期前培養液を SM1+炭酸カルシウム培地に 1%植菌後、6, 12, 24 時間目に 10 mM チオ硫酸ナトリウムを添加し、6, 24 時間目に 0.1 mM IPTG により発現誘導を行った。サンプリングは培養後 12 時間おきに、600 μ l ずつ行い、生育と培地中の Cys 蓄積量を測定した。図は OD₅₆₂ あたりの培地中 Cys 蓄積量を示した結果である。硫黄源は 30 mM チオ硫酸ナトリウム、1 mM 硫酸マグネシウムである。

1-3-2-6. 亜硫酸還元酵素の過剰発現株における Cys 発酵生産

次に、亜硫酸イオンの還元に働く亜硫酸還元酵素の過剰発現が Cys 生産性に与える影響について調べた。まず亜硫酸還元酵素をコードする *cysI*, *cysJ*, *CysK* をコードする *cysK* 各遺伝子の単独過剰発現株で、硫黄源をチオ硫酸ナトリウムとして Cys 生産実験を行った。その結果、*cysI*, *cysJ*, *cysK* 各遺伝子の過剰発現株の Cys 蓄積量は、コントロール株を上回ることにはできなかった (図 14-A)。

そこで、2-10 に従って *cysJ-cysI*, *cysK-cysI*, *cysK-cysJ*, の二つの遺伝子をタンデムに連結したプラスミドを構築した。これら二つの遺伝子の共発現が Cys 生産性に与える影響について再度評価した。その結果、*CysJ-CysI* または *CysK-CysJ* を共過剰発現した場合、Cys 生産性は向上しなかった。しかしながら、*CysK-CysI* を共過剰発現した場合、コントロール株に比べ Cys 生産性が向上することが判明した (図 14-B)。最後に、効果が見られた *cysK-cysI-nrdH* の三つの遺伝子をタンデ

ムに連結したプラスミドを保持した菌株についても、Cys 生産性を評価した。その結果、Cys 蓄積量は培養開始 24 時間目まではコントロール株が最も低く、*pcysK-I*、*pnrnH*、*pcysK-I-nrdH* の順で増加していた。*pcysK-I-nrdH* は 24 時間目で約 90 mg の Cys を蓄積しており、*cysK-cysI* と *nrdH* を組み合わせたことによる Cys 生産性への効果が確認できた (図 14-B)。しかし、36 時間目では *pcysK-I-nrdH* のみ Cys 生産性が低下していた。

以上より、*cysI*、*cysJ*、*cysK* の各単独過剰発現株は Cys 生産性に効果はなかったが、*cysK-cysI*、*cysK-cysI-nrdH* の共過剰発現は Cys 生産性を向上させた。

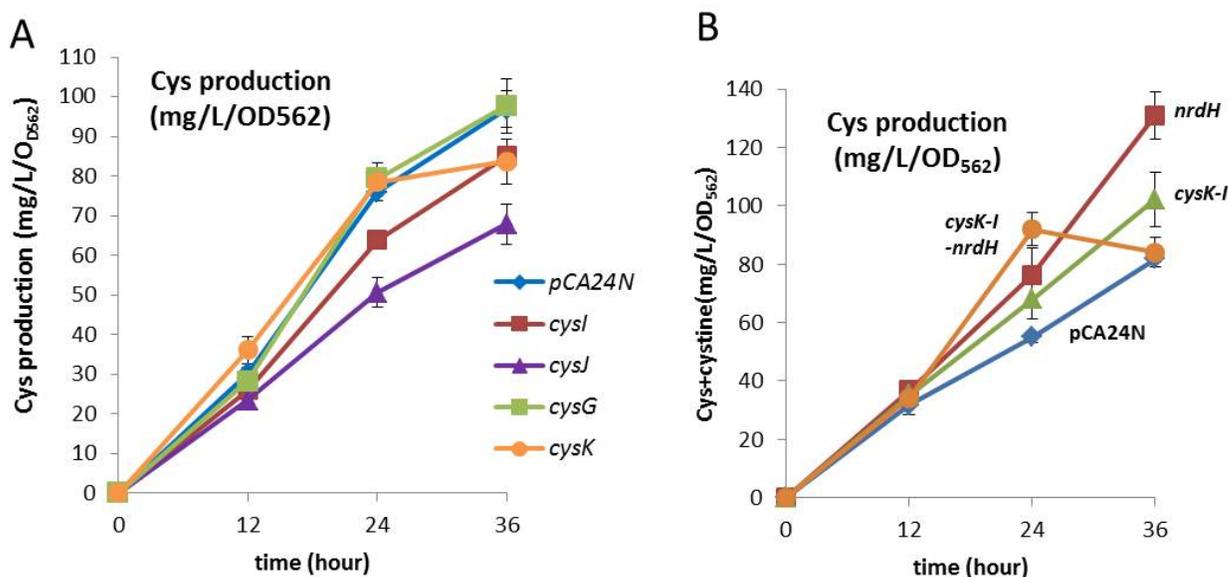


図 14 亜硫酸還元酵素の過剰発現株における Cys 発酵生産 (硫黄源：チオ硫酸ナトリウム)

各菌株は、Cys 生産プラスミド pDES を導入。pCA24N は ORF を含まない空ベクターである。定常期前培養液を SM1+炭酸カルシウム培地に 1%植菌後、6、12、24 時間目に 10 mM チオ硫酸ナトリウムを添加し、6、24 時間目に 0.1 mM IPTG により発現誘導を行った。サンプリングは培養後 12 時間おきに、600 μ l ずつ行い、生育と培地中の Cys 蓄積量を測定した。A は各遺伝子の単独過剰発現株の OD₅₆₂ あたりの培地中 Cys 蓄積量、B は *cysK-cysI*、*cysK-cysI-nrdH* 共過剰発現株の OD₅₆₂ あたりの培地中 Cys 蓄積量を示した結果である。硫黄源は 30 mM チオ硫酸ナトリウム、1 mM 硫酸マグネシウムで Cys 生産実験を行った。

1-3-2-7. 硫酸イオンを単独硫黄源とした時の Cys 発酵生産

チオ硫酸ナトリウムと硫酸マグネシウムを両方を硫黄源として Cys 発酵生産を行った場合、 $\Delta cysM$ 株（硫酸経路により Cys 生産できる）がほとんど Cys を生産していなかった結果（図 11）を考慮して、図 11 で添加した際と同量の 20 mM 硫酸マグネシウムを単独硫黄源とした時の $\Delta cysM$ 株の Cys 生産量を確認した。その結果、pCA24N（空ベクター）を導入した $\Delta cysM$ 株の Cys 蓄積量で 140 mg/L、OD₅₆₂ あたりの Cys 蓄積量で 14 mg/L を越えていた。この結果より、図 11 と等量の硫酸マグネシウムを単独で添加した場合は、チオ硫酸ナトリウムと硫酸マグネシウムの両方を硫黄源とした場合に比べて、 $\Delta cysM$ 株の Cys 蓄積量が約 7 倍、OD₅₆₂ あたりの Cys 蓄積量が約 5 倍にそれぞれ増加した。

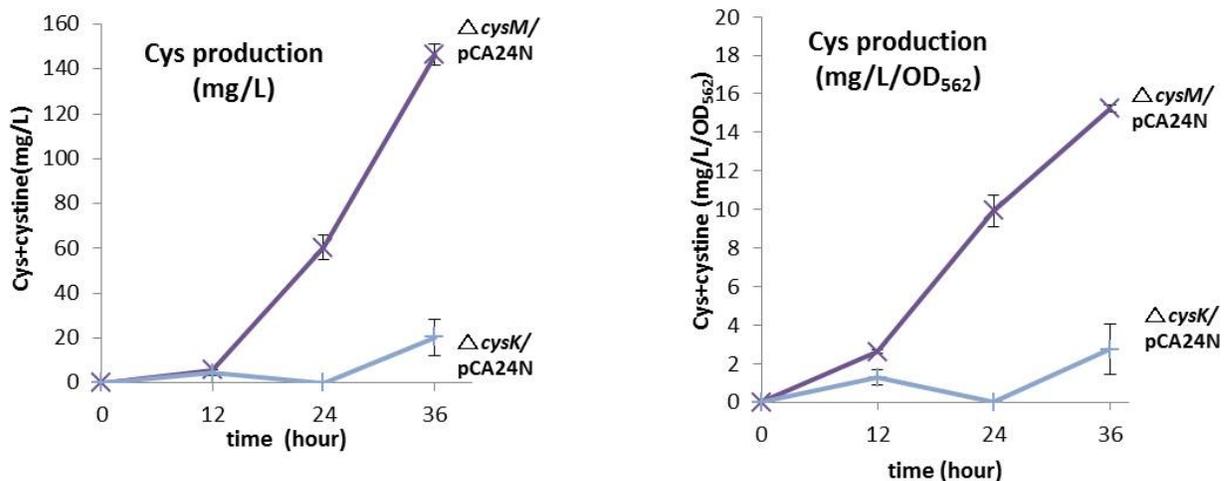


図 15 硫酸マグネシウムを単独硫黄源とした時の Grx1, NrdH を過剰発現した $\Delta cysM$, $\Delta cysK$ における Cys 発酵生産（硫黄源：硫酸マグネシウム）

$\Delta cysM$ 、 $\Delta cysK$ 各菌株は、Cys 生産プラスミド pDES を導入。pCA24N は ORF を含まない空ベクターである。定常期前培養液を SM1+炭酸カルシウム培地に 1%植菌後、6, 12 時間目に 10 mM 硫酸マグネシウムを添加し、6, 24 時間目に 0.1 mM IPTG により発現誘導を行った。サンプリングは培養後 12 時間おきに、600 μ l ずつ行い、生育と培地中の Cys 蓄積量を測定した。A は培地中 Cys 蓄積量、B は OD₅₆₂ あたりの培地中 Cys 蓄積量を示した結果である。硫黄源は 20 mM 硫酸マグネシウムで Cys 生産実験を行った。

1-3-3. 二重欠損株ライブラリーを用いたチオ硫酸経路関連遺伝子の探索

1-3-3-1. $\Delta cysK\Delta cysM$ 二重欠損株の Cys 要求性の確認

SSC から Cys への変換に関わる酵素をコードする遺伝子を同定するために、二重欠損株ライブラリーを用いたスクリーニングを行った。硫酸経路の CysK をコードする *cysK* 遺伝子の欠損株を大腸菌の非必須遺伝子の一遺伝子欠損株ライブラリーである Keio collection と接合させることで、二重欠損株ライブラリーを構築する。この二重欠損株ライブラリーの中で、Cys 要求性を示す菌株は硫酸経路の欠損に加えてチオ硫酸経路が欠損していると考えられる。つまり、二重欠損株ライブラリーの中から Cys 要求株を探索することで、チオ硫酸経路に関わる遺伝子を同定できると考えた (図 3)。

このスクリーニングを行うためには、硫酸経路、チオ硫酸経路の両経路を欠損させた二重欠損株が Cys 要求性を示すことが必須である。これを確認するために、硫酸経路が欠損した $\Delta cysK$ (*cysK::Cm*) 株の *cysM* 遺伝子 (チオ硫酸経路の CysM をコード) をカナマイシン耐性遺伝子で置換することにより、 $\Delta cysK\Delta cysM$ 株を構築した。構築した $\Delta cysK\Delta cysM$ 株とコントロールである野生株、 $\Delta cysE$ 、 $\Delta cysK$ 、 $\Delta cysM$ 各菌株を最少培地である M9、及び M9+シスチンプレートでそれぞれ培養した。その結果、M9+シスチンプレートでは $\Delta cysK\Delta cysM$ 株を含めた全ての菌株が良好に生育できたが、M9 プレートでは $\Delta cysE$ 及び $\Delta cysK\Delta cysM$ 株は生育できなかった (図 16)。以上より、本研究で使用する BW25113 には、硫酸経路、チオ硫酸経路以外に Cys 合成経路が存在せず、二重欠損株ライブラリーを用いたスクリーニングが可能であることが判明した。また、 $\Delta cysE$ 株は OAS を合成できないので、Cys 要求性を示すことは明らかである。

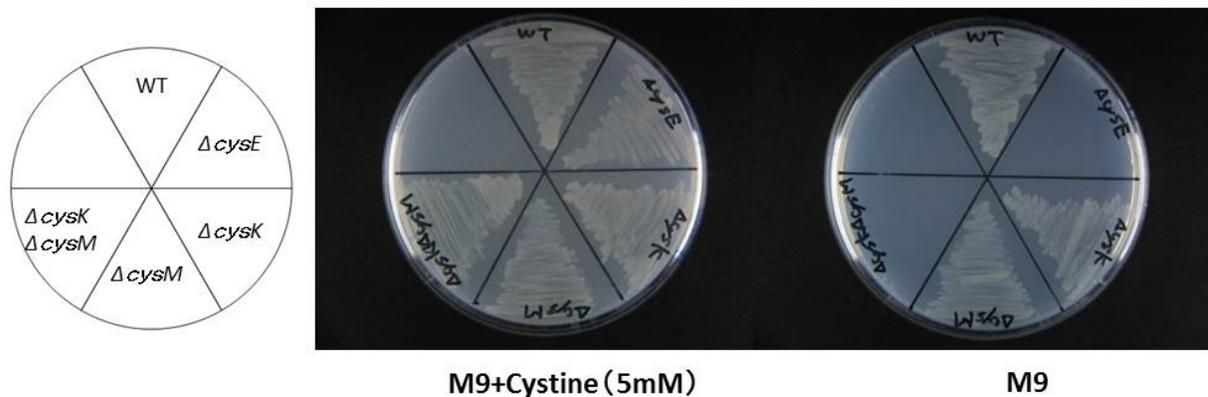


図 16 $\Delta cysK\Delta cysM$ の Cys 要求性

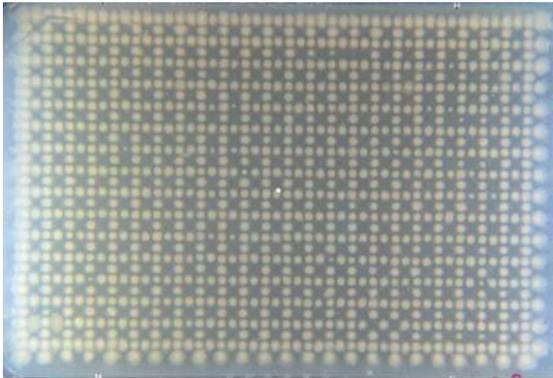
$\Delta cysK\Delta cysM$ および、コントロールである WT (BW25113)、 $\Delta cysE$ 、 $\Delta cysK$ 、 $\Delta cysM$ を 1 mM 硫酸マグネシウム、1 mM チオ硫酸ナトリウム含有 M9 プレート及び、この M9 プレートに 5 mM シスチンを添加したプレートで、37°C18hr 培養を行った。

1-3-3-2. High frequency of recombination $\Delta cysK$ 株の構築

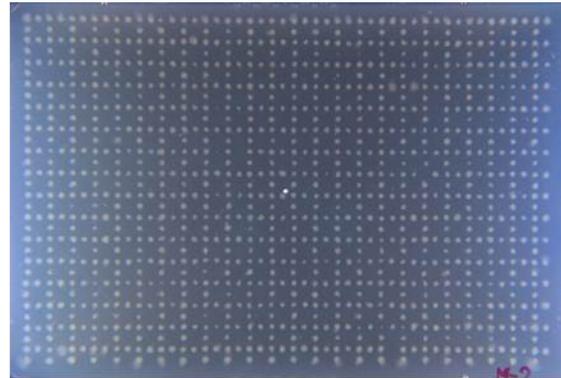
次に、 $\Delta cysK$ 株を Keio collection と接合し二重欠損株ライブラリーを構築するために、 $\Delta cysK$ 株の High frequency of recombination (Hfr) 化を行った。具体的には、接合に関わる F 因子を有する Chromosome Integration Plasmids (CIPs) が導入された菌株 (CIP 株) と $\Delta cysK$ 株とを接合させ、F 因子を $\Delta cysK$ 株に導入した。その結果、接合効率 27% と接合能の高い Hfr $\Delta cysK$ 株を構築できた。

1-3-3-3. $\Delta cysK \times$ Keio collection 二重欠損株ライブラリーの構築と Cys 要求二重欠損株の解析

構築した Hfr $\Delta cysK$ 株と Keio collection の各株を M9、M9+シスチンプレート上で接合させ、各プレート上で $\Delta cysK \times$ Keio collection 二重欠損株ライブラリーを構築した (図 17)。次にこのライブラリーの中から、M9+シスチンプレートでは生育できるが、M9 プレートではできない Cys 要求株を探索した。しかし、今回構築したライブラリー内の Cys 要求性を示すコントロールである $\Delta cysK\Delta cysM$ 株が、その他の株に比べ生育がかなり遅いものの M9 プレート上で微小なコロニーを形成していた。このことから、Cys 要求株の解析には M9+シスチンプレートでの生育度と M9 プレートでの生育度の差の大きいものから順位をつけ、Cys 要求性の高い株を同定する解析方法を検討する必要があることが分かった。



M9+Cystine



M9

図 17 $\Delta cysK \times$ Keio collection 二重欠損株ライブラリー

$\Delta cysK$ と Keio collection の各株を接合後、37°Cで48時間、培養した後の各二重欠損株のコロニー。
二重欠損株ライブラリーは、全部でプレート8枚分存在する。その中の1枚で、576遺伝子の結果である。

の還元酵素は通常の生育環境下において、Grx1 や NrdH と比べると比較的恒常的に発現している。従って、還元環境と考えられる Cys 発酵生産時においては、Grx1 や NrdH の発現レベルは低く、これら酵素の過剰発現の効果が、Cys 生産性の向上につながったのではないかと考えている。Grx の中では、*in vitro* で最も効果のあった Grx2 の生産量が低いことも、そもそも構成的に Grx2 の発現が高く、過剰発現の効果が表れにくいためと考えられる。これらのことを検証するには、Cys 発酵生産時の IPTG 誘導による各種還元酵素の発現量を解析する必要がある。

In vitro で SSC から Cys への還元活性を有する Grx1 または NrdH を $\Delta cysM$ 株で過剰発現させた場合には、Cys 生産性が向上しないことから、野生株での Grx1 または NrdH の過剰発現による生産性向上の原因は、チオ硫酸経路における SSC から Cys への還元促進によるものであると結論した。ここで私は SSC から Cys への還元の際に生じる亜硫酸イオンに着目した（反応式 1）。この亜硫酸イオンが硫酸経路に流れ込むならば、亜硫酸イオンの還元に関わる *cysI*, *cysJ* 遺伝子と、その下流の *cysK* 遺伝子の強化により、Cys 発酵生産性の向上が期待できる（図 12）。まず、 $\Delta cysI$, $\Delta cysJ$ 株でチオ硫酸イオンを硫黄源として Cys 発酵生産を行い、それら遺伝子の Cys 生産性への影響について調べた。その結果、これらの遺伝子欠損株の Cys 生産量が野生株と比較して約 50%減少していることが判明した。このことは SSC から Cys へ還元される際に生じた亜硫酸イオンが硫酸経路で同化できなくなり、Cys 生産量の低下をもたらしたと考えられた（図 13）。この Cys 生産量の低下は、SSC に含まれる 2 分子の硫黄原子のうち、SSC の還元により 1 分子の Cys が生じるものの、その際に生じる亜硫酸イオンを利用してもう 1 分子の Cys を生合成できないことにより、野生株と比較して半減したと考えられる（図 13）。実際、硫酸イオンから亜硫酸イオンまでの同化に働く *cysC*, *cysH* 欠損株で同様の実験を行った場合、OD₅₆₂あたりの Cys 生産量は野生株と差は見られなかった。以上の結果から、チオ硫酸経路の SSC から Cys への変換で生じる亜硫酸イオンは、硫酸経路に取り込まれ、Cys 合成へと利用されることが明らかとなった（Nakatani *et al.*, 2012）。

そこで、亜硫酸イオンの還元に関わる経路の強化により Cys 生産性の向上が期待できると考え、最初に *cysI*, *cysJ*, *cysK* の各遺伝子の単独過剰発現により評価を行った。これら遺伝子の単独過剰発現では効果はなく、次に私は二つの遺伝子をタンデムに連結し *cysJ-cysI*, *cysK-cysI*, *cysK-cysJ* の共過剰発現株により Cys 生産性の向上について調べた。その結果、*cysK-cysI* 共過剰発現株で Cys 生産性が向上することを見出した。この結果より、亜硫酸イオンを硫化物イオンに還元する段階と、その硫化物イオンと OAS から Cys を生合成する段階に関与する遺伝子の共発現が、

Cys 生産性の向上には必要であると考えられた (図 12)。しかしながら、亜硫酸イオンから硫化物イオンに同化するステップには複数の遺伝子が関与しており、なぜ *cysK-cysI* の共過剰発現株のみが Cys 生産に効果があったかは不明である。

これまでに私は、SSC から Cys への還元には Grx1 または NrdH が有効であること、また、その際に生じた亜硫酸イオンの Cys への変換強化が、Cys 発酵生産性の向上に効果があることを見出した (Nakatani *et al.*, 2012)。そこで最後に、これらの知見を組み合わせ、さらなる Cys 生産性の向上を試みた。その結果、24 時間目以降で、Cys 生産量が低下したものの、培養開始 24 時間目までは、*cysK-cysI-nrdH* の共過剰発現が Cys 生産性向上に最も効果を示した (Nakatani *et al.*, 2012)。

私は発酵生産への応用を行う過程で興味深い結果を得た。図 11 でチオ硫酸ナトリウムと硫酸マグネシウムの両方を硫黄源として Cys 生産を行った場合、空ベクターを導入した $\Delta cysM$ 株の培地中の Cys 生産量は約 20 mg/L 以下とほとんど Cys を生産していなかった (図 11-A)。また、硫酸マグネシウムを単独硫黄源として Cys 生産を行った場合、空ベクターを導入した $\Delta cysM$ 株の培地中 Cys 蓄積量は、約 150 mg/L であった (図 15-A)。同量の硫酸マグネシウムを添加したにも関わらず、生産量が 7 倍以上増加した。このことから、チオ硫酸イオンと硫酸イオンの両方が培地中に存在する場合、硫酸経路の利用を抑制して、チオ硫酸経路を優先的に利用するカタボライトリプレッションのような代謝制御が存在することが示唆された。硫酸経路の硫酸イオンから硫化物イオンへの同化では、2 分子の ATP と 4 分子の NADPH を多段階の反応により消費する。しかし、チオ硫酸経路のチオ硫酸イオンは細胞内に取り込まれると、CysM により OAS と直接反応し、1 ステップで SSC が生合成され、その後 1 分子の NADPH の消費による還元反応で Cys が生じる。この様に、エネルギーの消費や反応ステップが少ないという観点から、チオ硫酸経路の方が細胞にかかる負担が少ない。このことから、チオ硫酸イオンを優先的に利用する制御機構が存在することは理に適っており、チオ硫酸経路を利用した Cys 発酵生産が有効であることを示している。今後は、チオ硫酸経路の生理的な役割について解明する上でも、硫酸イオン、チオ硫酸イオン添加時の硫酸経路、チオ硫酸経路の各遺伝子の転写、発現レベルでの解析が必要である。

最後に、構築した $\Delta cysK\Delta cysM$ 二重欠損株が Cys 要求性を示したことから、大腸菌における Cys 生合成経路は硫酸経路、チオ硫酸経路の 2 経路しか存在しないことを明らかにした。そこで私は、二重欠損株ライブラリーを用いたスクリーニングにより、SSC から Cys への還元を行う酵素の網羅的探索も行った。

$\Delta cysK$ と Keio collection を接合させ、二重欠損株ライブラリーを構築するために、 $\Delta cysK$ 株の Hfr 化を行い、接合効率 27 % と接合能の高い Hfr $\Delta cysK$ 株を構築した。

次に Hfr Δ cysK 株と Keio collection の各株を M9、M9+シスチンプレート上で接合させ、各プレート上で Δ cysK \times Keio collection 二重欠損株ライブラリーを構築した (図 6, 17)。しかし、Cys 要求性を示すコントロールである Δ cysK Δ cysM 株は、M9 プレート上で生育が遅いながらも微小なコロニーを形成した。このようなことが起こる原因は、二つ考えられる。一つ目は、部分二倍体化している可能性である。 Δ cysK 株 (ドナー) と Δ cysM 株 (レシピエント) を接合する場合、Hfr Δ cysK 株 (ドナー) は欠損していない正常な cysM 遺伝子領域を持っている。これにより、接合した際に cysK 遺伝子の欠損領域が組み換わると同時に、正常な cysM 遺伝子領域も Δ cysM 株に導入され、欠損した cysM 遺伝子領域と正常な cysM 遺伝子領域の両方をもつ可能性がある。二つ目は、接合状態のままのドナー株 (Cm^R) とレシピエント株 (Km^R) が存在する可能性である。本来、接合により構築された二重欠損株は、接合後クロラムフェニコールとカナマイシンを含む選択培地にスタンプされ、Cm^R, Km^R の両薬剤耐性を持っていないドナー株 (Cm^R) とレシピエント株 (Km^R) は排除される。しかし、接合状態のままのドナー株 (Cm^R) とレシピエント株 (Km^R) は、それぞれの薬剤耐性タンパク質を共有し合うことで排除されない可能性がある。以上の二つの現象が起きていることで、コントロールの Δ cysK Δ cysM 株が完全な Cys 要求性を示さないと考えられる。構築したライブラリーの中から Cys 要求株を同定するには、この二つの現象を起りにくい条件で二重欠損株を構築する。もしくは、M9+シスチンプレートでの生育度と M9 プレートでの生育度の差の大きいものから順位をつけ、Cys 要求性の高い株を同定する解析方法を検討する必要がある。どちらにせよ、さらなる条件検討が必要である。今後はこれらの問題を解決し、Grx, Trx 群とは異なる酵素の同定を試みる。

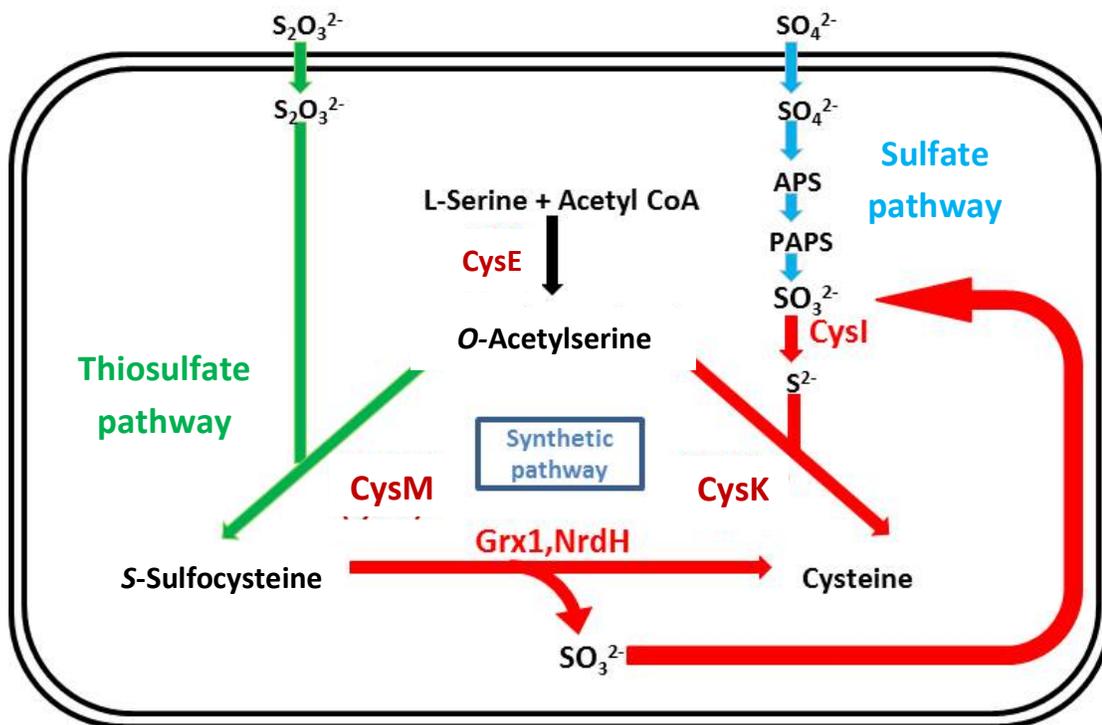


図 18 1章の成果

Grx1、NrdH が SSC から Cys への還元を促進、*cysK-cysI* の共過剰発現が亜硫酸リクルート系を強化し、Cys 生産性を向上させることを見出した。赤線が今回生産性向上に効果のあった経路及び酵素。

第 2 章

チオ硫酸イオン優先的な 新規システイン合成制御機構の解析

2-1. 緒言

< 栄養源の選択的利用機構と本研究の目的 >

生物には同種の栄養源が複数存在する場合、より好ましい栄養源を優先的に利用し代謝する機構が備わっている (Görke and Stülke, 2008; Marzluf, 1993)。これはより効率的な代謝 (同化、異化) が可能な栄養源を選択的に利用することで細胞の増殖速度を高め、生育する環境下でより早期に占有し、他の生物より優位な状況を確認するための生物の巧みな生存戦略の一つである。このような機構の理解は微生物において進んでおり、特に炭素源、窒素源の選択的な利用機構はカタボライトリプレッションと呼ばれ、その制御機構について詳細な解析が鋭意行われてきた。しかし、三大元素の一つである、硫黄源の選択的利用に関する報告は極めて少なく、その機構についてはほとんど理解されていない。

第 1 章で述べたチオ硫酸経路に関わる酵素を用いた Cys 発酵生産の研究において、チオ硫酸イオンと硫酸イオンを同時に培地に添加した場合、硫酸経路を介した Cys の生産量が有意に低下することを見出した (図 11, 15) (Nakatani *et al.*, 2012)。これは Cys 合成がチオ硫酸経路優先的に制御されていることを示唆するものと考え、本章では、その機構の有無を検証し、解析を行った。

< 硫酸経路とチオ硫酸経路による Cys 合成について >

硫酸経路は、硫酸イオンの同化的還元により生じる硫化物イオンと *O*-アセチルセリン (OAS) を *cysK* 遺伝子がコードするシステイン合成酵素 (CysK) の触媒反応によって Cys を合成する (図 19: 灰色) (Kredich, 1992; Nakatani *et al.*, 2012)。一方、チオ硫酸経路はチオ硫酸イオンと OAS を *cysM* 遺伝子がコードする *S*-スルホシステイン合成酵素 (CysM) の触媒反応によって、*S*-スルホシステイン (SSC) を合成し、Cys と亜硫酸イオンへと還元する (図 19: 黒色) (Kredich, 1992; Nakamura *et al.*, 1983; Sekowska *et al.*, 2000)。SSC の還元は、第 1 章で示したように GSH などによる非酵素的還元や Grx、Trx などの還元酵素に依存すると考えられる。このように、硫酸イオン、チオ硫酸イオンそれぞれからの Cys 合成機構に

については解析が進められてきたが、これらが細胞外に同時に存在する場合の応答やその制御機構については解析されてこなかった。

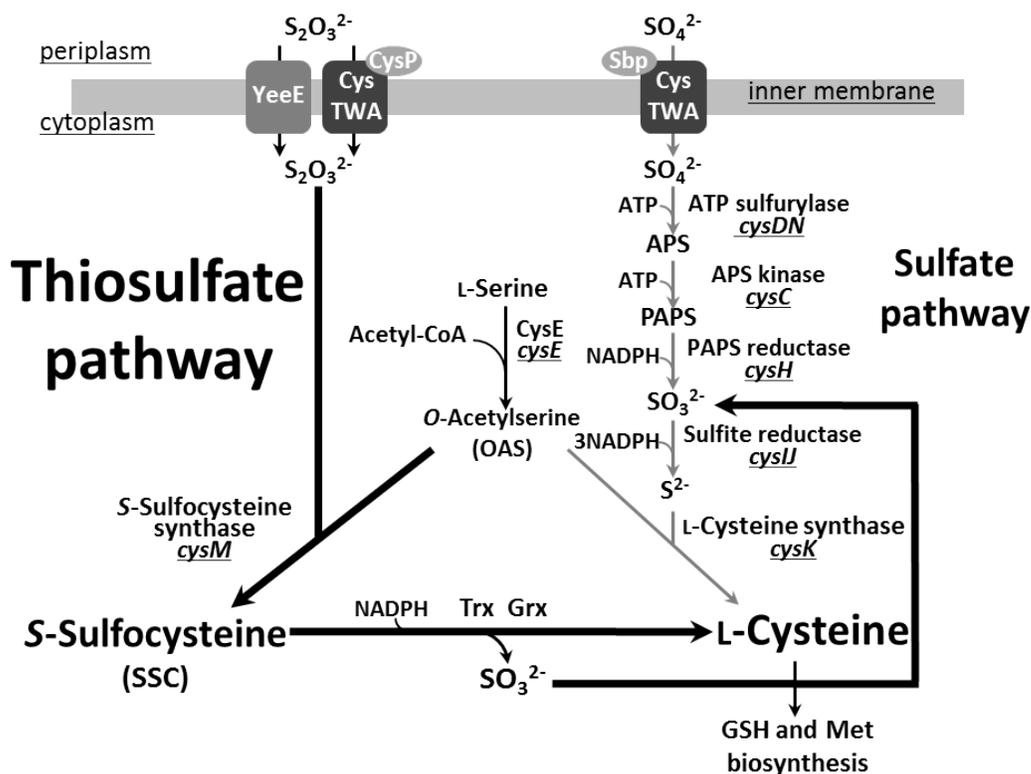


図 19 大腸菌のシステイン生合成経路

大腸菌は 2 種類の無機硫黄源、硫酸イオンとチオ硫酸イオンそれぞれから Cys を合成する経路をもつ。両経路の中間代謝物及び、各反応に関わる酵素名、遺伝子名を示した。

CysE, serine acetyltransferase; SO₄, sulfate; S₂O₃, thiosulfate; APS, adenosine 5-phosphosulfate; PAPS, 3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate; OAS, O-acetylserine; GSH, glutathione; Met, methionine.

硫酸経路から 1 分子の Cys を合成する場合、2 分子の ATP と 4 分子の NADPH を必要とするのに対して、チオ硫酸経路では、1 分子の NADPH の消費のみで Cys を合成できる。これは硫黄の酸化数が+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必要なエネルギーが少ないためである。また、硫酸経路では 8 つの酵素により 5 段階の反応が必要であるが、チオ硫酸経路では最少で 1 つの酵素による 2 段階の反応のみで Cys を合成できる。さらに、第 1 章で示したように、SSC の還元により生じる亜硫酸イオンも硫酸経路へとリクルートされると示唆されるため、1 分子のチオ硫酸イオンの取り込みから 2 分子の Cys を合成できる。以上の理由から、チオ硫酸経路は硫酸経路と比較してより効率的に Cys

を合成できると考えられ、チオ硫酸イオン優先的な Cys 合成機構が存在するのではないかと考えた。

<炭素源の選択的利用機構について>

大腸菌における炭素源の選択的利用機構はよく理解されており、カーボンカタボライトリプレッションと呼ばれている。グルコースなど上位の炭素源の存在下では、ラクトースなど下位の炭素源の細胞内輸送を抑制すると同時に、その資化に関わる遺伝子群の発現が抑制される。これはグルコース存在下で、ホスホトランスフェラーゼシステム (PTS) と呼ばれるリン酸基転移カスケードを介して、ラクトースインポーター LacY の輸送活性が阻害されることに起因する (Gorke and Stulke, 2008)。これによりインデューサーであるラクトースの細胞内濃度が低下し、*lac* オペロンの発現が抑制される。また、この PTS による制御のスイッチは上位の炭素源であるグルコースのインポーター (EI^{Glc}) による取り込み依存的にオンになる。窒素源の選択的利用機構についても主に酵母において解析が進んでおり、転写や細胞内輸送が制御されることが既に報告されている (Schure *et al.*, 2000)。このように、下位の栄養源の細胞内への流入を止めること、それに伴い不要となる酵素タンパク質の発現を抑制することは、上位の栄養源を優先的に利用すると同時に、エネルギー消費を抑えるという点で、効率的で理に適った機構である。そこで、チオ硫酸イオンの優先的利用においても、硫酸経路に関わる代謝遺伝子の発現や細胞内輸送が制御される機構が存在するのではないかと考えた。

<Cys 合成制御機構>

Cys の生合成は、最終産物である Cys によって厳密に制御されることが知られており、これらの制御は酵素活性の阻害や遺伝子発現の抑制に起因する (Denk and Böck, 1987)。本研究においては、特にチオ硫酸イオン存在時の硫酸経路の転写抑制や、硫酸イオンの細胞内輸送の抑制に着目し、チオ硫酸イオン優先的な Cys 合成機構の解析を進めることにした。そこで、これまでに報告されている Cys レギュロンの転写制御、硫酸イオンの細胞内輸送機構について記述する。

(i) 転写の制御について

Cys 生合成系の制御にとって最も重要な機構は、Cys 合成系の初発酵素であるセリンアセチルトランスフェラーゼ (CysE) の活性が Cys によってフィードバック阻害を受けることである (Denk and Böck, 1987 ; Colyer and Kredich, 1994)。このフィードバック阻害には、Cys 合成の基質の供給停止と Cys レギュロンの転写抑制という 2 つの意味がある (Sekowska *et al.*, 2000)。つまり、CysE による触媒反

応の生成物である OAS が、CysK や CysM の基質であり、また Cys レギュロンの転写を誘導する転写因子 CysB のインデューサーとしても働くからである（正確には、OAS から非酵素的変換により生じる *N*-アセチルセリンがインデューサーとなる）。Cys レギュロンは CysB レギュロンとも呼ばれ、そのターゲットは硫酸経路とチオ硫酸経路で働く *cysPTWA*, *sbp*, *cysDNC*, *cysHIJ*, *cysK*, *cysM* やシスチンインポーターをコードする *ydjN* や *fliY-yecSC* など、Cys の供給に関わる遺伝子群である。また、*cysB* 遺伝子も CysB レギュロンであるが、CysB の活性化により転写が負に制御されることで、CysB レギュロンの過剰な転写誘導を抑制する。以上をまとめると、Cys が不足する条件では、NAS と CysB の結合を介して、CysB レギュロンの転写が誘導され、細胞内の Cys レベルが増加する。一方、過剰量の Cys (約 1 μ M) による CysE へのフィードバック阻害により、NAS レベルが減少し転写が抑制される。

(ii) 細胞内への硫酸イオン、チオ硫酸イオンの輸送について

Cys 生合成の硫黄源である硫酸イオンとチオ硫酸イオンの細胞内輸送に関わるインポーターとして、CysTWA が知られている (Aguilar-Barajas *et al.*, 2011)。このインポーターは ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの一種で、ATP のエネルギーを消費して基質を細胞内へと輸送する。CysTWA はペリプラズム中に存在する硫酸イオン結合タンパク質 Sbp とチオ硫酸イオン結合タンパク質 CysP との基質の受け渡しを介して、各基質を細胞内に輸送すると考えられている (図 20)。しかし、Sbp、CysP それぞれと CysTWA との結合など、詳細な輸送メカニズムについては解析されていない。これまで、チオ硫酸イオンによる硫酸経路の抑制を示した報告はなく、チオ硫酸イオンと硫酸イオンが共通のインポーターを利用することの意義については検証されてこなかった。このような観点から本章においては、チオ硫酸イオンによる CysTWA を介した硫酸イオンの取り込み阻害が、硫酸経路の不活性化の原因となるかについても検証を行った。

以上より、本章では硫酸イオンの細胞内輸送や代謝に関わる遺伝子の発現に着目し、チオ硫酸イオン優先的な Cys 合成制御機構の解析を行った。

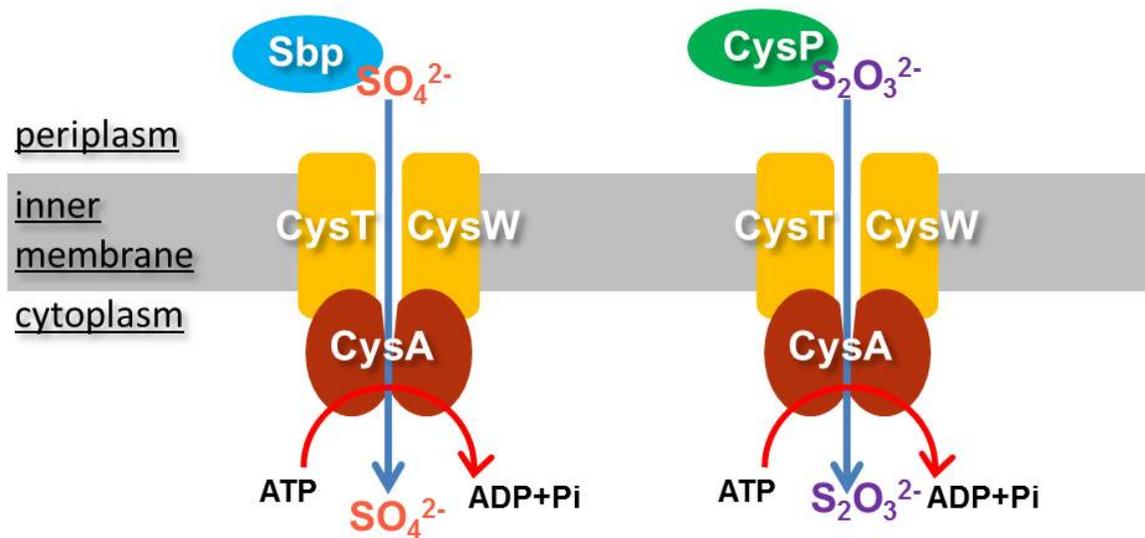


図 20 CysTWA インポーターによる硫酸イオンとチオ硫酸イオンの取り込み

大腸菌は、ABC トランスポーターCysTWA によって、硫酸イオン、チオ硫酸イオンをペリプラズムから細胞質に取り込む。これら無機硫黄化合物はそれぞれ、硫酸イオン結合タンパク質 **Sbp** とチオ硫酸イオン結合タンパク質 **CysP** が、CysTWA に受け渡すことで選択的に細胞内へ輸送されると考えられている。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 菌株及びプラスミド

本章で用いた大腸菌の菌株及びプラスミドを次ページに記載する（表 5）。
一部の一遺伝子欠損株（Keio collection）及び遺伝子破壊用のプラスミドは、本学の森浩禎教授より分譲して頂いた。

2-2-2. 培地組成

	<u>LB 培地 (1L 中)</u>	<u>L 培地 (1L 中)</u>
Bacto trypton	1 %	1 %
Yeast extract	0.5 %	0.5 %
NaCl	1 %	0.5 %
	pH7.0	pH7.0

M9 培地 (1L 中)

Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1 g
Glucose	6 g
1 % Thiamine-HCl	50 µl
	pH7.0

M9 最少培地使用時には、MgCl₂（終濃度 1 mM）を添加し、硫黄源は各実験の目的に応じて、硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、もしくはシスチンを添加した。また上記の各培地は、実験条件に応じて、抗生物質である 30 µg/ml クロラムフェニコール (Cm) , 50µg/ml カナマイシン (Km), 35 µg/ml ストレプトマイシン (Sm), 10 µg/ml テトラサイクリン (Tet) を添加して行った（二重欠損株ライブラリーの構築に関する実験では、Cm、Km を用いた。）。固形培地では、1.5%寒天を添加した。

表 5 本章で使用した菌株とプラスミド

<i>E. coli</i> strain or plasmid	Genotype	Reference or source
<i>E. coli</i> strains		
BW25113 (WT)	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78}</i>	Baba et al. (2006)
BW38029	<i>rrnB3 φ (lacZp4105(UV5)-lacY)638 ΔlacZ hsdR514 Δ(araBAD)567 rph+</i>	Datsenko & Wanner (2000)
Δ <i>cysK</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysK::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
Δ <i>cysM</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysM::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
Δ <i>cysA</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysA::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
Δ <i>yeeD</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} yeeD::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
Δ <i>yeeE</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} yeeE::Km^R</i>	Baba et al. (2006)
Sup1	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysM::Km^R cysP⁻⁸¹</i>	this study
Δ <i>cysA</i> Δ <i>cysK</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} Δ<i>cysA</i> <i>cysK::Km^R</i></i>	this study
Δ <i>cysA</i> Δ <i>yeeD</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} Δ<i>cysA</i> <i>yeeD::Km^R</i></i>	this study
Δ <i>cysA</i> Δ <i>yeeE</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} Δ<i>cysA</i> <i>yeeE::Km^R</i></i>	this study
Δ <i>cysM</i> Δ <i>cysA</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysM::Km^R cysA::Km^R</i>	this study
Δ <i>cysM</i> Δ <i>ldcC</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysM::Km^R ldcC::m^R</i>	this study
Δ <i>cysM</i> Δ <i>yacF</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysM::Km^R yacF::Km^R</i>	this study
Δ <i>cysM</i> Δ <i>yidA</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysM::Km^R yidA::Km^R</i>	this study
Δ <i>cysM</i> Δ <i>yfbF</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysM::Km^R yfbF::Km^R</i>	this study
Δ <i>cysM</i> Δ <i>ybcN</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysM::Km^R ybcN::Km^R</i>	this study
Δ <i>cysM</i> Δ <i>nudH</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysM::Km^R nudH::Km^R</i>	this study
Δ <i>cysM</i> Δ <i>yjgN</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysM::Km^R yjgN::Km^R</i>	this study
Sup1Δ <i>cysD</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysM::Km^R cysP⁻⁸¹ cysD::Km^R</i>	this study
Sup1Δ <i>cysK</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysM::Km^R cysP⁻⁸¹ cysK::Km^R</i>	this study
Sup1Δ <i>glpE</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysM::Km^R cysP⁻⁸¹ glpE::Km^R</i>	this study
Sup1Δ <i>pspE</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysM::Km^R cysP⁻⁸¹ pspE::Km^R</i>	this study
Sup1Δ <i>yeeD</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysM::Km^R cysP⁻⁸¹ yeeD::Km^R</i>	this study
Sup1Δ <i>yeeE</i>	<i>lac^R rrnB_{T14} lacZ_{WJ16} hsdR514 araBAD_{AH33} rhaBAD_{LD78} cysM::Km^R cysP⁻⁸¹ yeeE::Km^R</i>	this study
Δ <i>cysM</i> / <i>cysP⁻⁸¹</i>	BW38029 <i>cysM::Km^R cysP⁻⁸¹</i>	this study
<i>cysP⁻⁸¹</i>	BW38029 <i>cysP⁻⁸¹</i>	this study
plasmids		
pCA24N	<i>Cm^R</i>	Kitagawa et al. (2005)
pCysB	pCA24N, <i>cysB</i> gene on 1.0 kb DNA fragment	Kitagawa et al. (2005)
pEmpty	<i>Km^R</i>	Ajinomoto
pCysB ^{ca}	pEmpty, <i>cysB^{T149P}</i> (constitutive active mutant of <i>CysB</i>) gene on 1.0 kb DNA fragment	Ajinomoto
pACYC184	<i>Cm^R Tet^R</i> under the control of the <i>OmpA</i> promoter	Ajinomoto
pE1	pACYC184 with altered <i>cysE^{T167A}</i> gene under the control of the <i>OmpA</i> promoter	Ajinomoto
pKD46	Lambda Red recombinase expression plasmids (<i>Amp^R</i> , temperature sensitive reprecion, arabinose-inducible promoter)	Datsenko & Wanner (2000)
pKD13	template plasmid for gene disruption. Kanamycin resistance gene is flanked by FRT sites.	Datsenko & Wanner (2000)
pKD334	template plasmid for gene disruption. Chloramphenicol resistance gene is flanked by FRT sites.	Datsenko & Wanner (2000)

2-2-3. プライマー

本章で使用したプライマーを以下に示す。

表 6 本章で使用したプライマー

primer	sequence (5'-3')
cysM-KN	AGACGCGCAAGCGTCGCATCAGGCAACACCACGTATGGATAGAGATCGTGATTCCGGGGATCCGTCGACC
cysM-KC	TTGTCATCAGTCTCCGATGTATTAATCCTTAAATCCCCGCCCTGGCTTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
cysD-KN	CGAAACATCTGATGGCAAGAAAATAGCGGTATTGCAAAGGAACGGTTATGATTCCGGGGATCCGTCGACC
cysD-KC	CGATTTGTTGTGCAAGTGCAGTTCATCTTAAAAATACCCTGACGTTTTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
cysK-KN	GGTATGCTACCTGTTGTATCCCAATTTTCATACAGTTAAGGACAGGCCATGATTCCGGGGATCCGTCGACC
cysK-KC	CTTTTTACGCATTTTTAACAAGCTGGCATTACTGTTGCAATCTTTCTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
glpE-KN	AACTGTGCGTAAATTTGCCACTTGTGTTGTAAGAAAAGAGAGACGCATGATTCCGGGGATCCGTCGACC
glpE-KC	TTCCACACAAAAGGGGACAGTATAAAGCGTTACGCGCCGTACGCCACCTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
pspE-KN	TCAGGCGTATAATGGATGGCAATTTTCATCCATAGAAGGACGCTTACATGATTCCGGGGATCCGTCGACC
pspE-KC	CGCATAAGCGCCGCTCATGGTGAATCTTTAACCTTTGACCTTCGGCATTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
yeeD-KN	TAAGGCGCGACTGGCAACTGCTGCGGCAAATTAAGTAAGGTGTAAGATGATTCCGGGGATCCGTCGACC
yeeD-KC	CCGCTGGTACGGCGGAGGACAATGTTGAGTCAGGCTTTTTGAACGGTGATTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
yeeE-KN	CAGTCATGAATAATTTCTCATTAACATTCATCTGGTTAATTAATTTATGATTCCGGGGATCCGTCGACC
yeeE-KC	GCTTTTTAATCACCATCTTTACACCTTACTTAATTTGCCGAGCAGTTGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
nudH-KN	GTATGAAACAATCATTCGTATATAAAGCTTTATTTTGAGGTAGTCCGGTGATTCCGGGGATCCGTCGACC
nudH-KC	CGCAGGCGAGTGAGCATAATTGGCGTGACTTAACCTCTTTTACGTCGATATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
cysP-del-PKD45-Fw	GGCTCTATAGCCCGCAGGCGCAAACCATCATCACCGACTATTACTACCGCTATCAACAGGTTGAAGTGC
cysP-del-pKD45-Rv	AGCTCGGTCTGCGGGAATTTGCTTTTCAGTTTGTCCATCACCTCCGGGTTGGATCCAGAATACACTGCCG
curing SS for cysP-del	AAAGCCGCCAAAGCCTATCTGAACTGGCTCTATAGCCCGCAGACCGAGCTGTTCCGCGTGAAGACAAAT

2-2-4. 遺伝子破壊株の構築

ゲノム上の遺伝子破壊は、Datsenko らの方法に準じて行った (Datsenko and Warner, 2000)。FRT 配列を両端にもつ薬剤耐性遺伝子 (Km^R , Cm^R) がクローニングされたプラスミド pKD13 (Km^R)、pKD334 (Cm^R) を鋳型に、破壊したい遺伝子 ORF の上流もしくは下流 50 bp の相同配列を持たせたプライマーを用いて PCR 反応により、破壊断片を作製した。 λ Red recombinase を発現する温度感受性プラスミド pKD46 が形質転換された目的株に、エタノール沈殿により精製した破壊断片をエレクトロポレーションにより導入し、薬剤含有プレートによる 37°C 培養でセレクションを行った。選抜されたコロニーについて、目的遺伝子の破壊、及び pKD46 の脱落を確認し、遺伝子破壊株として以後の実験に使用した。

2-2-5. cDNA マイクロアレイ解析

まず M9 培地 (1 mM 硫酸ナトリウム) で前培養した大腸菌の細胞を、遠心分離後、硫黄源を含まない M9 培地 (M9-S) で 3 回洗い、改めて M9 培地 50 ml (1 mM チオ硫酸ナトリウム) に懸濁後 $OD_{660}=0.4$ まで培養した。この対数増殖期の培養液にチオ硫酸ナトリウム (終濃度 1 mM) を添加 5 分後に、遠心分離によって細胞を回収し、RNA 抽出を行った。RNA 抽出にはホットフェノール法を用いた。遠心分離により培地を除去した細胞に水飽和フェノールを添加し、60°C で 10 分間加熱後、遠心分離によって上澄を回収した。この操作を三回繰り返す、エタノール沈殿により精製後、DEPC 水に溶解させた。抽出した核酸溶液に、酢酸ナトリウム (終濃度 0.1 mM)、硫酸マグネシウム (終濃度 50 μ M) を添加後、DNase I (タカラバイオ社) を添加し、DNA を分解した。DNase 処理後の溶液をフェノール沈殿、エタノール沈殿後、DEPC 水 50 μ l に溶解させ総 RNA 抽出液とした。回収した RNA 溶液は、濃度測定やアガロース電気泳動を行い、RNA の収量を測定するとともに、DNA の混入や、RNA の分解がないことを確認した。以後の逆転写反応、ラベリング、チップへのハイブリダイゼーション、アレイ解析については Roche 社に委託した。

2-2-6. RT-PCR による転写量変化の解析

RT-PCR 解析に用いたプライマーは、プライマー設計ソフト Primer Express (Applied Biosystems 社) を利用して設計した。対数増殖期 ($OD=0.4$) まで培養した大腸菌に、チオ硫酸イオンの添加など各実験条件による処理を行った。処理後の培地 1 ml に RNA Protect for bacteria reagent (Qiagen 社) を 2 ml 加え室温で 5 分放置し、遠心分離 (5,000 g、25°C、10min) を行い RNA の固定処理を行った。上

澄をデカントで除いたペレットに、T.E (pH8.0) に溶解させた 1 mg/ml Lysozyme (Sigma Aldrich 社) を加え、大腸菌細胞を溶解させた。以降の総 RNA 抽出は RNeasy mini kit (Qiagen 社) を用いて行った。さらに抽出した総 RNA を High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems 社) を用いて逆転写反応に供し、cDNA へと変換させた。実際の RT-PCR 反応は、7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems 社製) を用いて行った。反応溶液には、Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems 社)、ターゲット遺伝子のフォワード及びリバースプライマー (各 0.1 μ M)、cDNA 溶液 (20 ng) を加えた。PCR 反応により対数的な増幅が確認される領域でスレッシュホールドを引き、その時の各サンプルのサイクル数を、mRNA 量を示す定量的な数値 Ct (cycle threshold) 値とした。各遺伝子の mRNA レベルは、ハウスキーピング遺伝子 *rrsH* 遺伝子の Ct 値を用いて、補正した。各遺伝子の各条件における mRNA 量の相対的な比較は、 $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて行った (Livak and Schmittgen, 2001)。図で示した相対 mRNA レベルは、チオ硫酸イオン添加などの処理前の mRNA レベルを 1.0 とし、処理後の変化量を比率で示したものである。

2-2-7. ^{35}S を用いた硫酸イオン取り込み活性の測定

M9 培地で対数増殖期まで培養した培養液を 0.1 M カリウムリン酸バッファー (KPB) (pH 7.0) で 3 回洗った後、OD₆₆₀=0.5 となるよう調整した。この細胞懸濁液 6.5 ml に 40 % グルコース 60 μ l を添加し、37°C で 10 分間加温した。その後、 ^{35}S -硫酸ナトリウムを含む硫酸ナトリウム溶液を終濃度 0.1~100 μ M の濃度範囲で添加し、GF/C filter (Whatman 社) 上にアプライし、0、2、5、10、20 分後にアスピレーターで硫酸ナトリウム溶液を除去した。チオ硫酸イオンを添加する場合は、フィルターへの添加前にチオ硫酸ナトリウム溶液が終濃度 1 μ M となるよう細胞懸濁液に加えた。0.1 M KPB 1 ml で 3 回洗浄後、菌体が付着するフィルターを液体シンチレーションに溶解させ、細胞内に輸送された ^{35}S -硫酸イオンをシンチレーションカウンター LSC-7200 (ALOKA 社製) で定量した。

2-2-8. Δ *cysM* Δ *X* 二重欠損株ライブラリーを用いた TSR に関与する遺伝子のスクリーニング

Δ *cysM* Δ *X* 二重欠損株ライブラリーの構築は第一章の Δ *cysK* Δ *X* 二重欠損株ライブラリー構築 (第 1 章 1-2-12) に準じて行った。まず、CIP 保有株との接合により、Hfr Δ *cysM* 株を構築し、接合効率を調べた。その結果、Hfr Δ *cysM* 株の接合効率は 21 % を示し二重欠損株ライブラリー構築に十分なものであった。

構築した Hfr Δ cysM 株と Keio collection の各株をプレート上で接合し、cysM 遺伝子欠損領域を Keio collection 株に伝達、相同組み換えさせ、Keio collection 株の cysM 遺伝子を欠損させた。この接合は、実験ロボットと 384 ピン :FP-4 (V&P Scientific 社製) を利用した自動化システムにより、各プレートにコロニーをスタンプすることで行った。接合は LB (薬剤なし) プレートで、TSR に関するスクリーニングは M9+ 1 mM 硫酸ナトリウム (Cm, Km) もしくは、M9+ 1 mM 硫酸ナトリウム+1 mM チオ硫酸ナトリウム (Cm, Km) でそれぞれ行った。

また構築したライブラリーを、37°C で培養し、プレートの画像を 30 分おきに 65 時間、スキャナー (セイコーエプソン社製 : EPSON GT-8700F) 、ライトボックス (富士フイルムイメージング社製 : LED ビュアー A4 プロ) により撮影し、M9 (1 mM 硫酸ナトリウム+1 mM チオ硫酸ナトリウム) でも良好に生育できる株を選抜した。

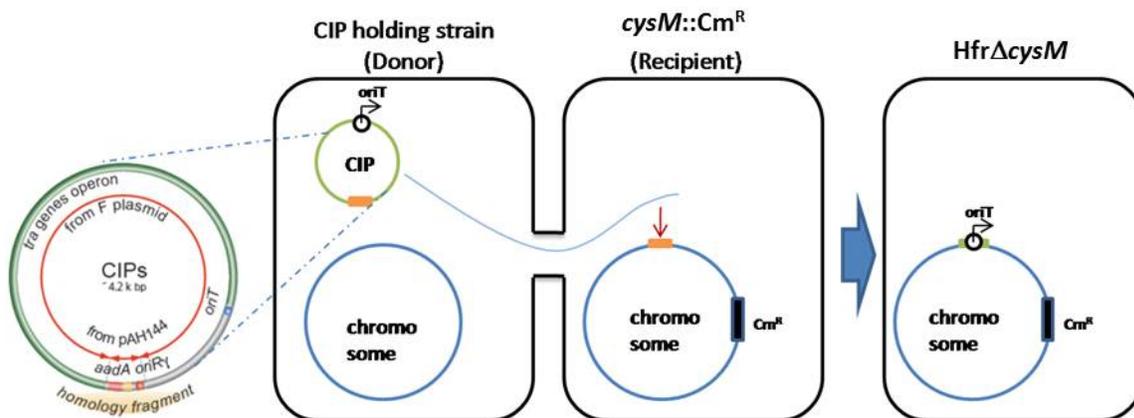


図 21 Hfr Δ cysM 株の構築

Hfr : high frequency of recombination. CIP: chromosome Integration Plasmids.

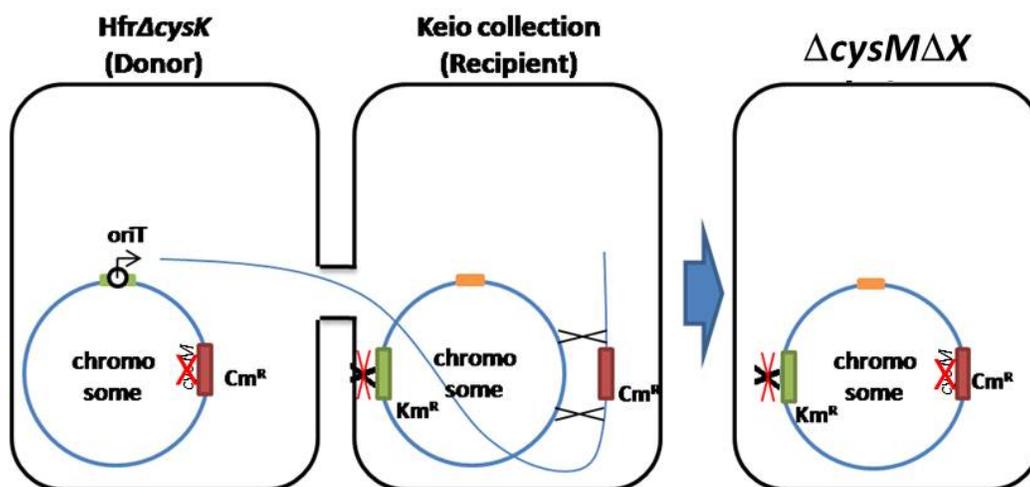


図 22 Δ cysM Δ X 二重欠損株ライブラリーの構築

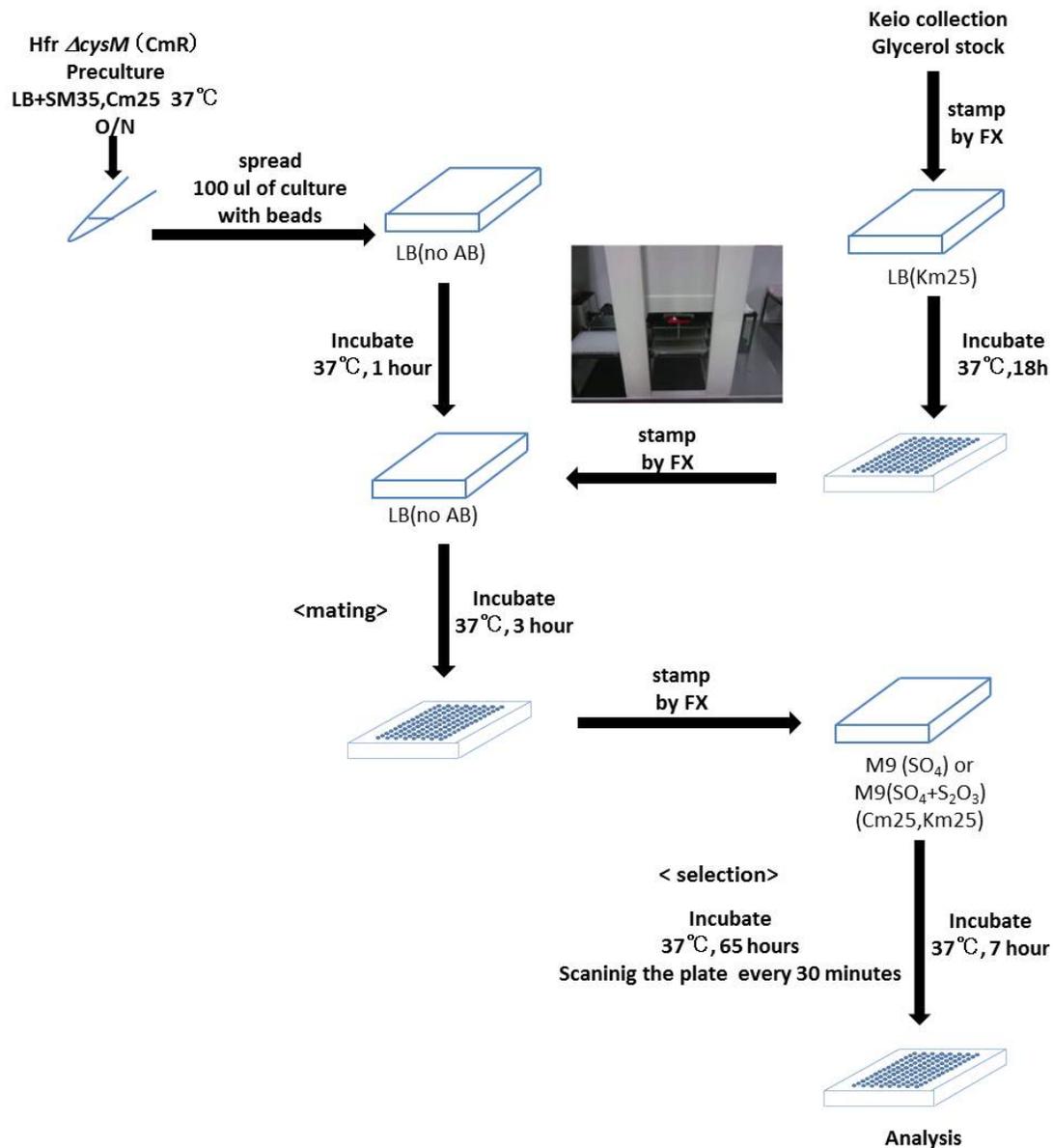


図 23 $\Delta cysM\Delta X$ 二重欠損株ライブラリーを活用した TSR に関する遺伝子のスクリーニング $cysM$ 欠損株は硫酸イオン、及びチオ硫酸イオンを含む M9 培地では生育できない。そこで、この $cysM$ 欠損株と大腸菌の一遺伝子欠損株ライブラリーである Keio collection を接合させることで、 $cysM$ 以外にもう一つ別の遺伝子が欠損した $\Delta cysM\Delta X$ 二重欠損株ライブラリーを構築し。その後、上記の培地でも生育可能な二重欠損株を選別することで、その二重欠損株の遺伝子 X が TSR の制御に関わる遺伝子と同定できると考えた。

2-3. 結果

2-3-1. チオ硫酸経路優先的な Cys 合成制御機構 (TSR) の可能性

第 1 章の図 11, 15 の結果、及び考察で述べたように、*cysM* 欠損株を用いた Cys 発酵生産の実験から、チオ硫酸イオン存在下では硫酸経路の利用が抑制されることが示唆された。そこでこの現象が発酵生産条件に特異的なものか、より生理的な条件で解析することにした。

具体的には、大腸菌の BW25113 (野生株) と *cysM* 欠損株を各種硫黄源 (硫酸イオンのみ、硫酸イオン+チオ硫酸イオン、硫酸イオン+チオ硫酸イオン+シスチン) を含む M9 最少培地で 37°C、24 時間培養した。その結果、*cysM* 欠損株はチオ硫酸イオンを単一硫黄源として利用できないが、硫酸イオンは正常に利用できるため、硫酸イオンのみを含む培地では、野生株と同等の良好な生育を示した (図 24)。一方、興味深いことに、硫酸イオンとチオ硫酸イオンを含む培地では *cysM* 欠損株はほとんど生育することができなかった (図 24)。さらに、シスチンの添加により生育が回復したことから、この生育遅延は Cys の欠乏が原因であると考えられた。以上の結果を踏まえると、チオ硫酸イオンの添加により、*cysM* 欠損株は唯一の Cys 合成経路である硫酸経路が抑制されることによって、Cys 要求性を示したと考えられる。この表現型は図 11, 15 の発酵生産実験と類似する結果であるが、より生理的な条件下においてもチオ硫酸イオンによる硫酸経路の抑制を示唆する表現型を観察できた。すなわち、大腸菌は無機硫黄化合物から Cys を合成する際に、環境中に存在する硫酸イオン、チオ硫酸イオンの 2 つの無機硫黄源をセンシングし、チオ硫酸塩を優先的に選択する機構を有していると考えられた。このユニークな機構を「チオ硫酸リプレッション (ThioSulfate Repression : TSR)」と名付けた。この TSR の分子メカニズム、及び生理的役割などについて詳細に解析することにした。

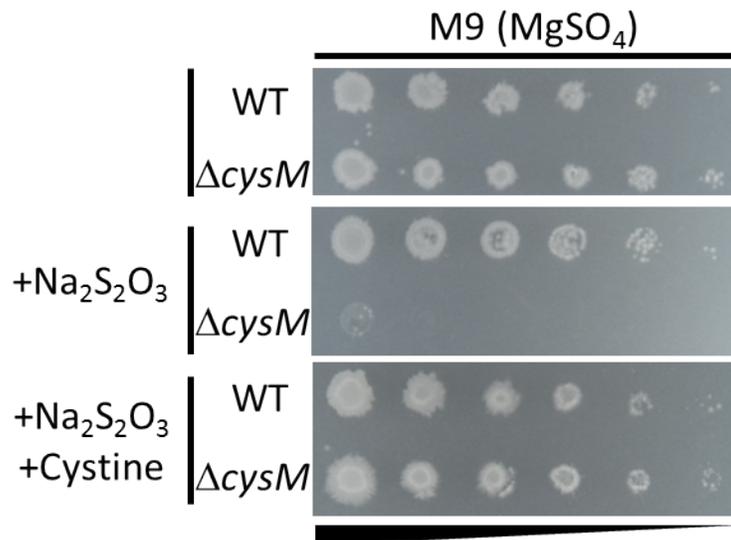


図 24 チオ硫酸イオンにより Cys 要求性を示す *cysM* 欠損株

野生株 (BW25113) 及び、*cysM* 欠損株の前培養液を 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 希釈し、1mM 硫酸ナトリウム、1mM 硫酸ナトリウム+1mM チオ硫酸ナトリウム、1mM 硫酸マグネシウム+1mM チオ硫酸ナトリウム+1mM シスチンをそれぞれ硫黄源として含む M9 最少培地プレートにスポットし、37°C で 24 時間培養した。

さらに、この TSR による硫酸経路の抑制の表現型をより詳しく調べるために、様々な濃度のチオ硫酸イオン (1 nM~10 mM) を 1 mM の硫酸イオンを含む M9 最少培地に添加し、野生株と *cysM* 欠損株の生育を調べた。その結果、野生株ではチオ硫酸イオンを含まない条件での増殖曲線の傾き、定常期の到達 OD がもっとも低く、チオ硫酸イオンを添加することで生育が良くなる傾向が観察された (図 25-A)。また、100 μ M チオ硫酸イオンの添加が最も生育に効果的であった。一方、*cysM* 欠損株は野生株とは対照的に、チオ硫酸イオンを添加しない条件で最も良好に生育した。興味深いことに、1 nM から 100 nM と低濃度のチオ硫酸イオン添加によっても生育の悪化が観察され、1 μ M 以上の添加では生育することができなかった (図 25-B)。この結果より、1 mM の硫酸イオンに対し、1/1,000 の濃度のチオ硫酸イオン (1 μ M) により *cysM* 欠損株の生育を完全に阻害したことから、TSR による硫酸経路の抑制は極めて厳密に制御されていることが示唆された。次に、TSR の分子機構について解析を進めた。

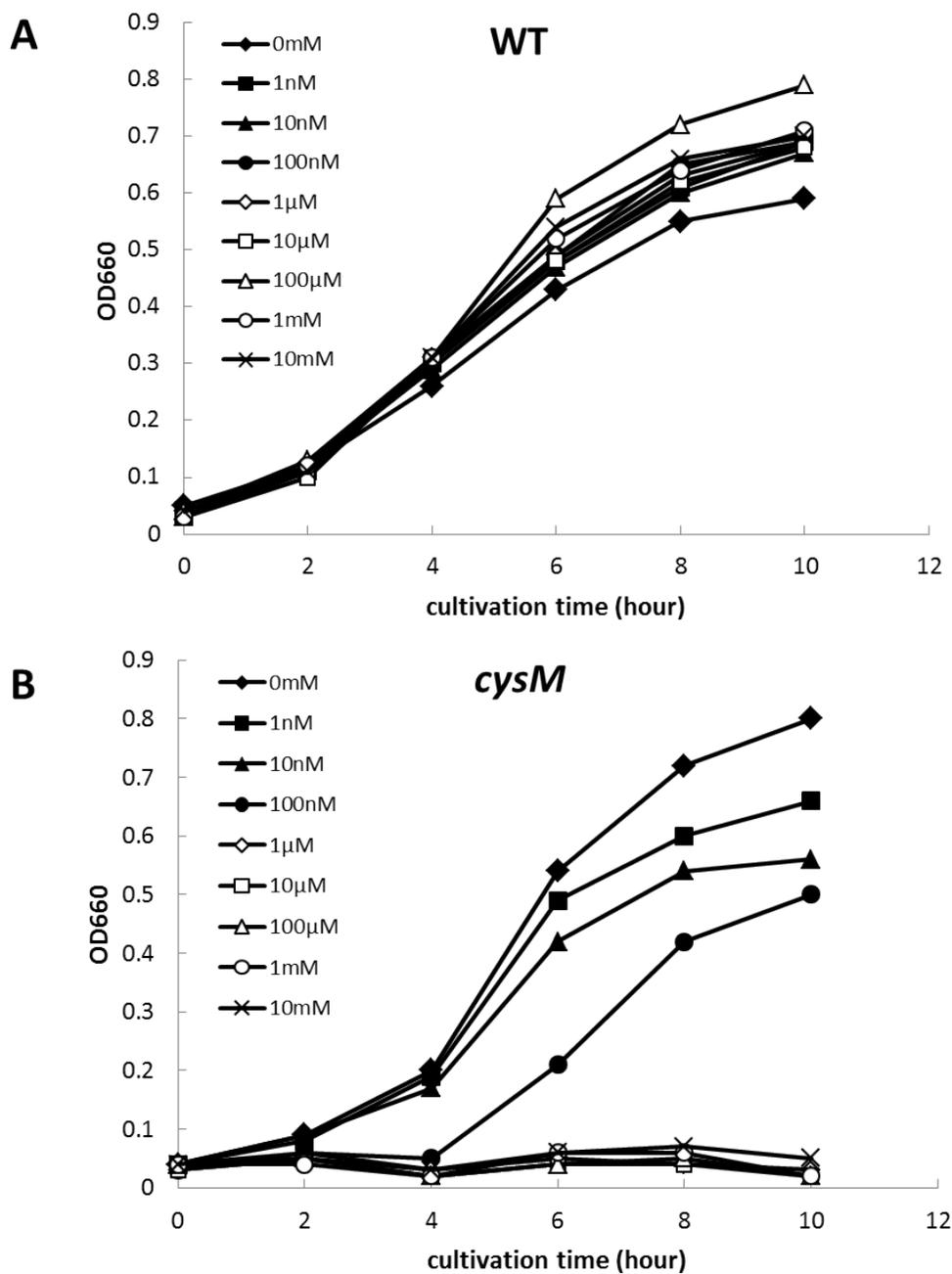


図 25 低濃度のチオ硫酸イオンにより生育が阻害される *cysM* 欠損株
 野生株 (BW25113) 及び、*cysM* 欠損株の前培養液を M9 最少培地に OD=0.02 となるように植菌し、37°Cで培養した。M9 最少培地には、1mM 硫酸ナトリウムに加えて、1, 10, 100 nM, 1, 10, 100 μM, 1, 10 mM チオ硫酸ナトリウムを加えた。

2-3-2. チオ硫酸イオンによる硫酸イオン取り込みの抑制

利用しにくい栄養源の細胞内への取り込みの抑制が、炭素源や窒素源の選択的利用機構に重要であることから（第 2 章の緒言）、TSR においても硫酸イオンの取り込みの抑制が起きるかどうかを検証した。

大腸菌の細胞は、ABC トランスポーターの CysTWA によって、硫酸イオン、チオ硫酸イオンをペリプラズムから細胞質に取り込む。これら無機硫黄化合物はそれぞれ、硫酸イオン結合タンパク質 Sbp とチオ硫酸イオン結合タンパク質 CysP が、CysTWA に受け渡すことで選択的に細胞内へ輸送されると考えられている（図 26-A）。まず、CysTWA 以外に硫酸イオン、もしくはチオ硫酸イオンのインポーターが存在しているのか、硫酸イオンまたはチオ硫酸イオンを単一硫黄源とした M9 培地で、CysTWA 欠損株の生育について解析した。実際には、CysTWA の欠損株として、ATP 結合カセット領域をコードする *cysA* 遺伝子の欠損株を用いた（図 26-A）。その結果、*cysA* 欠損株は、硫酸経路に必須である *cysK* の欠損株と同様に、硫酸イオンを硫黄源とする培地では生育できなかった（図 26-B）。また、チオ硫酸イオンを硫黄源とする培地では、コントロールとして用いた *cysM* 欠損株は生育できなかったが、*cysA* 欠損株は良好に生育した（図 26-C）。つまり、CysTWA は大腸菌における唯一の硫酸インポーターであるが、チオ硫酸のインポーターは CysTWA 以外にも存在することが判明した。次に、野生株と *cysA* 欠損株における硫酸イオンの輸送活性について、放射性同位元素の ^{35}S で標識された硫酸ナトリウムを用いて調べた（ $[\text{}^{35}\text{S}]$ -チオ硫酸ナトリウムは製造中止のため、チオ硫酸イオンの取り込み活性は測定できない）。その結果、野生株と比べて *cysA* 欠損株では、硫酸イオンが取り込まれないことが示された（図 26-D）。以上より、大腸菌において硫酸イオンは CysTWA のみに依存して細胞内に輸送されるものと結論付けた。

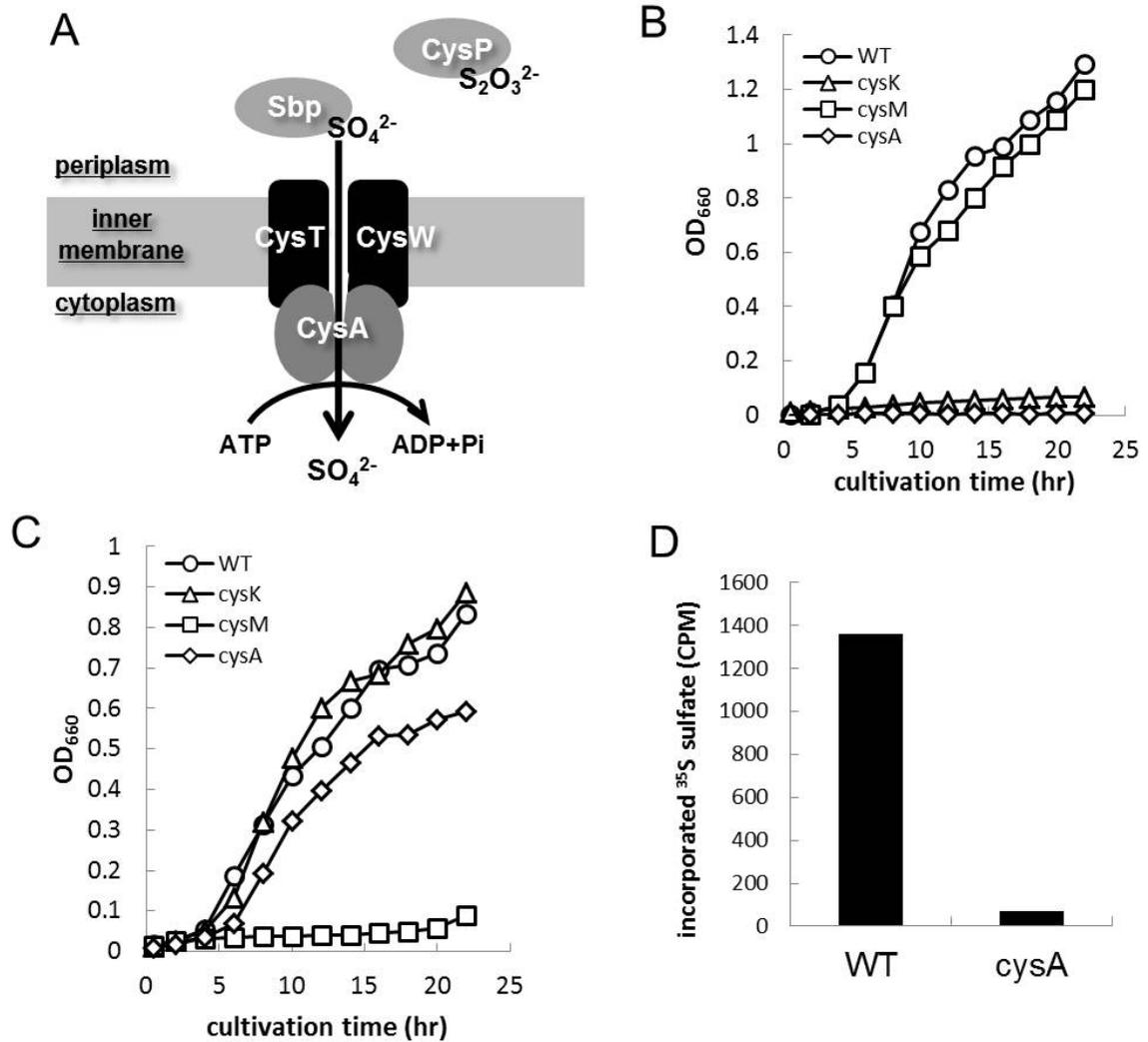
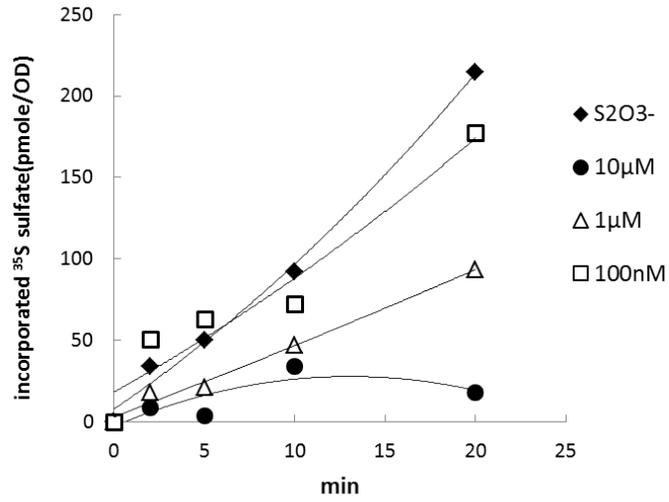


図 26 CysTWA は大腸菌にける唯一の硫酸イオンインポーター

(A) CysTWA のイラスト、CysT と CysW がチャンネルを形成し、CysA が ATP 結合ドメインとなる。ペリプラズムの基質結合タンパク質 Sbp と CysP がそれぞれ硫酸イオンとチオ硫酸イオンを CysTWA に受け渡す。野生株、*cysK* 欠損株、*cysM* 欠損株、*cysA* 欠損株を (B) 1 mM 硫酸ナトリウムもしくは (C) 1 mM チオ硫酸ナトリウム を単一硫黄源とする M9 培地に OD=0.02 となるように植菌し、37°C で培養した。(D) 野生株と *cysA* 欠損株を対数増殖期 (OD=0.5) まで培養し、KPB で洗浄後の細胞懸濁液に、グルコースを添加後 10 分に、 $[^{35}\text{S}]$ -硫酸ナトリウム を含む硫酸ナトリウムを終濃度 10 μM と共に、100 nM, 1, 10 μM チオ硫酸ナトリウムを添加し、硫酸イオンの細胞内への取り込み活性を調べた。

A



B

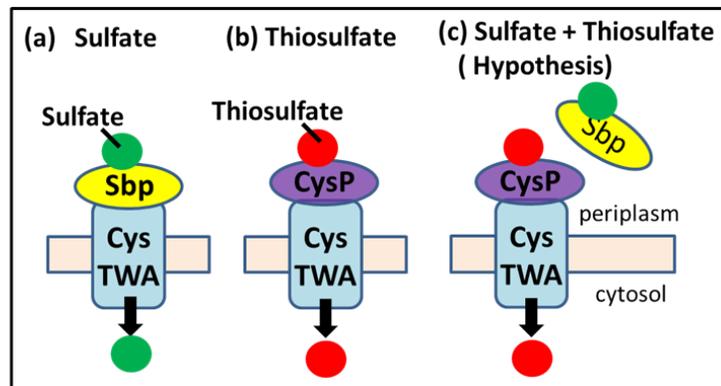


図 27 チオ硫酸イオンによる硫酸イオンの取り込み阻害

野生株 (BW25113) を対数増殖期 (OD=0.5) まで培養し、KPB で洗浄後の細胞懸濁液に、グルコースを添加後 10 分に、³⁵S-硫酸ナトリウムを含む硫酸ナトリウムを終濃度 10 µM と共に、100 nM, 1, 10 µM チオ硫酸ナトリウムを添加し、硫酸イオンの細胞内への取り込み活性を調べた。

次に、チオ硫酸イオンの存在が、硫酸イオンの取り込み活性に与える影響を調べた。具体的には、1, 10, 100 μM のチオ硫酸イオンが存在する条件において、対数増殖期まで培養した野生株の細胞懸濁液に、10 μM 硫酸イオン ($[^{35}\text{S}]$ -硫酸イオンを含む) を添加し、添加後 20 分間に取り込まれた $[^{35}\text{S}]$ -硫酸イオンを測定した。その結果、硫酸イオンとチオ硫酸イオンが等量 (10 μM) 存在する場合、硫酸イオンの取り込み活性が著しく阻害されることが判明した (図 27-A)。しかし、硫酸イオンに対するチオ硫酸イオンの比率を 1/10 量 (1 μM) に減少させると、硫酸イオンの取り込み阻害は緩和された。さらに、1/100 (0.1 μM) 量のチオ硫酸イオンでは、硫酸イオンの取り込み阻害は見られなかった。この結果より、チオ硫酸イオンによる硫酸イオンの取り込み抑制は、両イオンによる CysTWA への競合に起因することが推測された (図 27-B)。このことは、1 mM の硫酸イオンに対し、1/1,000 の濃度のチオ硫酸イオン (1 μM) により *cysM* 欠損株の生育を完全に阻害した結果と一致しない (図 25-B)。従って、チオ硫酸イオンによる硫酸イオンの同化を抑制する別の機構が存在することが示唆された。

2-3-3. チオ硫酸イオンによる硫酸経路遺伝子群の転写抑制

次に、転写レベルで硫酸経路が制御されていることを想定し、チオ硫酸添加条件下でのトランスクリプトーム解析を野生株、及び *cysM* 欠損株を用いて行った。具体的には、M9 (1 mM 硫酸ナトリウム) 培地で対数増殖期まで培養した培養液に 1 mM チオ硫酸イオン、もしくは滅菌水を添加して 5 分後の細胞を回収し、総 RNA を抽出した。マイクロアレイ解析の結果から、野生株において滅菌水を加えた場合と比較して、チオ硫酸イオンの添加により転写量が 2 倍以上減少、もしくは増加していた遺伝子をリストアップした (表 8, 9)。

興味深いことに、チオ硫酸添加によりチオ硫酸イオンと硫酸イオンの取り込みに関与する遺伝子群 (*cysPUWA*, *sbp*, *cysP*) や、シスチン、SSC、タウリン、GSH のインポーターに関与する遺伝子 (*ydjN*, *tauABD*, *gsiABCD*)、及び硫酸経路上のすべての遺伝子 (*cysDNC*, *CysJIH*, *cysK*) の転写が強く抑制されていた (表 7)。一方、チオ硫酸の添加により、メチオニン合成系の遺伝子群 (*metA*, *metBLF*, *metK*) の転写が有意に誘導されることも判明した (表 9)。また、予想外にチオ硫酸経路に必須である *cysM* 遺伝子の転写量も若干ではあるが減少していた (2.8 倍)。また、*tauD*、*gsiD* を除けば、野生株で転写が抑制されたすべての遺伝子の転写が *cysM* 欠損株においても抑制されることが確認できた (表 8)。

以上の結果から、チオ硫酸イオンの添加により硫酸経路遺伝子群を含む様々な硫黄代謝関連遺伝子の転写が強く抑制され、これが硫酸経路の不活性化を誘導する原因の一つと考えられた。

次に、1 mM 硫酸イオンを単一硫黄源とする M9 培地で対数増殖期まで培養した野生株の培養液に、低濃度 (1, 10, 100 μ M) のチオ硫酸イオンを添加し、硫酸経路の遺伝子群の転写量をリアルタイム PCR により調べた。その結果、低濃度のチオ硫酸イオンを添加しても、硫酸経路の *cysD*, *cysJ* *cysK* 遺伝子の転写は 1 mM チオ硫酸イオン添加時と同程度に抑制された (図 28)。一方、チオ硫酸イオンの添加では、チオ硫酸経路に必須の *cysM* 遺伝子の転写量は有意に変動しなかった。この結果は、1 mM の硫酸イオンに対し、1/1,000 の濃度のチオ硫酸イオン (1 μ M) により *cysM* 欠損株の生育を完全に阻害した結果と一致する (図 25-B)。以上より、TSR による硫酸経路の不活性化機構としては転写の抑制が本質的なものであることが強く示唆された。

。

表 8 チオ硫酸イオンにより転写抑制された遺伝子

野生株 (BW25113) 及び *cysM* 欠損株を対数増殖期 (OD=0.4) まで M9 (1 mM 硫酸ナトリウム) 培地で培養し、1 mM チオ硫酸ナトリウムを添加後 5 分の菌体を回収した。菌体から総 RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析に供した。以下に、チオ硫酸イオンの添加により、添加していない場合と比較し 2.0 倍以上変動した遺伝子を示した。

classification	gene	UP/DOWN	FoldChange	FUNCTION	Δ_{cysM}
sulfate pathway	<i>sbp</i>	DOWN	7.93	sulfate transporter subunit	no change
	<i>cysU</i>	DOWN	10.54	sulfate/thiosulfate transporter subunit	DOWN (27.7)
	<i>cysW</i>	DOWN	16.15	sulfate/thiosulfate transporter subunit	DOWN (26.0)
	<i>cysA</i>	DOWN	22.90	sulfate/thiosulfate transporter subunit	DOWN (3.91)
	<i>cysN</i>	DOWN	27.52	sulfate adenylyltransferase, subunit 1	DOWN (5.93)
	<i>cysD</i>	DOWN	38.22	sulfate adenylyltransferase, subunit 2	DOWN (8.04)
	<i>cysC</i>	DOWN	31.52	adenosine 5'-phosphosulfate kinase	DOWN (19.1)
	<i>cysH</i>	DOWN	32.50	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate reductase	DOWN (4.29)
	<i>cysT</i>	DOWN	40.70	sulfite reductase, beta subunit, NAD(P)-binding, heme-binding	DOWN (20.5)
	<i>cysJ</i>	DOWN	32.76	sulfite reductase, alpha subunit, flavoprotein	DOWN (42.6)
	<i>cysK</i>	DOWN	2.99	cysteine synthase A, O-acetylcysteine sulfhydrolyase A subunit	DOWN (5.79)
thiosulfate pathway	<i>cysM</i>	DOWN	2.85	cysteine synthase B (O-acetylcysteine sulfhydrolyase B)	no change
	<i>cysP</i>	DOWN	5.56	thiosulfate transporter subunit	DOWN (25.4)
taurine utilization	<i>tauA</i>	DOWN	3.03	taurine transporter subunit	DOWN (4.55)
	<i>tauB</i>	DOWN	2.56	taurine transporter subunit	DOWN (4.76)
	<i>tauD</i>	DOWN	3.29	taurine dioxygenase, 2-oxoglutarate-dependent	no change
GSH utilization	<i>iaaA</i>	DOWN	2.06	L-asparaginase	DOWN (3.34)
	<i>gsiA</i>	DOWN	2.77	ATP-binding components of glutathione ABC transporter	DOWN (3.22)
	<i>gsiB</i>	DOWN	3.07	predicted glutathione transporter subunit of ABC superfamily	DOWN (4.27)
	<i>gsiC</i>	DOWN	3.02	predicted glutathione transporter subunit of ABC superfamily	DOWN (3.63)
	<i>gsiD</i>	DOWN	2.41	predicted glutathione transporter subunit of ABC superfamily	no change
other sulfur metabolism	<i>yeoD</i>	DOWN	2.73	conserved protein	DOWN (5.6)
	<i>yeoE</i>	DOWN	5.26	putative transport system permease protein	DOWN (16.6)
	<i>yciW</i>	DOWN	16.51	predicted oxidoreductase	DOWN (38.1)
	<i>ydiN</i>	DOWN	6.63	cysteine importer transporter	DOWN (23.0)
	<i>yobE</i>	DOWN	3.70	conserved inner membrane protein	DOWN (7.82)

表 9 チオ硫酸イオンにより転写誘導された遺伝子

野生株 (BW25113) 及び *cysM* 欠損株を対数増殖期 (OD=0.4) まで M9 (1 mM 硫酸ナトリウム) 培地で培養し、1 mM チオ硫酸ナトリウムを添加後 5 分の菌体を回収した。菌体から総 RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析に供した。以下に、チオ硫酸イオンの添加により、添加していない場合と比較し 2.0 倍以上変動した遺伝子を示した。

classification	gene	UP/DOWN	FoldChange	FUNCTION	Δ_{cysM}
methionine synthetic pathway	<i>metA</i>	UP	2.23	homoserine O-transsuccinylase	no change
	<i>metB</i>	UP	2.49	cystathionine gamma a-synthase, PLP-dependent	no change
	<i>metL</i>	UP	2.32	fused aspartokinase II/homoserine dehydrogenase II	no change
	<i>metF</i>	UP	2.91	5,10-methylene tetrahydrofolate reductase	no change
	<i>metK</i>	UP	2.48	methionine adenylyltransferase 1	no change
other function	<i>yfeH</i>	UP	3.64	putative cytochrome oxidase	UP (6.15)
	<i>ilvL</i>	UP	2.60	ilvG operon leader peptide	no change
	<i>mgsA</i>	UP	2.31	predicted DNA-binding transcriptional regulator	no change

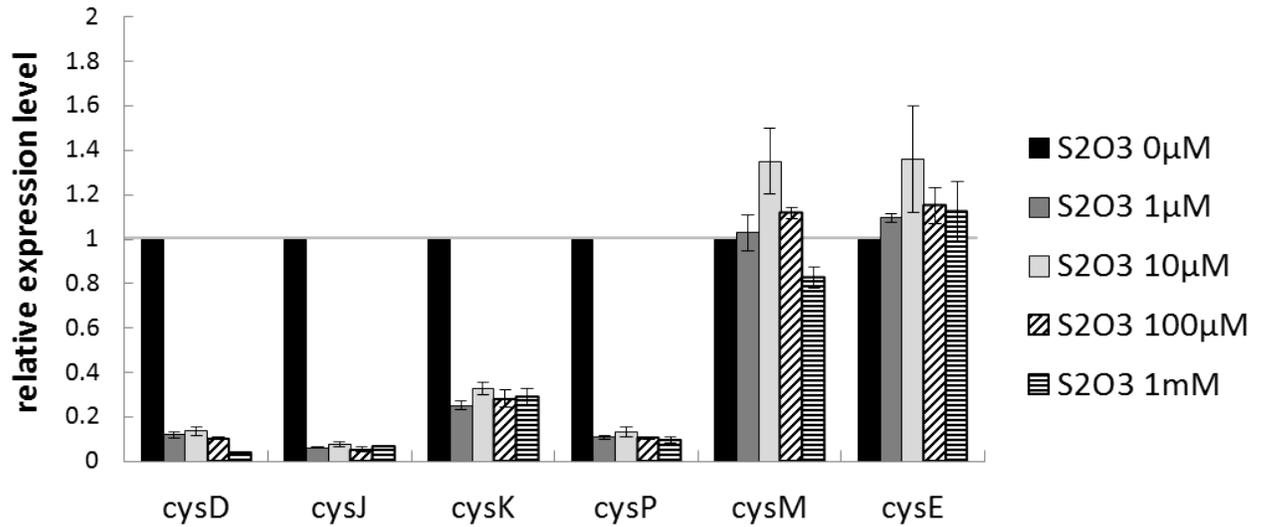


図 28 低濃度のチオ硫酸イオンによる硫酸経路遺伝子の転写抑制効果

1mM 硫酸ナトリウムを単一硫黄源として含む M9 培地で OD=0.4 まで培養した野生株培養液に、1, 10, 100 μM, 1mM チオ硫酸ナトリウムを添加し 5 分後の菌体 1 ml から RNA を抽出し、RT-PCR に供した。硫酸イオンで培養している状態の各遺伝子の mRNA 量を 1 として、チオ硫酸イオン添加時の mRNA 量を相対値で示した。相対値 0.5 以下で転写抑制、相対値 2 以上で転写誘導されているとする。

2-3-4. チオ硫酸イオンは CysB 依存的に硫黄同化関連遺伝子の転写を抑制する

次に、転写抑制に関わるチオ硫酸イオンの標的分子の探索を試みた。硫黄同化関連遺伝子の転写を誘導する転写因子として CysB が知られている。Cys 合成時には、Cys 合成系の初発酵素である CysE (図 19) により合成された OAS の非酵素的変換体 NAS がインデューサーとして転写因子 CysB に結合する。その結果、活性化された CysB タンパク質が、硫黄同化経路に関連する一連の遺伝子群の上流配列に結合することで、これら遺伝子の転写を誘導する。1992 年に Hryniewicz らにより、チオ硫酸イオンが CysB の転写誘導活性を阻害することが *in vitro* の転写実験により報告されていた (Hryniewicz and Kreditch, 1992)。しかしながら、未だその生理的意義などは不明であった。これらの報告を踏まえ、TSR における転写抑制が CysB に依存するのかを検証した。具体的には、NAS の結合に依存せず構成的に CysB レギュロンの転写を誘導する CysB 変異体 (CysB^{Thr149Pro}) (Colyer and Kreditch, 1994) を用いて実験を行った。

野生型の CysB または、CysB^{Thr149Pro} を *cysM* 欠損株にそれぞれ導入し、TSR の表現型への影響について調べた。その結果、空ベクターを導入した *cysM* 欠損株と、野生型の CysB を過剰発現した *cysM* 欠損株は、いずれも硫酸イオンとチオ硫酸イオンを含む M9 培地で生育せず TSR の表現型が観察された (図 29-B)。しかし、興味深いことに CysB^{Thr149Pro} を過剰発現した *cysM* 欠損株では、同培地で Sup1 株同様に培養初期から良好な生育を示し、TSR が解除されていることが示唆された (図 29-B)。さらに、CysB^{Thr149Pro} を過剰発現する *cysM* 欠損株は、チオ硫酸イオン添加条件でも硫黄同化経路関連遺伝子群の転写が抑制されなかった (図 30)。以上より、構成的活性化型 CysB の発現により、硫黄同化関連遺伝子群の転写誘導が維持され、TSR が起こらなくなることが判明した。つまり、チオ硫酸イオンによる硫黄同化関連遺伝子の転写抑制は、転写因子 CysB 依存的に起こることが示された。

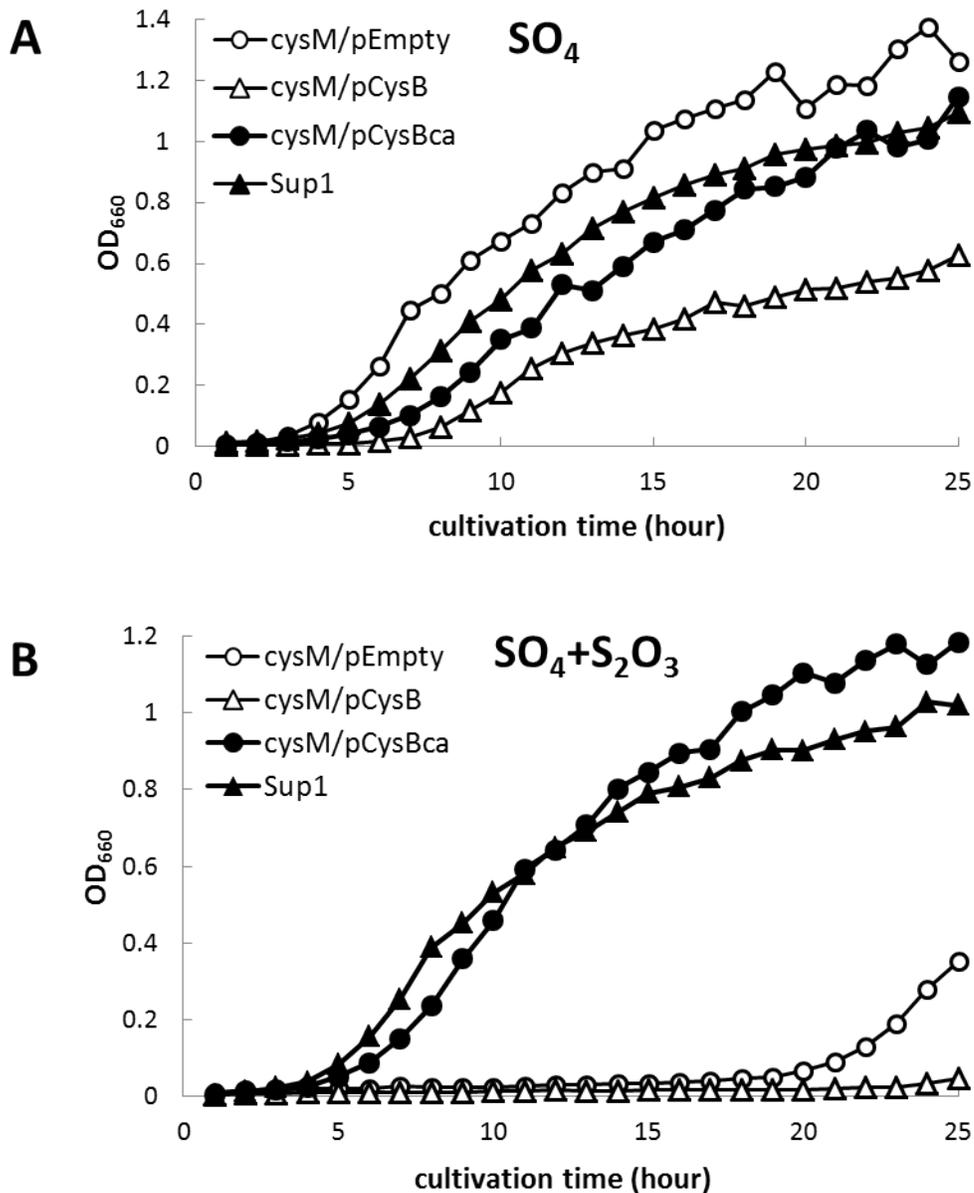


図 29 *cysM* 欠損株における構成的活性化型 CysB の過剰発現

cysM 欠損株に、空ベクター、野生型 CysB、及び構成的活性化型 CysB^{Thr149Pro} (CysBca) を発現するベクターを導入した 3 株と Sup1 株の前培養液をそれぞれ(A) 1mM 硫酸ナトリウム、もしくは(B) 1mM 硫酸ナトリウム + 1mM チオ硫酸ナトリウムを硫黄源として含む M9 培地に OD=0.02 となるように植菌し、37°C で培養した。

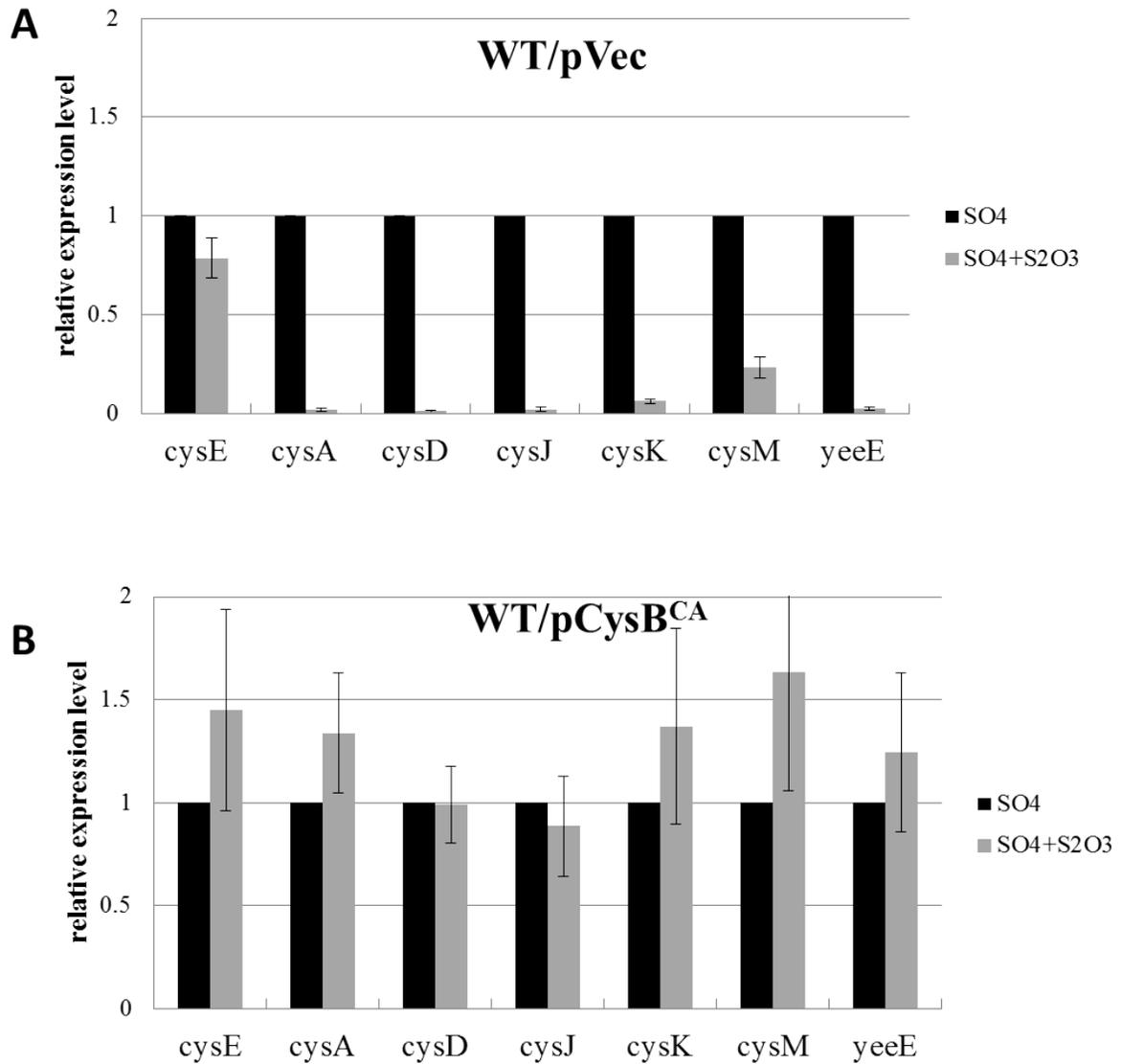


図 30 構成的活性化型 CysB 発現株におけるチオ硫酸イオンに対する転写応答

1mM 硫酸ナトリウムを単一硫黄源として含む M9 培地で OD=0.4 まで、(A) 空ベクター (pEmpty) 及び (B) 構成的活性化型 CysB^{Thr149Pro} を発現するベクター (pCysB^{CA}) を導入した野生株を培養し、1mM チオ硫酸ナトリウムを添加、もしくは添加無し、5 分後の菌体 1 ml から RNA を抽出し、RT-PCR に供した。硫酸イオンで培養している状態の各遺伝子の mRNA 量を 1 とし、チオ硫酸イオン添加時の mRNA 量を相対値で示した。相対値 0.5 以下で転写抑制、相対値 2 以上で転写誘導されているとする。

2-3-5. TSR が起こらないサプレッサー変異株 Sup1 の解析

TSR における硫酸経路遺伝子の転写抑制が転写因子 CysB に依存することはわかったが、チオ硫酸イオンがどのようなメカニズムで CysB に作用するのかなどは不明である。また、転写と取り込み以外の制御が存在する可能性も考えられる。そこで、TSR が起こらなくなった変異株を単離することで、TSR の制御に関与する遺伝子を同定し、TSR に関わる遺伝子を網羅的に探索しようと考えた。そのために以下の2つの実験を実施した。(1) 自然突然変異による TSR に関するサプレッサー変異株の単離、(2) 二重欠損株ライブラリー ($\Delta cysM \times \Delta X$) を用いた TSR に関与する遺伝子の同定、である。図 24 で示すように、*cysM* 欠損株はチオ硫酸と硫酸を添加した培地ではほとんど生育できない。これら 2 つの異なる方法によって上記の条件でも生育できる *cysM* 欠損株を単離し、変異点を解析することで、TSR に関与する遺伝子を探索した。

2-3-5-1. TSR が起こらないサプレッサー変異株 Sup1 の単離

TSR に関与する遺伝子の同定を目的に、*cysM* 欠損株をチオ硫酸イオンと硫酸イオンを含む M9 培地で培養し続け、自然突然変異により同条件でも生育可能になるサプレッサー変異株の単離を試みた。その結果、培養 22 時間ほどで *cysM* 欠損株の濁度が上昇し、最終的に野生株並みに増殖した (図 31)。次に、約 40 時間の培養により、増殖した培養液から、この変異株のシングルコロニー分離を行い、チオ硫酸イオンと硫酸イオンを含む M9 培地に再度植菌し、その増殖曲線を調べた。その結果、この変異株は培養約 4 時間目から濁度が上昇し、野生株と同様に生育できることが明らかとなった (図 31)。また、この野生株並みの増殖が *cysM* 遺伝子の復帰変異でないことは、コロニーPCR や DNA シーケンスによって確認した。以上の結果から、自然突然変異により TSR が起きなくなった *cysM* 欠損サプレッサー変異株を単離することができ、この変異株を Sup1 と名付けた。

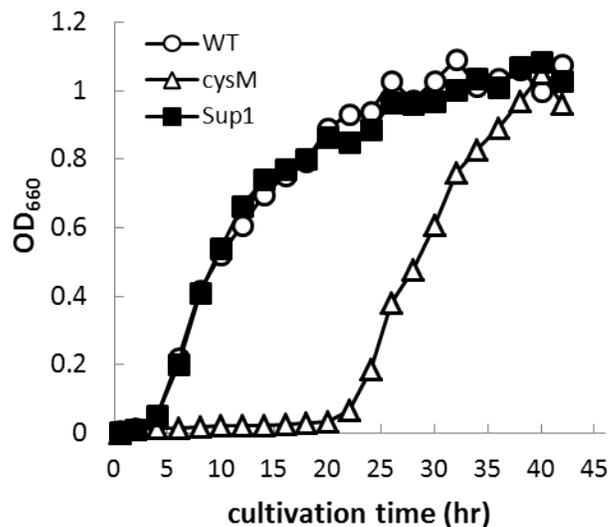


図 31 TSR が起こらない *cysM* 欠損サプレッサー変異株の単離

野生株、*cysM* 欠損株、*cysM* 欠損サプレッサー変異株 (Sup1 の前培養液を 1mM 硫酸ナトリウム +1mM チオ硫酸ナトリウムを硫黄源として含む M9 培地に OD=0.02 となるように植菌し、37°C で培養した。

2-3-5-2. 次世代シーケンサーを用いた Sup1 の変異点解析

次に、2-3-5-1 で単離した Sup1 株の変異点を同定するために、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を行った。Sup1 株、及び親株である *cysM* 欠損株のゲノムを抽出・精製し、454 GS junior (Roche 社製) を用いてリシーケンスを実施した。ゲノム解析の結果、両株共に平均約 480 bp の長鎖リードが約 20 万本近く得られ、*cysM* 欠損株では約 84 Mbp、Sup1 では約 98 Mbp の配列情報を取得できた (表 10)。大腸菌ゲノムが約 5 Mbp であることを考えると、*cysM* 欠損株では大腸菌ゲノム約 16 周分、Sup1 では約 20 周分と、変異点解析には十分な量のゲノム情報と考えられた。また、リードの平均長が 480 bp と Solid など他の次世代シーケンサーを用いた場合よりも長いリードでの解析が行えた。

表 10 454 GS junior によって得られた配列情報量

	cysM (bp)	Sup1 (bp)
average read length	485.4	471.75
passed filter wells	173,222	208,381
total bases	84,082,287	98,303,267

野生株として用いた BW25113 株はゲノムが決定されていない。そのため、BW25113 の近縁と考えられている MG1655 株のゲノム情報に 454 GS junior により取得したゲノム情報をマッピングし、両ゲノム間の SNPs 及び、20 bp 以上の変異を比較した。SNPs 解析の結果、MG1655 株に対して *cysM* 欠損株及び Sup1 間に生じている SNPs には差がなかった (表 12)。次に、20 bp 以上の変異を比較した結果、大変興味深いことに、Sup1 においてのみチオ硫酸イオン結合タンパク質 CysP をコードする *cysP* 遺伝子内に 81 bp の欠失が生じていることが判明した (表 12、図 32)。

次に、Sup1 株における TSR の解除が *cysP* 遺伝子に生じた 81 bp の欠失に依存するのかを調べるために、同定した欠失を人為的に導入した *cysM* 欠損株の変異株 (*cysM/cysP*⁸¹ 株) を構築した。*cysM/cysP*⁸¹ 株をチオ硫酸イオンと硫酸イオンを含む M9 培地で培養したところ、Sup1 と同様に培養初期から良好に生育した (図 33-A)。さらに、Sup1 株に野生型 CysP を発現するプラスミド pCysP を導入したが、*cysM* 欠損株と同様に生育できず、TSR の表現型が回復した (図 33-B)。以上の結果より、Sup1 株における TSR の解除は、*cysP* 遺伝子内に生じた 81 bp の欠失に起因することが明らかとなった。

表 11 SNP の比較 (20 bp 以下の挿入及び欠失)

MG1655 と *cysM* 欠損株及び、MG1655 と Sup1 それぞれの菌株間の 20bp 以下の変異を比較した。

A. MG1655 vs $\Delta cysM$

Pos	Nuc	Nuc	Depth	Freq	AA	AA	Name
70289	G	T	12	100%			
365743	G	A	19	100%	A	V	lacI
446860	C	-	13	100%	W	W	cyoE
502653	C	T	18	100%			
547694	A	G	17	100%			
704236	T	C	12	100%	W	R	nagE
1335418	A	G	23	96%	K	K	acnA
1650355	T	C	15	100%			
2842032	G	T	18	100%	R	R	hycG
3108443	C	A	18	100%			
3957957	C	T	19	100%			
4091793	C	T	14	100%	G	D	rhaD
4092014	T	G	12	100%	K	N	rhaD
4092015	T	C	12	100%	K	R	rhaD
4092016	T	A	12	100%	K	*	rhaD
4092018	A	G	12	100%	V	A	rhaD
4092020	-	G	12	100%	I	I	rhaD
4092023	G	C	12	100%	G	G	rhaD
4092024	-	T	12	100%	G	E	rhaD
4095475	-	G	15	100%			
4159271	G	T	19	100%	A	S	fabR
4162146	C	G	10	100%	Q	E	btuB
4294404	-	GC	19	100%			
4472857	A	G	13	100%			
4583503	G	A	12	100%	Q	*	hsdR
4600532	C	T	11	100%	W	*	yjiP
4614692	G	T	17	100%	L	I	yjiI

B. MG1655 vs Sup1

Pos	Nuc	Nuc	Depth	Freq	AA	AA	Name
66528	T	C	18	100%	Q	R	araD
365743	G	A	18	100%	A	V	lacI
446860	C	-	14	100%	W	W	cyoE
502653	C	T	23	100%			
547694	A	G	20	100%			
547835	-	G	18	100%			
704236	T	C	14	100%	W	R	nagE
1335418	A	G	14	100%	K	K	acnA
1650355	T	C	30	100%			
2842032	G	T	9	100%	R	R	hycG
3108443	C	A	18	100%			
3957957	C	T	17	100%			
4091793	C	T	16	100%	G	D	rhaD
4092014	T	G	7	100%	K	N	rhaD
4092015	T	C	7	100%	K	R	rhaD
4092016	T	A	7	100%	K	*	rhaD
4092018	A	G	7	100%	V	A	rhaD
4092020	-	G	7	100%	I	I	rhaD
4092023	G	C	7	100%	G	G	rhaD
4092024	-	T	7	100%	G	E	rhaD
4095475	-	G	15	100%			
4159271	G	T	22	100%	A	S	fabR
4162146	C	G	20	100%	Q	E	btuB
4294404	-	GC	17	100%			
4472857	A	G	18	100%			
4583503	G	A	10	100%	Q	*	hsdR
4600532	C	T	23	100%	W	*	yjiP
4614692	G	T	15	100%	L	I	yjiI

表 12 20 bp 以上の変異の比較

MG1655 と *cysM* 欠損株及び、MG1655 と Sup1 それぞれの菌株間の 20bp 以上の変異を比較した。

A. MG1655 vs Δ *cysM*

Type	SubjPos1	Region1	SubjPos2	Region2	Length
Circle	1		4639675		4639675
Sub	66532	<i>araD</i>	70072		3539
Sub	363579	<i>lacZ</i>	365643		2063
Deletion	2302594		2302821		226
Deletion	2518952		2519073		120
Deletion	2519027		2519148		120
Sub	2536714	<i>cysM</i>	2537602	<i>cysM</i>	887
Deletion	4092030	<i>rhaD</i>	4095469	<i>rhaB</i>	3438

B. MG1655 vs Sup1

Type	SubjPos1	Region1	SubjPos2	Region2	Length
Circle	1		4639675		4639675
Sub	66532	<i>araD</i>	70072		3539
Deletion	2302594		2302821		226
Sub	2536714	<i>cysM</i>	2537602	<i>cysM</i>	887
Deletion	2540651	<i>cysP</i>	2540733	<i>cysP</i>	81
Deletion	2945488		2945599		110
Deletion	4092030	<i>rhaD</i>	4095469	<i>rhaB</i>	3438
Deletion	4294292		4294404		111

```

cysP      1:ATGGCCGTAACTTACTGAAAAAGAACTCACTCGCGCTGGTTCGCTTCTCTGCTGCTGGCG 60
cysP-sup  1:ATGGCCGTAACTTACTGAAAAAGAACTCACTCGCGCTGGTTCGCTTCTCTGCTGCTGGCG 60
          *

cysP      61:GGCCATGTACAGGCAACGGAACGTGTAACAGTTCTTATGACGTCTCCCAGAGCTGTTT 120
cysP-sup  61:GGCCATGTACAGGCAACGGAACGTGTAACAGTTCTTATGACGTCTCCCAGAGCTGTTT 120
          *

cysP      121:GCCGCCCTGAATCCGCCGTTTGGAGCAACAATGGGCAAAAGATAACGGCGGCGACAACTG 180
cysP-sup  121:GCCGCCCTGAATCCGCCGTTTGGAGCAACAATGGGCAAAAGATAACGGCGGCGACAACTG 180
          *

cysP      181:ACGATAAAAACAATCTCATGCCGGGTCATCAAAACAGGCGCTGGCGATTTTACAGGGCTTA 240
cysP-sup  181:ACGATAAAAACAATCTCATGCCGGGTCATCAAAACAGGCGCTGGCGATTTTACAGGGCTTA 240
          *

cysP      241:AAAGCCGACGTTGTCACTTATAACCAGGTGACCGACGTACAAATCCTGCACGATAAAGGC 300
cysP-sup  241:AAAGCCGACGTTGTCACTTATAACCAGGTGACCGACGTACAAATCCTGCACGATAAAGGC 300
          *

cysP      301:AAGCTGATCCCAGGCGACTGGCAGTCGCGCCTGCCGAATAATAGCTCGCCGTTCTACTCC 360
cysP-sup  301:AAGCTGATCCCAGGCGACTGGCAGTCGCGCCTGCCGAATAATAGCTCGCCGTTCTACTCC 360
          *

cysP      361:ACCATGGGCTTCTCGGTGCGTAAGGGTAACCCGAAGAATATCCACGATTGGAACGACCTG 420
cysP-sup  361:ACCATGGGCTTCTCGGTGCGTAAGGGTAACCCGAAGAATATCCACGATTGGAACGACCTG 420
          *

cysP      421:GTGCGCTCCGACGTGAAGCTGATTTTCCCGAACCCGAAAACGTCGGGTAACGCGGTTAT 480
cysP-sup  421:GTGCGCTCCGACGTGAAGCTGATTTTCCCGAACCCGAAAACGTCGGGTAACGCGGTTAT 480
          *

cysP      481:ACCTATCTGGCGGCATGGGGCGCAGCGGATAAAGCTGACGGTGGTGACAAAGGCAAAAC 540
cysP-sup  481:ACCTATCTGGCGGCATGGGGCGCAGCGGATAAAGCTGACGGTGGTGACAAAGGCAAAAC 540
          *

cysP      541:GAACAGTTTATGACCCAGTTCTGAAAAACGTTGAAGTGTTTCGATACTGGCGGTCGTGGC 600
cysP-sup  541:GAACAGTTTATGACCCAGTTCTGAAAAACGTTGAAGTGTTTCGATACTGGCGGTCGTGGC 600
          *

cysP      601:GCGACCACCACTTTTGCCGAGCGCGGCTGGGCGATGTGCTGATTAGCTTCGAATCGGAA 660
cysP-sup  601:GCGACCACCACTTTTGCCGAGCGCGGCTGGGCGATGTGCTGATTAGCTTCGAATCGGAA 660
          *

cysP      661:GTGAACAACATCCGTAAACAGTATGAAGCGCAGGGCTTTGAAGTGGTGATTCCGAAAAC 720
cysP-sup  661:GTGAACAACATCCGTAAACAGTATGAAGCGCAGGGCTTTGAAGTGGTGATTCCGAAAAC 720
          *

cysP      721:AACATTTCTGGCGGAATTCCCGGTGGCGTGGGTTGATAAAAACGTCGAGGCCAACGGTACG 780
cysP-sup  721:AACATTTCTGGCGGAATTCCCGGTGGCGTGGGTTGATAAAAACGTCGAGGCCAACGGTACG 780
          *

cysP      781:GAAAAAGCCGCCAAAGCCTATCTGAACTGGCTCTATAGCCCGCAGGCGCAAACCATCATC 840
cysP-sup  781:GAAAAAGCCGCCAAAGCCTATCTGAACTGGCTCTATAG----- 827
          *

cysP      841:ACCGACTATTACTACCGCGTGAATAACCCGGAGGTGATGGACAAACTGAAAGACAAATTC 900
cysP-sup  827:----- 827
          *

cysP      901:CCGCAGACCGAGCTGTTCCGCGTGGAAAGACAAATTTGGCTCCTGGCCGGAAGTGATGAAA 960
cysP-sup  828:CCGCAGACCGAGCTGTTCCGCGTGGAAAGACAAATTTGGCTCCTGGCCGGAAGTGATGAAA 879
          *

cysP      961:ACCCACTTCACCAGCGGCGGCGAGTTAGACAAGCTGTTAGCGGCGGGGCGTAACTGA 1017
cysP-sup  880:ACCCACTTCACCAGCGGCGGCGAGTTAGACAAGCTGTTAGCGGCGGGGCGTAACTGA 936
          *

```

図 32 Sup1 株の *cysP* 遺伝子内に同定された欠失領域

The nucleotide sequence alignment for *cysP* of WT and *cysP* of Sup1 was performed using the online tool ClustalW2 (available at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Dashes indicate the deletion of corresponding nucleotide at the positions. Identical nucleotides in two sequences are shown as asterisks.

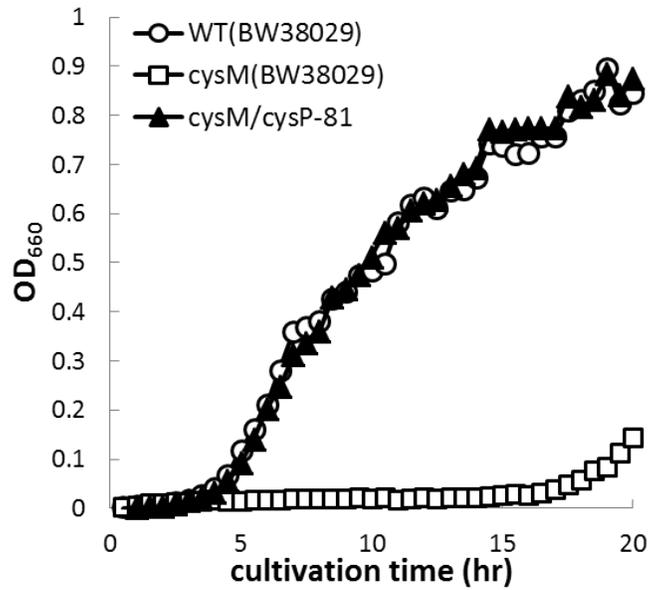
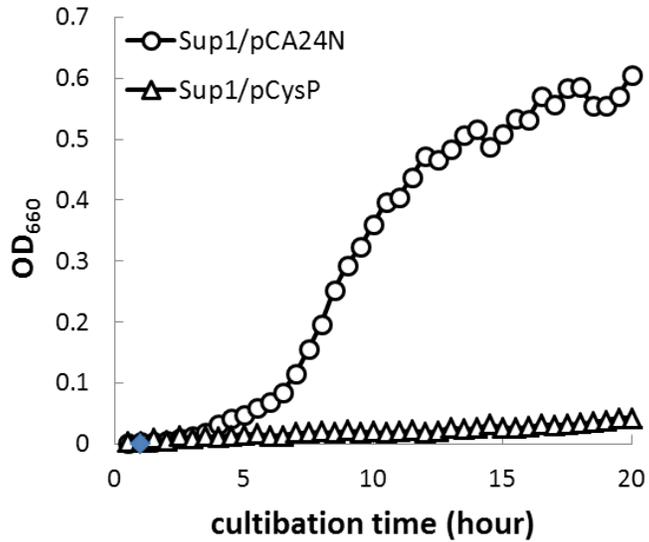
A**B**

図 33 *cysP* 遺伝子内の 81 bp の欠失が TSR を解除する

野生株、*cysM* 欠損株、*cysM/cysP*⁸¹ 株（人工的にサプレッサー変異を導入した株）のの前培養液を 1mM 硫酸ナトリウム+1mM チオ硫酸ナトリウムを硫黄源として含む M9 培地に OD=0.02 となるように植菌し、37°C で培養した。

2-3-5-3. *cysP* 遺伝子へのサプレッサー変異による取り込み抑制及び転写抑制の解除

TSR の表現型である硫酸イオンの取り込み抑制、及び硫酸経路遺伝子群の転写抑制が Sup1 株で起こるかを調べた。

まず Sup1 株においても、チオ硫酸イオンによる硫酸イオンの取り込み抑制が起きるかを調べた。その結果、Sup1 株においては硫酸イオンと等量のチオ硫酸イオンを添加しても、野生株で観察された硫酸イオンの取り込み阻害が見られなかった (図 34)。チオ硫酸イオンによる硫酸イオンの取り込み阻害は、CysTWA 上での両基質の競合と推測されることから、サプレッサー変異によりチオ硫酸イオンの取り込みに関わる CysP が機能欠損していることが示唆された。

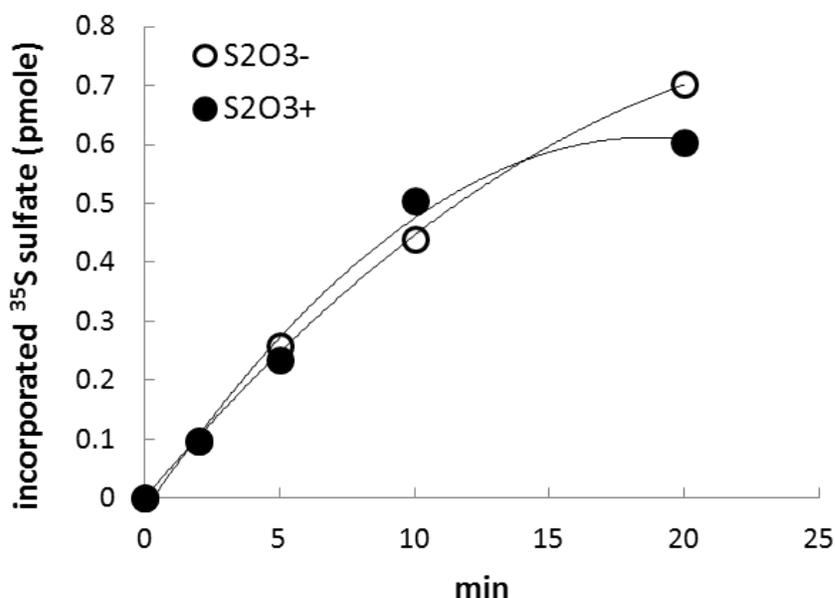


図 34 Sup1 株における硫酸イオンの取り込み阻害の解除

Sup1 株を対数増殖期 (OD=0.5) まで培養し、KPB で洗浄後の細胞懸濁液に、グルコースを添加 10 分後に、³⁵S-硫酸ナトリウムを含む硫酸ナトリウムを終濃度 1 μM と共に、1 μM チオ硫酸ナトリウムを添加し、20 分間の硫酸イオンの細胞内への取り込み活性を調べた。

次に、Sup1 株でチオ硫酸イオン添加による硫黄同化関連遺伝子の転写抑制が起きるかを、トランスクリプトーム解析により調べた。2-3-2 と同様に、硫酸イオン

を硫黄源として Sup1 を対数増殖期まで培養し、チオ硫酸イオン、もしくは滅菌水を添加 5 分後に Sup1 株の総 RNA を抽出し、以下の工程を 2-3-2 と同様に進めた。

表 8 で既に示すように、野生株で転写が抑制された遺伝子について、Sup1 における mRNA レベルの変化量をまとめた (表 13)。その結果、興味深いことに、Sup1 株ではチオ硫酸イオンを添加しても、野生株や *cysM* 欠損株において転写が抑制された硫黄代謝関連遺伝子群の mRNA レベルは有意に変動しなかった (Fold change が 2 以下) (表 13)。この結果より、Sup1 株ではチオ硫酸イオン添加条件でも、硫酸経路遺伝子群含む硫黄同化関連遺伝子群の誘導が維持されることが明らかとなった。以上より、この転写抑制の解除により Sup1 株は TSR が解除されると考えられた。

表 13 チオ硫酸イオン添加時の Sup1 株における硫黄代謝関連遺伝子の転写
野生株 (BW25113) を対数増殖期 (OD=0.4) まで M9 (1 mM 硫酸ナトリウム) 培地で培養し、1 mM チオ硫酸ナトリウムを添加後 5 分の菌体を回収した。菌体から総 RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析に供した。以下に、チオ硫酸イオンの添加により、添加していない場合と比較し 2.0 倍以上変動した遺伝子を示した。

classification	gene	UP/DOWN	FoldChange	FUNCTION
sulfate pathway	<i>sbp</i>	no change	1.18	su lfate transporter subun it
	<i>cysJ</i>	no change	1.23	su lfate/ th iosu lfate transporter subun it
	<i>cysW</i>	no change	1.37	su lfate/ th iosu lfate transporter subun it
	<i>cysA</i>	no change	1.37	su lfate/ th iosu lfate transporter subun it
	<i>cysN</i>	no change	1.26	su lfate adeny ly ltransferase, subun it 1
	<i>cysD</i>	no change	1.23	su lfate adeny ly ltransferase, subun it 2
	<i>cysC</i>	no change	1.20	adenos ine 5'-phosphosu lfate kinase
	<i>cysH</i>	no change	1.06	3'-phosphoadenos ine 5'-phosphosu lfate reductase
	<i>cysI</i>	no change	1.27	su lfite reductase, beta subun it, NAD (P)-b nding, hem e-b nding
	<i>cysI</i>	no change	1.18	su lfite reductase, alpha subun it, flavoprote in
	<i>cysK</i>	no change	1.05	cyste ine synthase A, O -acety lserine su lfhydro lase A subun it
thiosulfate pathway	<i>cysP</i>	no change	1.39	th iosu lfate transporter subun it
taurine utilization	<i>tauA</i>	no change	1.09	taurine transporter subun it
	<i>tauB</i>	no change	1.12	taurine transporter subun it
	<i>tauC</i>	no change	1.35	taurine dioxygenase, 2-oxog lutarate-dependent
GSH utilization	<i>iaaA</i>	no change	1.02	L-asparaginase
	<i>gsiA</i>	no change	1.12	ATP-b nding components of glutathione ABC transporter
	<i>gsiB</i>	no change	1.31	predicted glutathione transporter subun it of ABC superfam ily
	<i>gsiC</i>	no change	1.48	predicted glutathione transporter subun it of ABC superfam ily
	<i>gsiD</i>	no change	1.40	predicted glutathione transporter subun it of ABC superfam ily
other sulfur metabolism	<i>yeeD</i>	no change	1.22	conserved prote in
	<i>yeeE</i>	no change	1.07	putative transport system permease prote in
	<i>yciW</i>	no change	1.08	predicted oxidoreductase
	<i>yhbE</i>	no change	1.16	conserved inner membrane prote in

2-3-5-4. Sup1 株は YeeDE 依存的にチオ硫酸イオンを硫黄源として生育する

次に、Sup1 株の表現型をさらに詳細に調べた。上述した通り、Sup1 株は TSR により *cysM* 欠損株が生育できないチオ硫酸イオンと硫酸イオンを含む M9 培地で良好に生育する。当初、これは TSR が解除され硫酸経路が働くためだと考えていた。しかしながら、予想に反し、チオ硫酸イオンを単一硫黄源とする培地でも Sup1 株は良好な生育を示した (図 36-B)。さらに、硫酸イオンとチオ硫酸イオンの両方を含む M9 培地で Sup1/ Δ *cysD* 株は生育できるのに対して、Sup1/ Δ *cysK* 株は生育できなかった (図 36-C)。また、大腸菌は細胞質内で SSC を Cys と亜硫酸イオンへと還元することから (図 35、反応式 (1)) (Nakatani *et al.*, 2012)、細胞内に取り込まれたチオ硫酸イオンを、SSC を経由することなく、硫化物イオンと亜硫酸イオンへと変換するバイパスが存在することを想像させる (図 35、反応式 (2) または (3))。

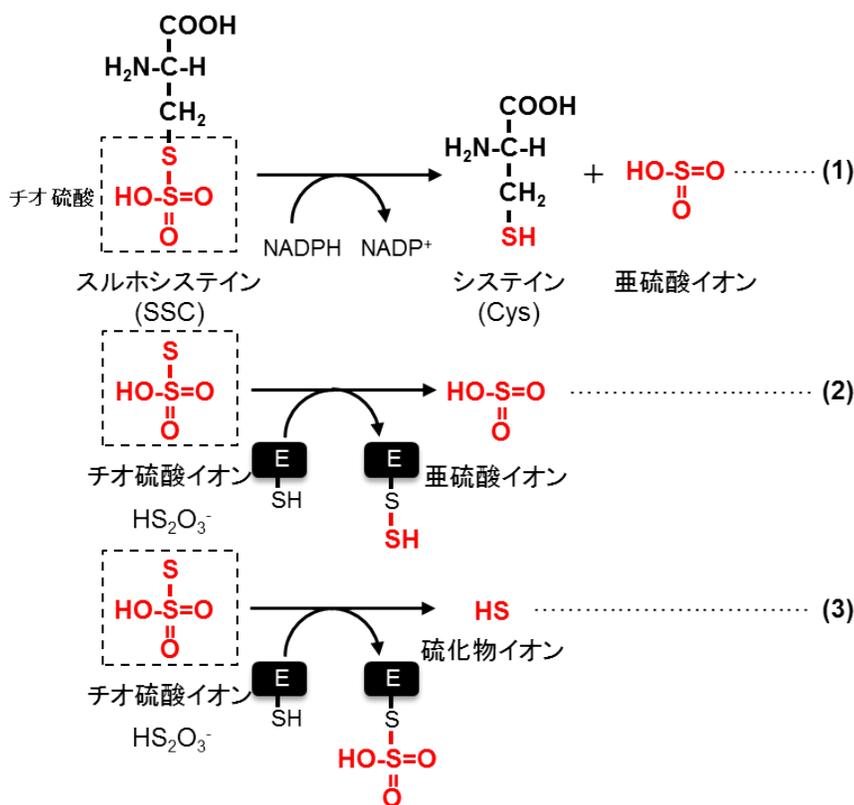


図 35 硫黄転移酵素による新規なチオ硫酸イオン利用経路

そこで、この反応を触媒できる硫黄転移酵素の関与について解析を行った（図 35、反応式 (2) または (3)）。大腸菌ゲノム上で硫黄転移酵素を検索したところ、14 種類の候補遺伝子を見出した。これら遺伝子を *cysM* 欠損株にそれぞれ導入したところ、チオ硫酸イオン単一硫黄源で野生株並みに生育が回復する *glpE*、*pspE*、*yeeD* の 3 遺伝子を同定した。これら 3 遺伝子をそれぞれ欠損させた *Sup1/ΔglpE* 株、*Sup1/ΔpspE* 株、*Sup1/ΔyeeD* 株を構築し、同様に各種硫黄源での生育を調べた。その結果、*Sup1/ΔglpE* 株と *Sup1/ΔpspE* 株はチオ硫酸イオンを単一硫黄源とする培地で *Sup1* 株と同様に良好に生育した（図 37-B）。しかしながら、*Sup1/ΔyeeD* 株は、全く生育しないことから、*YeeD* タンパク質の Cys 残基がチオ硫酸イオンの一方の硫黄原子を求核攻撃し、亜硫酸イオンまたは硫化物イオンが転移する反応が考えられた（図 35、反応式 (1) または (2)）。また、この反応によりチオ硫酸イオンから生じた硫化物イオンまたは亜硫酸イオンが、硫酸経路を介して Cys へと変換される新規なバイパス経路が存在することが示唆された（図 39）。

また、*yeeD* 遺伝子が機能未知タンパク質 *yeeE* 遺伝子とオペロンを形成しており、さらに味の素社より、その *YeeE* タンパク質がチオ硫酸イオンの取り込みに関与すると報告されていた。これらの結果を考え合わせると、*YeeE* が *YeeD* と協調してチオ硫酸イオンの取り込み、及びその同化に関与するモデルが考えられた。実際に、膜タンパク質の予測プログラム SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) による解析から、*YeeE* タンパク質は 9 回膜貫通領域を有する内膜タンパク質であると推定された。この結果を踏まえ、*Sup1/ΔyeeE* 株を構築し、チオ硫酸イオンを単一硫黄源とする培地で *Sup1/ΔyeeE* 株の生育について調べたところ、*Sup1/ΔyeeD* 株と同様に全く生育できないことが判明した（図 37-B）。さらに、既知のチオ硫酸インポーターである *CysTWA* が機能しない Δ *cysA* 株は、チオ硫酸イオンを単一硫黄源とする培地で生育できるのに対し、 Δ *cysA* Δ *yeeE* 株及び Δ *cysA* Δ *yeeD* 株は共に同培地で生育しなかった（図 38）。このことから、*Sup1* 株では *YeeE* によって細胞内に取り込まれたチオ硫酸イオンは、*YeeD* によって速やかに亜硫酸イオンまたは硫化物イオンへと変換される。その後、生じた両イオンから硫酸経路を介して Cys を合成していると考えられた（図 39：赤字）。

また、表 8, 13 に示すように、チオ硫酸イオン存在下では野生株や *cysM* 欠損株の *yeeE*、*yeeD* 遺伝子の転写は抑制されているが、*Sup1* 株では抑制されない。つまり、*Sup1* 株における *YeeED* の活性化は転写抑制の解除に起因すると示唆された。

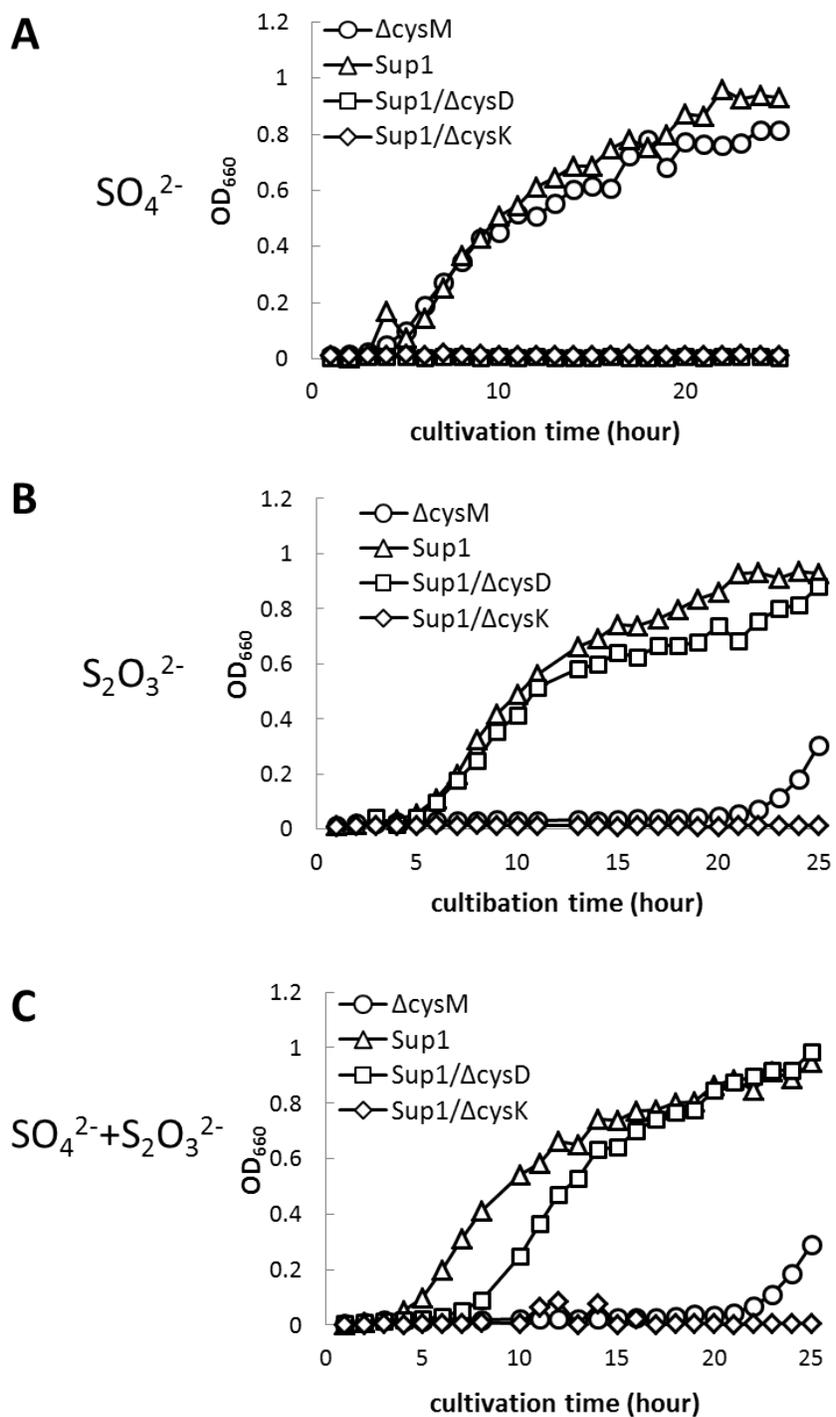


図 36 Sup1 株によるチオ硫酸イオン依存的な生育

cysM 欠損株、 Sup1 株、 $\text{Sup1}/\Delta\text{cysD}$ 株と $\text{Sup1}/\Delta\text{cysK}$ 株の前培養液を (A) 1mM 硫酸ナトリウム (B) 1mM チオ硫酸ナトリウム (C) 1mM 硫酸ナトリウム+1mM チオ硫酸ナトリウムをそれぞれ硫黄源として含む M9 培地に $\text{OD}=0.02$ となるように植菌し、 37°C で培養した。

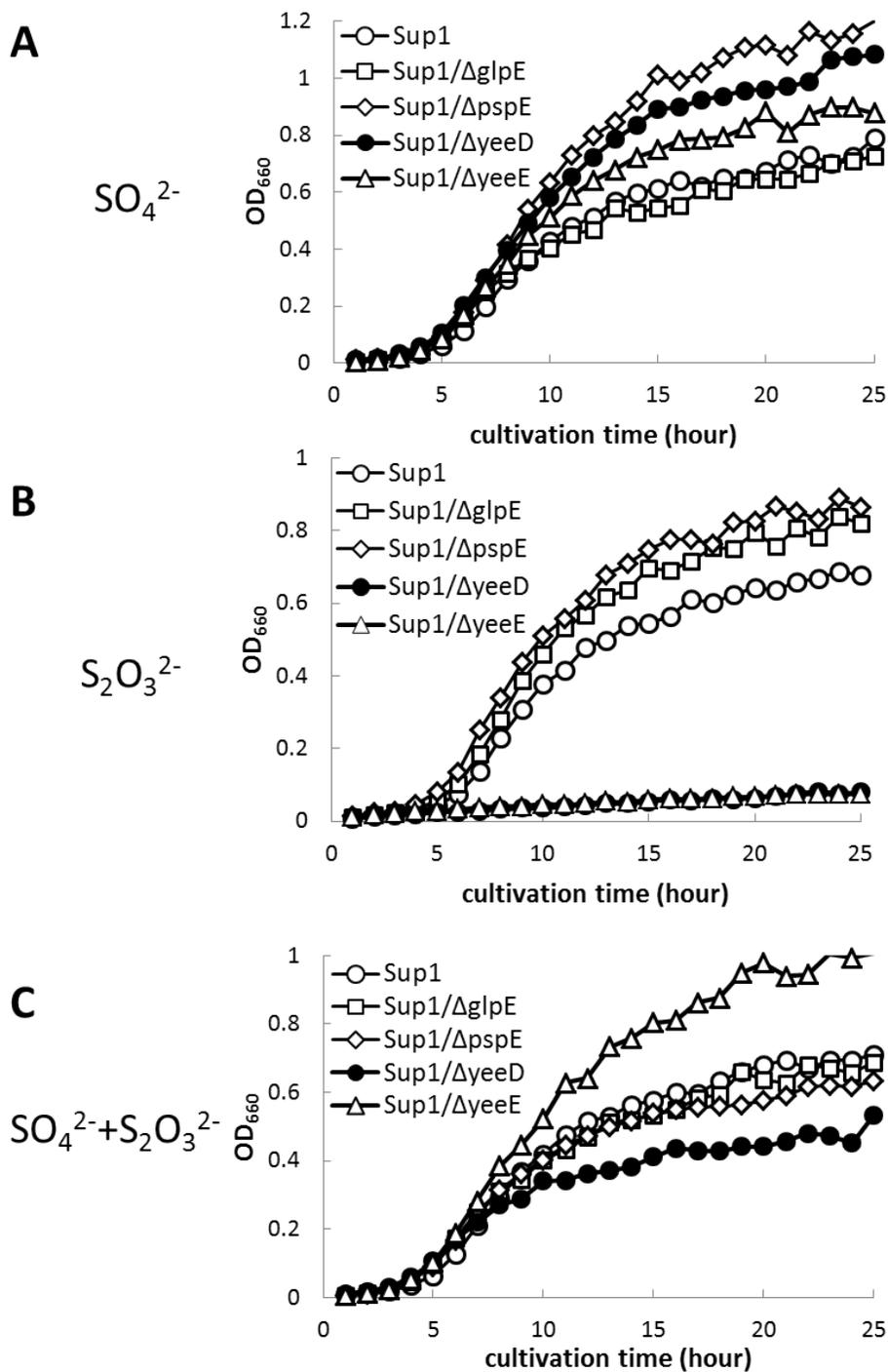


図 37 Sup1 株における YeeDE 依存的なチオ硫酸イオンの利用

Sup1 株、Sup1/ΔglpE 株、Sup1/ΔpspE 株、Sup1/ΔyeeD 株、Sup1/ΔyeeE 株の前培養液を (A) 1mM 硫酸ナトリウム (B) 1mM チオ硫酸ナトリウム (C) 1mM 硫酸ナトリウム+1mM チオ硫酸ナトリウムをそれぞれ硫黄源として含む M9 培地に OD=0.02 となるように植菌し、37°C で培養した。

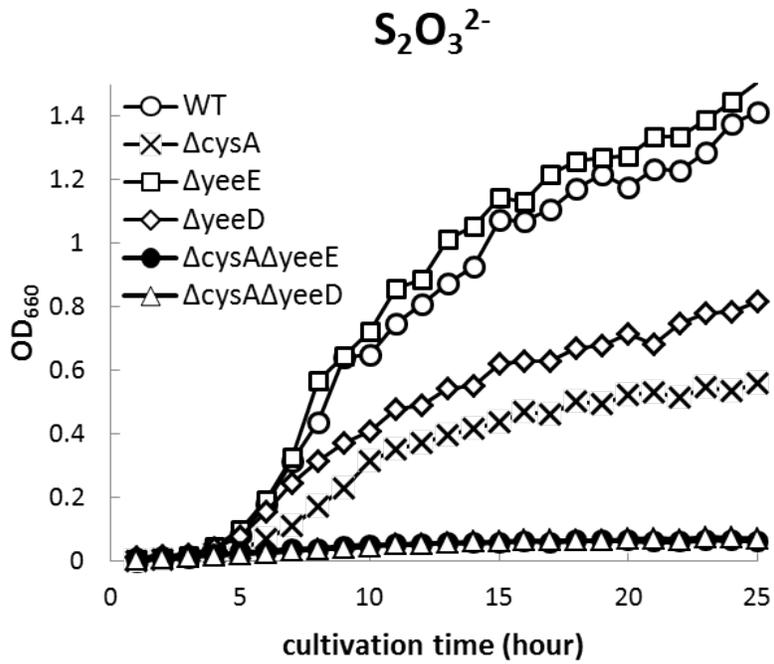


図 38 *cysA yeeD* 二重欠損株と *cysA yeeE* 二重欠損株のチオ硫酸イオンを単一硫黄源とする培地での生育曲線 野生株 (WT)、*cysA* 欠損株、*yeeE* 欠損株、*yeeD* 欠損株、*cysA yeeE* 二重欠損株、*cysA yeeD* 二重欠損株の前培養液を 1mM チオ硫酸ナトリウムを単一硫黄源として含む M9 培地に OD=0.02 となるように植菌し、37°C で培養した。

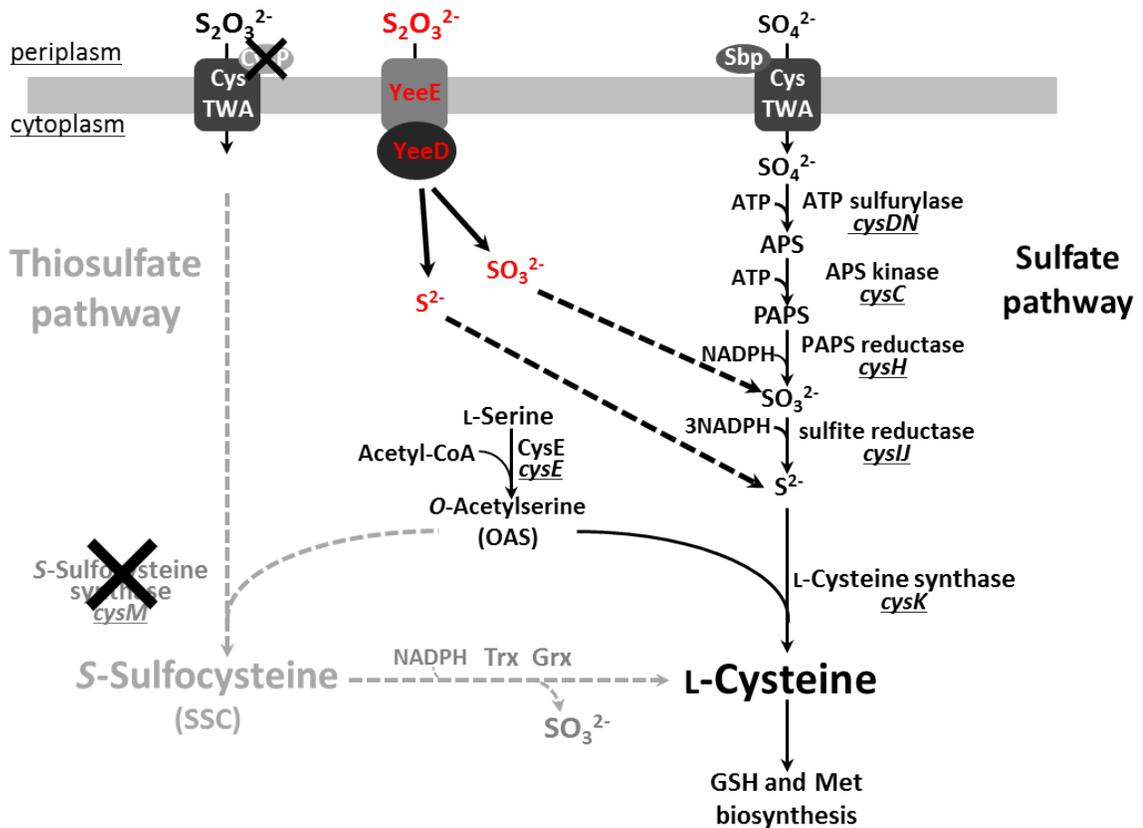


図 39 Sup1 株における YeeED 経路及び硫酸経路の活性化

Sup1 株 (*cysM* 遺伝子の欠損に加え、*cysP* 遺伝子に 81 bp の欠失が生じた株) の解析から、Sup1 株では機能未知であった膜タンパク質 YeeE がチオ硫酸イオンを取り込み、取り込まれたチオ硫酸イオンが硫黄転移酵素 YeeD 依存的に亜硫酸イオンと硫化物イオンへと変換され、硫酸経路での Cys 合成が起こることが示唆された。また、Sup1 株では転写抑制の解除によりチオ硫酸添加時でも硫酸経路も機能している。

2-3-6. 細胞質内へのチオ硫酸イオンの取り込みは CysPTWA に依存する。

Sup1 株の解析により、CysPTWA 以外のもう一つのチオ硫酸イオンインポーターが YeeE であり、YeeE の機能には硫黄転移酵素 YeeD が必須であることが判明した ($\Delta cysA\Delta yeeE$ 株と *cysA* $\Delta yeeD$ 株は共に、チオ硫酸イオンを単一硫黄源として生育できないため：図 38)。細胞質には、YeeD 以外にも硫黄転移酵素が複数存在するにも関わらず $\Delta cysA\Delta yeeD$ 株はチオ硫酸イオンを単一硫黄源とする培地で生育しない。これは、YeeE により取り込まれたチオ硫酸イオンは YeeD に直接転移し、細胞質内に遊離の状態が存在しないことを示唆している。この仮説を検証

するため、細胞質内への遊離のチオ硫酸イオンの取り込みに対する CysPTWA と YeeE の寄与を調べた。³⁵S で標識されたチオ硫酸ナトリウムは製造中止により入手できず、直接的な取り込み活性を測定することはできない。そこで、YeeD の反応により生じた亜硫酸イオンと硫化物イオンを利用できない *cysK* 欠損株に、さらに *cysA* 遺伝子を欠損させた *cysKcysA* 二重欠損株 ($\Delta cysK\Delta cysA$ 株) を構築した。 $\Delta cysK\Delta cysA$ 株を用いてチオ硫酸イオンを単一硫黄源とする培地での生育を調べた。YeeE が遊離のチオ硫酸イオンの取り込みに寄与するならば、CysM 依存的に Cys が合成され生育するはずである。その結果、*cysK* 欠損株は野生株並みの良好な生育を示したのに対して、 $\Delta cysK\Delta cysA$ 株はほとんど生育しなかった (図 40)。このことから、遊離のチオ硫酸イオンの細胞質内への取り込みは CysPTWA に強く依存しており、YeeE の寄与は僅かであることが明らかとなった。

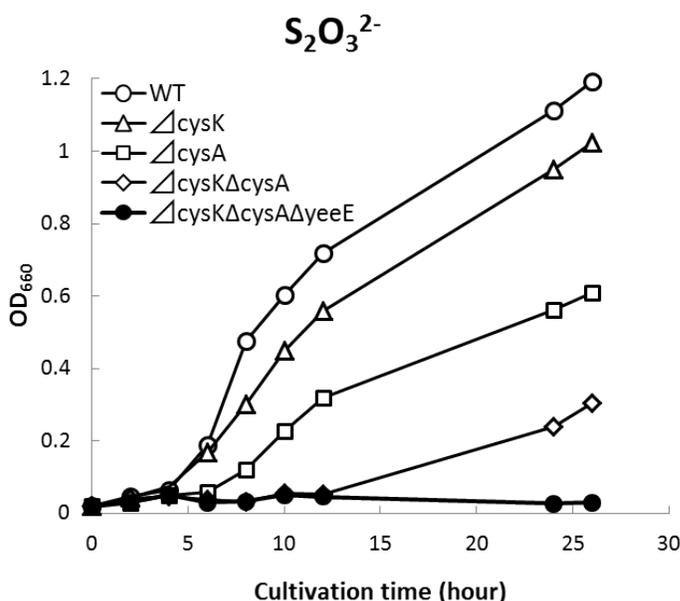


図 40 細胞質内へのフリーのチオ硫酸イオン取り込みに対する CysPTWA と YeeE の寄与の比較 野生株 (WT)、*cysK* 欠損株、*cysA* 欠損株、*cysKcysA* 二重欠損株、*cysKcysA yeeE* 三重欠損株の前培養液を 1mM チオ硫酸ナトリウムを硫黄源として含む M9 培地に OD=0.02 となるように植菌し、37°C で培養した。

2-3-7. チオ硫酸イオンによる硫黄同化関連遺伝子の転写抑制は細胞質内で起こる

細胞質内への遊離のチオ硫酸イオンの取り込みは CysPTWA に強く依存することが明らかとなった。そこで、Sup1 株における TSR の解除モデルとして、サプレッサー変異により CysP が機能欠損することで、細胞質内へのチオ硫酸イオンの流入量が減少し、細胞質でのチオ硫酸イオンによる転写抑制機構が働かなくなる可能性を考えた。もしそうであるならば、*cysA* 遺伝子の欠損によってもサプレッサー変異と同様に TSR が解除されるはずである。そこで、*cysM**cysA* 二重欠損 (Δ *cysM* Δ *cysA*) 株を構築し、Sup1 株のようにチオ硫酸イオンを単一硫黄源とする培地でも生育するかを調べた。その結果、予想通り Δ *cysM* Δ *cysA* 株は Sup1 株と同様に同培地で良好に生育し、TSR が解除された (図 41-A)。さらに、この *cysA* 遺伝子の欠損がサプレッサー変異 (*cysP* 遺伝子内の 81 bp の欠失) と同様に、チオ硫酸イオンによる硫酸経路遺伝子の転写抑制を解除するかを RT-PCR により調べた。その結果、*cysA* 欠損株ではチオ硫酸イオンを添加しても、野生株や *cysM* 欠損株で見られる硫酸経路遺伝子の転写抑制は起こらなかった (図 41-B)。

cysP に変異が生じた Sup1 株及び *cysA* 欠損株では、チオ硫酸イオン添加による硫黄同化関連遺伝子の転写抑制が起らなくなった。これらの結果より、Sup1 株における TSR の解除は、CysPTWA によって細胞質に取り込まれるチオ硫酸イオン量が大幅に減少したことで、チオ硫酸イオンによる CysB 依存的な転写抑制が起らなくなったことに起因すると結論した。

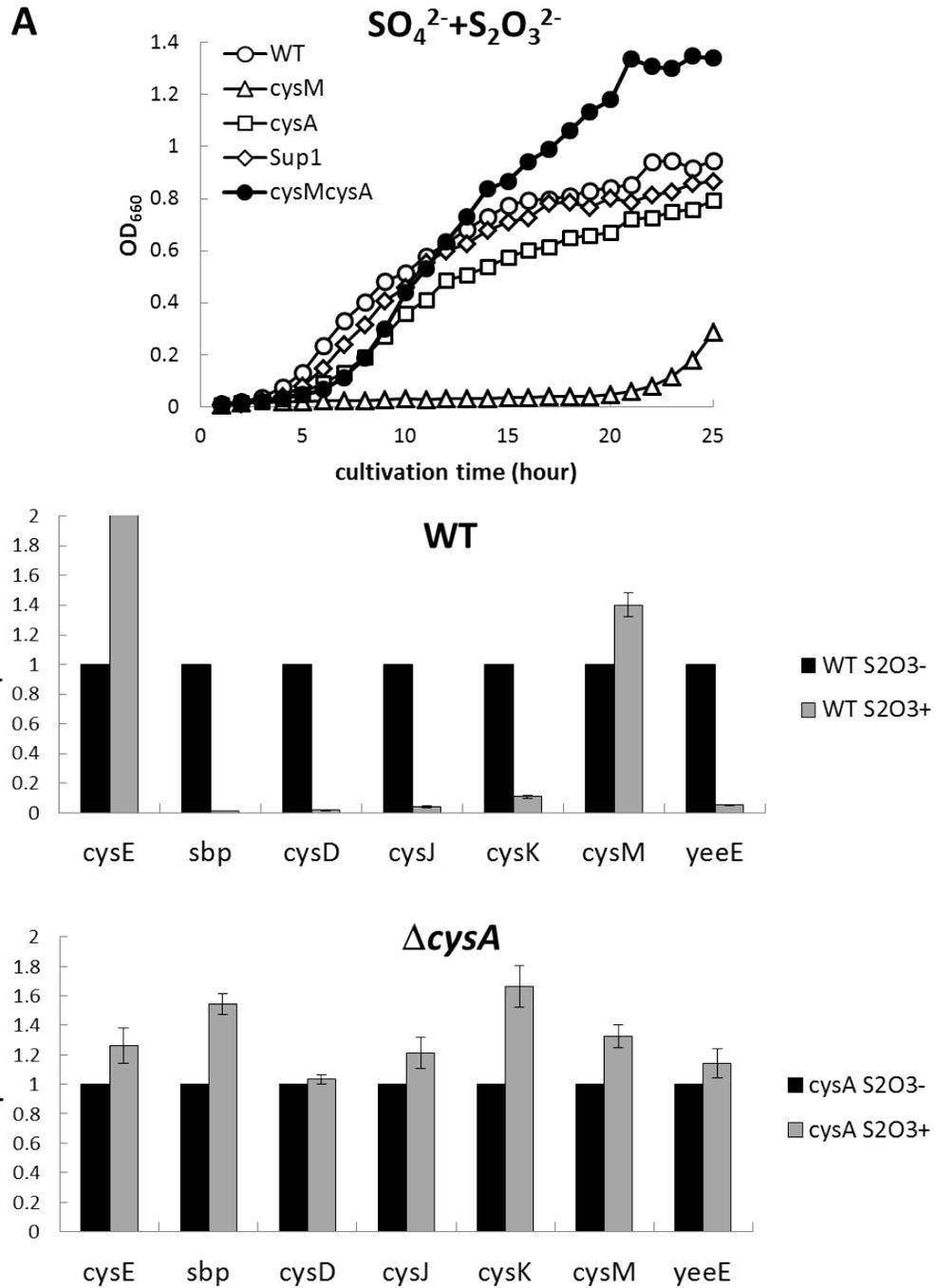


図 41 *cysA* 遺伝子の欠損による TSR の解除

(A) 野生株、*cysM* 欠損株、*cysA* 欠損株、Sup1 株、*cysMcysA* 二重欠損株の前培養液をそれぞれ 1mM 硫酸ナトリウム +1mM チオ硫酸ナトリウムを硫黄源として含む M9 培地に OD=0.02 となるように植菌し、37°C で培養した。(B) 100 μM シスチンを含む M9 培地で、OD=0.4 まで培養した野生株 (WT) 及び *cysA* 欠損株を、M9-S 培地で洗浄後、M9-S 培地で 2 時間培養し Cys 合成関連遺伝子の発現誘導を行った。この状態の培養液に、1mM チオ硫酸ナトリウムを添加し 5 分後の菌体 1 ml から RNA を抽出し、RT-PCR に供した。硫酸イオンで培養している状態の各遺伝子の mRNA 量を 1 として、チオ硫酸イオン添加時の mRNA 量を相対値で示した。相対値 0.5 以下で転写抑制、相対値 2 以上で転写誘導されているとする。

2-3-8. $\Delta cysM\Delta X$ 二重欠損株ライブラリーを用いた TSR の制御に関与する遺伝子のスクリーニング

サプレッサー変異株の単離・解析とは別に、二重欠損株ライブラリーを用いた TSR の制御に関与する遺伝子の網羅的スクリーニングも平行して行った。これまで述べてきたように、*cysM* 欠損株は硫酸イオン、及びチオ硫酸イオンを含む M9 培地では生育できない。そこで、この *cysM* 欠損株と大腸菌の一遺伝子欠損株ライブラリーである Keio collection を接合させることで、*cysM* 以外にもう一つ別の遺伝子が欠損した $\Delta cysM\Delta X$ 二重欠損株ライブラリーを構築し (図 23)。その後、上記の培地でも生育可能な二重欠損株を選別することで、その二重欠損株の遺伝子 X が TSR の制御に関わる遺伝子と同定できると考えた。

方法は、第 1 章の二重欠損株ライブラリー構築と同様に、まず *cysM* 欠損株の接合に必要な F 因子を導入するために、CIP 株と接合させることで Hfr $\Delta cysM$ (Cm^R) を構築した。また、構築した Hfr $\Delta cysM$ (Cm^R) の接合効率を調べた結果、21.6% と十分な接合効率であった。次に、LB 培地上で Hfr $\Delta cysM$ (Cm^R) と Keio collection (Km^R) の各株とを接合させることで、 $\Delta cysM\Delta X$ 二重欠損株ライブラリー (Cm^R , Km^R) を構築した (図 23)。構築できた二重欠損株ライブラリーをさらに M9 (1 mM 硫酸マグネシウム) プレートと M9 (1 mM 硫酸マグネシウム+1 mM チオ硫酸ナトリウム) プレートで 37°C、65 時間培養し、M9 (1 mM 硫酸マグネシウム+1 mM チオ硫酸ナトリウム) プレートでも良好に生育可能な二重欠損株を調べた (図 42-A)。この実験系を 2 回繰り返す、両方の実験で M9(硫酸+チオ硫酸)プレートで生育できた株のみをシングルコロニー分離した。さらに、それらの株の *cysM* 遺伝子が欠損しているかをコロニーPCR により確認した。*cysM* 遺伝子の欠損が確認できた 6 株 ($\Delta ybcN\Delta cysM$ 、 $\Delta nudH\Delta cysM$ 、 $\Delta ldcC\Delta cysM$ 、 $\Delta yidA\Delta cysM$ 、 $\Delta yfbF\Delta cysM$ 、 $\Delta yjgN\Delta cysM$) について M9 (硫酸+チオ硫酸) プレートでスポットテストを行い、同条件で生育が可能であることを再度確認した (図 42-B)。

しかし、並行して進めていたサプレッサー変異株を単離する実験から、この二重欠損株ライブラリーを用いたスクリーニングにおいてもサプレッサー変異が導入される可能性があることが分かった。そこで、サプレッサー変異の生じない Datsenko らの方法 (Datsenko and Warner, 2000) に従い、Keio collection の *ybcN*、*nudH*、*ldcC*、*yidA*、*yfbF*、*yjgN* 各遺伝子欠損株の *cysM* 遺伝子領域をカナマイシン耐性遺伝子で置換することで、 $\Delta ybcN\Delta cysM$ 、 $\Delta nudH\Delta cysM$ 、 $\Delta ldcC\Delta cysM$ 、 $\Delta yidA\Delta cysM$ 、 $\Delta yfbF\Delta cysM$ 、 $\Delta yjgN\Delta cysM$ を再構築した。これら 6 株を M9 (硫酸イオン+チオ硫酸イオン) 液体培地で培養した結果、 $\Delta nudH\Delta cysM$ 、 $\Delta yjgN\Delta cysM$ 以外の 4 株は *cysM* 欠損株と同様の生育曲線が得られた (図 42-C)。つまり、これら 4

株は二重欠損株スクリーニングの過程で、サプレッサー変異が導入されたと考えられた。一方、 $\Delta nudH\Delta cysM$ 、 $\Delta yjgN\Delta cysM$ はサプレッサー変異により増殖可能になってくる 22 時間目よりも早くから OD の上昇が始まっており、*nudH* 遺伝子、*yjgN* 遺伝子の欠損が硫酸経路の不活性化の解除に関わっている可能性が示された。以上の実験から、TSR の制御に関与する候補遺伝子として、*nudH* と *yjgN* を同定した (表 14)。

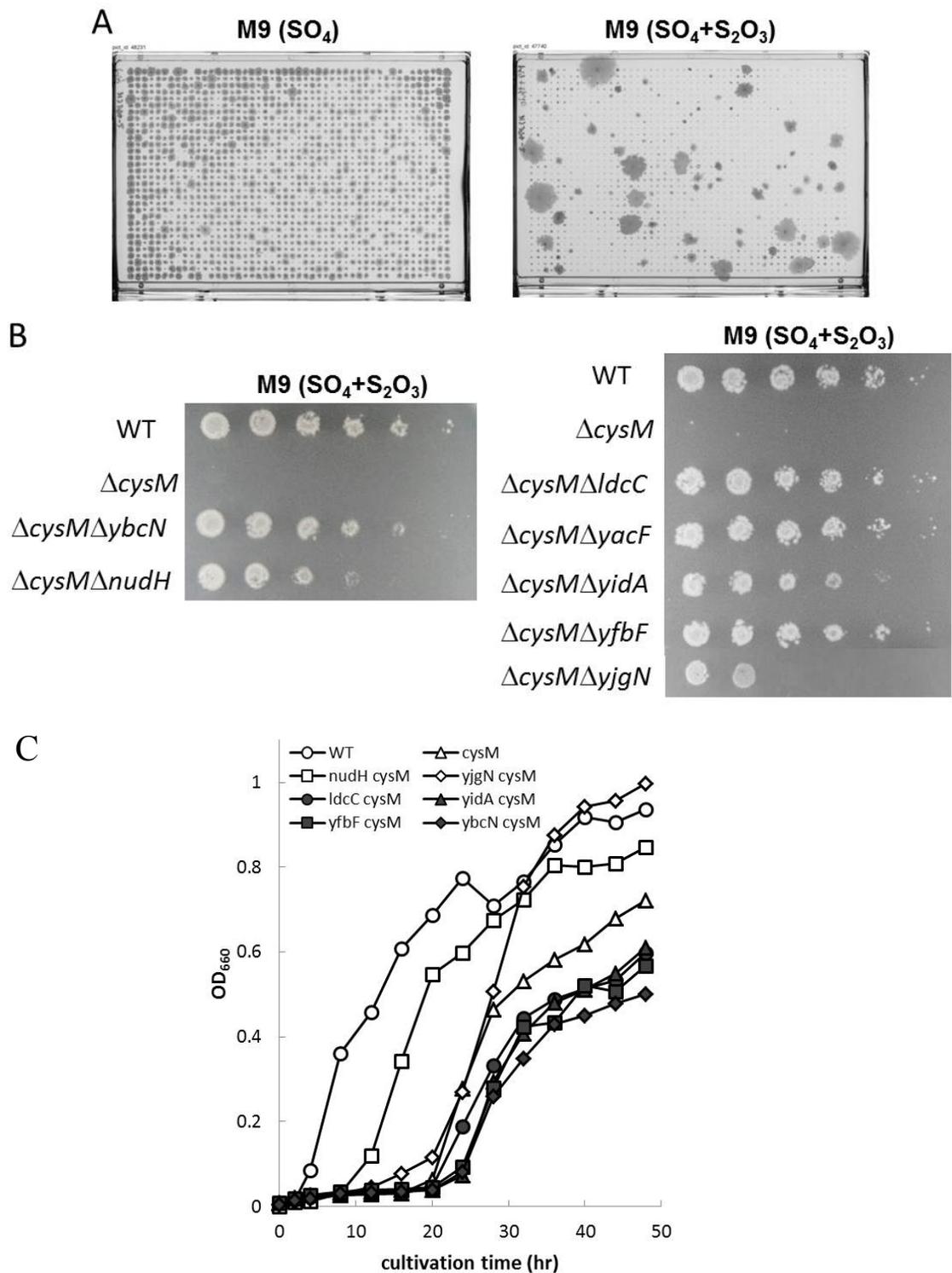


図 42 $\Delta cysM\Delta X$ 二重欠損株ライブラリーを用いた TSR に関与する遺伝子のスクリーニング (A) M9 (1 mM 硫酸マグネシウム)、M9 (1 mM 硫酸マグネシウム+1 mM チオ硫酸ナトリウム) 培地で、二重欠損株ライブラリーを 37°C で 65 時間培養させた時の写真。M9 (1 mM 硫酸マグネシウム+1 mM チオ硫酸ナトリウム) 培地でも生育する株があることが分かる。(B) 2 回の実験で、再現よく M9 (1 mM 硫酸マグネシウム+1 mM チオ硫酸ナトリウム) 培地で生育した 7 つの二重欠損株。(C) サブレッサー変異に依存しないかを確認するために、Warner らの方法により 7 種の二重欠損株を構築し直し、M9 (1 mM 硫酸マグネシウム+1 mM チオ硫酸ナトリウム) 培地での生育を調べた。

表 14 DKO ライブラリーを用いて同定した TSR の制御に関わる候補遺伝子

gene	function
<i>nudH:</i> (<i>rppH</i>)	Pyrophosphohydrolase. RNA pyrophosphohydrolase that initiates mRNA degradation by hydrolysis of the 5'-triphosphate end, preparing mRNAs for further degradation by RNase E (Bacterial mRNA decapping). <i>nudH</i> gene comprises an operon with <i>ptsP</i> which is important for phosphotransferase system (PTS) and carbon catabolite repression.
<i>yjgN:</i>	Putative transporter. Unknown inner membrane protein with eight predicted transmembrane domains.

2-3-9. チオ硫酸イオンによる生育促進効果の検証

最後に、TSR によってチオ硫酸経路優先的に Cys を合成する生理的意義について検証した。硫酸経路は 5 段階の反応に 2 分子の ATP と 4 分子の NADPH を消費することで、硫酸イオンの同化的還元により 1 分子の Cys を合成する。一方、チオ硫酸経路は 2 段階の反応に 1 分子の NADPH のみを消費することで、1 分子の Cys が合成可能である。反応に消費するエネルギーだけでなく、Cys 合成に関わる酵素が少ないことから、チオ硫酸経路が硫酸経路と比較してエネルギー的に有利な Cys 合成経路であり、これこそが TSR の生理的意義ではないかと考えた。

この仮説を検証するために、1 mM の硫酸イオンを単一硫黄源とする条件、0.5 mM チオ硫酸イオンを単一硫黄源とする条件それぞれにおける野生株の生育を調べた。1 分子のチオ硫酸イオンは 2 個の硫黄原子を含むので、硫黄原子の添加量を揃えるために、チオ硫酸の濃度を 0.5 mM とした。その結果、若干ではあるがチオ硫酸イオンを硫黄源とした場合の方が対数増殖後期の増殖が速い傾向が見られた (図 43-A)。さらに、TSR が起きるようなチオ硫酸イオンと硫酸イオンを両方添加した条件の生育曲線も調べた。チオ硫酸イオンと硫酸イオンを添加した場合も、硫酸イオンのみを硫黄源とした場合と比較して、生育速度と菌体収量に差が見られた (図 43-B)。

チオ硫酸イオンの生育への効果をより顕著に観察するために、好気呼吸による ATP などのエネルギー生産性が低下する嫌気条件で、同様の実験を行った。1 mM 硫酸イオンを単一硫黄源とする条件、0.5 mM チオ硫酸イオンを単一硫黄源とする条件それぞれにおける野生株の生育曲線を比較した。その結果、好気条件よりも顕著にチオ硫酸イオンが生育を促進する効果が確認された (図 44-A)。さらに、チオ硫酸イオンと硫酸イオンを両方添加した条件においても、好気条件よりも、チオ硫酸イオンを硫黄源とした時の方が対数増殖後期の増殖速度や定常期の菌体収量が大きく増加していた (図 44-B)。

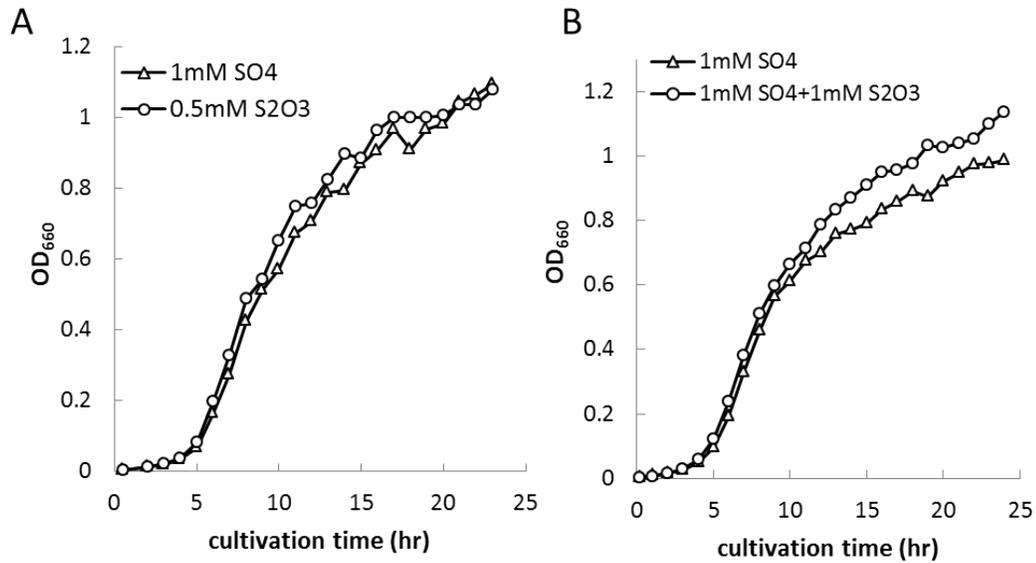


図 43 チオ硫酸イオンによる生育促進効果（好氣的条件）

野生株の前培養液をそれぞれ 1mM 硫酸ナトリウム、1mM チオ硫酸ナトリウム、1mM 硫酸ナトリウム +1mM チオ硫酸ナトリウムそれぞれを硫黄源として含む M9 培地に OD=0.02 となるように植菌し、37°C で培養した。

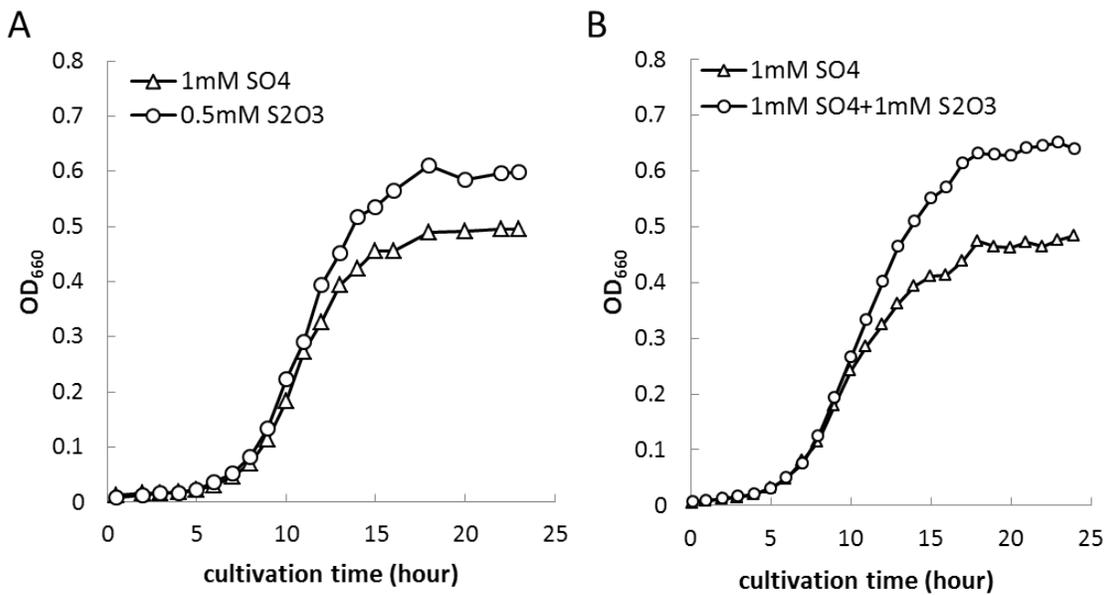


図 44 チオ硫酸イオンによる生育促進効果（嫌氣的条件）

野生株の前培養液をそれぞれ 1mM 硫酸ナトリウム、1mM チオ硫酸ナトリウム、1mM 硫酸ナトリウム +1mM チオ硫酸ナトリウムそれぞれを硫黄源として含む M9 培地に OD=0.02 となるように植菌した。培養に用いた L 字試験管のヘッドスペースは窒素置換し、37°C で静置培養し嫌氣的な条件で生育させた。

2-4. 考察

第 1 章における Cys 発酵生産菌を用いた研究により、チオ硫酸イオンと硫酸イオンが細胞外に共存する場合、硫酸経路を不活性化することで、チオ硫酸経路優先的な Cys 合成が起こることが示唆された。第 2 章では、修士課程において見出した硫黄源の選択的な利用機構について解析を行った。

チオ硫酸イオン優先的な Cys 合成制御機構の発見

まず、より生理的な条件でチオ硫酸イオンによる硫酸経路の不活性化が起きるかを調べた。その結果、硫酸経路依存的に Cys 合成を行う *cysM* 欠損株が硫酸イオンとチオ硫酸イオンを含む最少培地で Cys 要求性を示した (図 24)。したがって、チオ硫酸イオンによる硫酸経路の不活性化「チオ硫酸リプレッション (TSR)」が発酵生産条件だけでなく、生理的条件においても起こる現象であることが判明した。さらに、硫酸イオンに対し、1/1,000 の濃度のチオ硫酸イオンにより *cysM* 欠損株の生育を完全に阻害したことから、TSR による硫酸経路の抑制は非常に厳密に制御されていることが示唆された (図 25-B)。以上より、この現象をチオ硫酸経路優先的な新規な Cys 合成制御機構と考え、TSR の分子機構の解析を進めた。

チオ硫酸イオンによる硫酸イオンの取り込み抑制

TSR のタンパク質レベルでの制御機構として、硫酸イオンの取り込み制御について検証を行った。培地中に硫酸イオンとチオ硫酸イオンが等量存在する際には、硫酸イオンの取り込みが有意に抑制された (図 27-A)。しかし、チオ硫酸イオンの濃度を 1/100 まで減少させると、硫酸イオンの取り込み阻害はほとんど起きなかった。このことは、硫酸イオンに対して 1/1,000 量のチオ硫酸イオンでも生育が阻害される TSR の表現型と一致しない。そのため、TSR の分子機構としては、後述する転写制御がより本質的なものであると考え、転写制御機構の解明に取り組んだ。また、唯一の硫酸イオンインポーターである CysTWA が Sbp 及び CysP それぞれを介して、硫酸イオンとチオ硫酸イオンの両方を取り込むことから、チオ硫酸イオンが競争的に硫酸イオンの CysTWA による取り込みを阻害すると考えられた (図 27-B)。

チオ硫酸イオンによる硫酸経路の転写抑制

チオ硫酸イオン添加時の転写応答についても解析したところ、培地へのチオ硫酸イオンの添加により、硫黄同化関連遺伝子群の転写が強く抑制されることが判明した(表 8)。硫酸イオンの取り込みに関与するインポーター*sbp/cysTWA* (硫酸イオン取り込み段階)、2 分子の ATP の消費を伴って硫酸イオンのリン酸化を行う *cysDNC* オペロン(硫酸イオンの高エネルギーリン酸化段階)や、4 分子の NADPH の消費により亜硫酸イオンの還元を行う *cysHIJ* オペロン (硫酸イオンの同化) の転写が強く抑制されていたことは、エネルギー消費を抑える意味で合理的な機構である。しかし、第 1 章で述べたチオ硫酸経路で生じた亜硫酸イオンの再利用には *cysHIJ* オペロン及び *cysK* 遺伝子が必要である。チオ硫酸経路を優先するにもかかわらず、チオ硫酸イオンの輸送も担う *cysPTWA* オペロンの転写が抑制されていたことは、チオ硫酸経路の利用に関して疑問が残る。転写レベルだけでなく、各遺伝子がコードするタンパク質量についても調べた。ゲノム上の各遺伝子に HA タグを導入し、HA 抗体によるウエスタンブロットを試みた。しかし、オペロンを形成する遺伝子が多いためか、HA タグ断片の挿入により生育に影響が確認されたため断念した。*cysHIJ* に依存しない亜硫酸イオンの還元経路として、亜硝酸還元酵素 (NirBD) が機能している可能性もある。一部の細菌や植物においては、亜硝酸還元酵素が亜硫酸イオンを還元し、硫化物イオンへと変換できることが知られている (Crane *et al.*, 1997; Crane and Getzoff, 1996; Janick *et al.*, 1983)。また、*cysM* 遺伝子は転写が 2.8 倍抑制されているが、他の多くの遺伝子が 10~40 倍抑制されていることを考慮すると、抑制の程度は低く、チオ硫酸イオン添加時でも機能し、SSC 合成を行っていると考えられる。*cysM* 遺伝子が *cysPTWAM* オペロンの一部でありながら、*cysPTWA* に比べ mRNA レベルが高い原因は *cysM* が独自のプロモーターをもつからだと推測している。実際のゲノム情報によると、*cysM* の ORF 上流に恒常的な遺伝子発現を行う σ^{70} 依存的なプロモーター配列が存在している。

また、転写の抑制は、硫酸イオンに対して低濃度 (1/1,000) のチオ硫酸イオンでも観察された(図 28)。これは、*cysM* 欠損株の生育曲線(図 25-B)で観察された TSR の制御の厳密さと一致することから、この転写制御が TSR の分子機構として本質的なものであることが示唆された。

チオ硫酸イオンによる転写抑制と転写因子 CysB の関係

構成的活性型 CysB 変異体 (CysB^{Thr149Pro}) の発現により、TSR による硫黄同化関連遺伝子の転写抑制が解除されたことから、チオ硫酸イオンが CysB に作用することで転写が抑制されると考えられた(図 29, 図 30)。

CysB 依存的なチオ硫酸イオンによる転写抑制機構として、2 つのメカニズムを想定している。一つ目は、1) 「チオ硫酸経路の効率的な Cys 合成に起因する CysE のフィードバック阻害」、二つ目は 2) 「チオ硫酸イオンの CysB への結合によるホモ多量体形成の阻害」である。

仮説 1) チオ硫酸経路の効率的な Cys 合成による CysE のフィードバック阻害

硫酸イオン単一硫黄源で生育している大腸菌は、細胞内 Cys 濃度が低く、CysB による転写の活性化が恒常的に起こっていると考えられる。チオ硫酸イオンが細胞質内に取り込まれると、硫酸イオンと比べて、ATP、NADPH の消費が少なく効率良く 2 段階の反応のみで Cys が合成される。このことから、チオ硫酸イオン存在時には、効率的に合成され一過的に蓄積した Cys が CysE をフィードバック阻害し、CysB のインデューサーである NAS (CysE の反応の生成物である OAS が非酵素的に NAS に変換される。) 合成が減少する (Colyer and Kredich, 1994; Denk and Böck, 1987)。そのため、CysB による硫黄同化関連遺伝子群の転写の活性化が抑制される可能性がある。

仮説 2) チオ硫酸イオンの CysB への結合によるホモ多量体形成の阻害

CysB はホモ四量体を形成することで DNA 結合ドメインが完成し活性型となる (Colyer and Kredich, 1994; Jovanovic *et al.*, 2003; Tyrrel *et al.*, 1997)。その結果、下流遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写を誘導すると考えられている (Colyer and Kredich, 1999)。また、CysB の単量体とホモ二量体の立体構造が解明されているが、ホモ二量体の立体構造からインデューサーである NAS は 2 つの CysB 単量体を繋ぐように、二量体が形成する空洞に収まることが予測されている (Lachowska *et al.*, 2004)。非常に興味深いことに、構造が解明されたホモ二量体には、CysB タンパク質の精製で用いた硫酸アンモニウム由来の硫酸イオンが、偶然 NAS が収まる空洞の奥に配位していた (Tyrrel *et al.*, 1997)。ホモ二量体の形成には硫酸イオンの結合は必須ではなく、硫酸イオンによる CysB への結合の生理的意義は明らかになっていない。また、チオ硫酸イオンは硫酸イオン同様に正四面体構造をとり、かつ-2 の負電荷を帯びるという点で非常に性質が似ているが、分子としては硫酸イオンより大きい。これらのことを考え合わせると、硫酸イオンより大きいチオ硫酸イオンが上記の空洞に配位することで、NAS による CysB への結合が阻害されるのではないかと考えている。その結果、CysB のホモ二量体が形成されず、CysB レギュロンの転写誘導が阻害される可能性がある。この仮説は、CysB タンパク質を発現・精製し、チオ硫酸イオン存在下で多量体形成が起きるかを、ブルーネイティブ PAGE やゲル濾過クロマトグラフィーを用いて検証できる。

転写及び取り込みに依存しない TSR の未知の制御機構（タンパク質の翻訳後制御）の可能性

硫酸経路の不活性化には、上記に述べた転写及び取り込みレベルの制御には依存しない異なる分子機構が存在する可能性がある。硫酸経路遺伝子の転写抑制が起こるまでの間に、硫酸経路タンパク質の翻訳後制御が起こることを想定している。具体的には、チオ硫酸経路の SSC の還元により生じる亜硫酸イオン、またはチオ硫酸イオンから直接生じる亜硫酸・硫化物イオンが、硫酸経路タンパク質の Cys 残基を修飾し、その酵素活性を阻害するのではないかと考えている。実際に、硫酸経路タンパク質である PAPS 還元酵素 (CysH) 過剰発現株をチオ硫酸イオン単一硫黄源培地で培養すると、CysH の Cys 残基が酸化修飾されることを見出している。硫酸経路の各タンパク質にはそれぞれ Cys 残基が存在するため、Cys 残基の亜硫酸化修飾は他の硫酸経路タンパク質においても起こるのではないかと考えている。この亜硫酸化修飾によって不活性化されたタンパク質が特異的に分解される可能性もある。

チオ硫酸経路より生じる亜硫酸シグナリングの可能性

上記のチオ硫酸イオン添加時の SSC 由来の亜硫酸シグナルは、硫酸経路タンパク質だけでなく、様々なタンパク質の Cys 残基を修飾する可能性がある。グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) など、中央代謝経路に関わるタンパク質の中には、活性酸素種や一酸化窒素などによる Cys 残基の修飾で活性が制御される酵素が知られている (Hara *et al.*, 2005; Morigasaki *et al.*, 2008)。亜硫酸シグナルも同様にこれらの酵素を修飾する可能性がある。つまり、チオ硫酸イオンを用いた培養によって、硫黄代謝経路だけでなく、炭素源や窒素源の代謝制御が起こり得るのではないだろうか。種々の微生物において、窒素枯渇条件でグリコーゲンや脂肪酸、油脂の合成が誘導され、エネルギー及び炭素源として蓄積される (Miguel *et al.*, 1997; Richardson *et al.*, 1969)。この窒素-炭素代謝間の応答機構のように、細胞外の硫黄源の種類や存在量の変化に炭素及び窒素代謝が応答し、細胞全体の代謝を最適化していく機構が存在するはずである。

大腸菌におけるチオ硫酸イオン依存的な 2 種類の Cys 合成経路

次に、本研究を通して見えてきた 2 つのチオ硫酸イオンからの Cys 合成経路について考察する。チオ硫酸イオンの取り込み系として CysPTWA が知られていたが、*cysA* 欠損株がチオ硫酸イオン単一硫黄源とする M9 培地で生育することから他のトランスポーターの存在を考えた。共同研究先である味の素社からの報告及

び我々のグループによる Sup1 株の解析により、もう一つのチオ硫酸イオンインポーターが YeeE であることが判明した（実際、 $\Delta cysA\Delta yeeE$ 株はチオ硫酸イオン単一硫黄源培地ではほとんど生育できない。図 38）。*cysK* 欠損株と $\Delta cysK\Delta cysA$ 株のチオ硫酸イオン単一硫黄源培地での生育を調べた結果、細胞質内へのチオ硫酸イオンの取り込み活性はほとんど CysPTWA に依存することがわかってきた（図 40）。つまり、チオ硫酸経路では、CysPTWA がチオ硫酸イオンを細胞質に取り込み、取り込まれた遊離のチオ硫酸イオンを基質として CysM が SSC へ変換し、続く SSC の還元により Cys が合成される。一方、YeeE に関しては、Sup1/ $\Delta yeeE$ 株と Sup1/ $\Delta yeeD$ 株及び、 $\Delta cysA\Delta yeeE$ 株と $\Delta cysA\Delta yeeD$ 株の解析により、オペロンを形成する硫黄転移酵素 YeeD との関係性を調べた。その結果、YeeE によって取り込まれたチオ硫酸イオンは YeeD により亜硫酸イオンと硫化物イオンへと変換され、硫酸経路を介して Cys が合成されることが強く示唆された（図 39）。

cysM 欠損サプレッサー変異株 Sup1 における TSR の解除

cysM 欠損株が TSR によりほとんど生育しないチオ硫酸イオンと硫酸イオンの両方を含む M9 培地においても、良好に生育する *cysM* 欠損サプレッサー変異株 Sup1 を単離した（図 31）。Sup1 株の変異点解析の結果、Sup1 株の *cysP* 遺伝子内に 81 bp の欠失を同定した（図 32）。Sup1 株の詳細な解析を行った結果、*cysP* 遺伝子内の欠失によりチオ硫酸イオンの取り込みに関わる CysP タンパク質が機能欠損し、細胞質内へのチオ硫酸イオンの流入量が低下したと考えられた。これにより、細胞質においてチオ硫酸イオンにより起こる CysB 依存的な転写抑制が起こらなくなり、硫酸経路遺伝子群や *yeeED* を含む CysB レギュロンの発現誘導が維持された（表 13）。以上より、硫酸イオンは Sbp/CysTWA を介して細胞質内へ取り込み、またチオ硫酸イオンは YeeED を介して細胞質内に亜硫酸イオン、硫化物イオンとして取り込むことで、いずれの硫黄源も硫酸経路から Cys へ変換されることが強く示唆された（図 39）。

また、次世代シーケンス解析において、Sup1 株に存在する 20 bp 以上の変異として、*cysP* の変異以外にも欠失が同定されている（表 12: Subposition 2945488-2945599, 4294292-429440）。しかし、図 33 よりこれらの欠失は Sup1 株に起きていないことが確認された。このミスは、今回のリシーケンスでは、各コンティグを全て繋げ、ゲノムを 100% 解読できていないことが原因と考えられる。

大腸菌におけるチオ硫酸硫黄転移酵素

cysM 欠損株がチオ硫酸単一硫黄源培地ではほとんど生育しないことから、大腸菌におけるチオ硫酸イオンの Cys への同化は CysM に依存すると考えられる (図 24)。つまり、大腸菌ゲノムに複数存在するチオ硫酸硫黄転移酵素はこの条件では機能しておらず、CysM との使い分けが存在するのではないかと考えている。YeeD と共に解析を行ったチオ硫酸硫黄転移酵素 GlpE はグリセロール代謝に関わるオペロンに含まれることから、グリセロール代謝時に機能すると考えられる (Cheng *et al.*, 2008)。では、YeeED 経路はいつ働くのだろうか？ 本研究では、Sup1 株や $\Delta cysM\Delta cysA$ 株において、YeeED 経路の活性化が示唆されたが、野生株でこの経路が機能する条件は不明である。しかし、この YeeED などのチオ硫酸硫黄転移酵素によるチオ硫酸イオンの利用経路は、CysM を介する経路と比較して NADPH を 1 分子節約できるため、硫黄同化においても重要な意味をもつと考えられる。実際、出芽酵母はチオ硫酸イオンを硫黄源として生育するが、CysM のオルソログは淘汰されチオ硫酸硫黄転移酵素がチオ硫酸イオンの同化に働くと推測される。そのため、大腸菌においても YeeED 経路を活用してチオ硫酸イオンから Cys 合成をする環境条件が存在するかもしれない。また、チオ硫酸硫黄転移酵素によるチオ硫酸イオンの変換は、シアン化物の解毒や、鉄硫黄クラスターやチオウリジンの合成などにも働いており (Cipollone *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2012)、YeeED がこういった毒性化合物の解毒に働いている可能性も考えられる。

二重欠損株ライブラリー ($\Delta cysM \times$ Keio collection) を用いた TSR に関与する遺伝子の同定

次に、二重欠損株ライブラリーを用いたスクリーニングから同定した TSR の制御に関与する遺伝子 (*nudH* と *yjgN*) について考察する (図 42, 表 14)。NudH は細菌の mRNA デキャッピングに関わる脱リン酸化酵素として既に報告されており (Deana *et al.*, 2008)、NudH のターゲットとなる mRNA から発現するタンパク質の発現量を制御している。そのため、NudH の欠損により、多くの NudH ターゲット遺伝子の発現量が変動すると考えられており、NudH が直接 TSR の制御に関わるかは不明である。ただ、*nudH* がオペロンを形成する *ptsP* 遺伝子は、炭素源のカタボライトリプレッションの制御に必須のホストランスフェラーゼシステム (PTS) を構成する主要遺伝子である。PTS はホスホエノールピルビン酸からのリン酸基転移反応を介して、多数の下流タンパク質の活性を制御し、炭素代謝や窒素代謝を包括的に制御する。このことから、NudH が PTS を介して TSR などの硫黄代謝も制御できる可能性がある。YjgN は機能未知の内膜トランスポーターであることしか分かっておらず、生理機能などは全く不明である。今後は、*nudH*、

yjgN の各欠損株の TSR に関する表現型（取り込みの抑制、転写の抑制）の解析から、TSR との関連を解析していく。

TSR の生理的意義

次に TSR の生理的意義について考察する。第 2 章の緒言で述べた通り、チオ硫酸経路は、ATP の消費が伴わないこと、1 分子のチオ硫酸イオンから 2 分子の Cys を合成できること、反応ステップが少ないことなどから、硫酸経路と比較してより効率的な Cys 合成経路といえる（図 19）。チオ硫酸イオン、硫酸イオンそれぞれを硫黄源とした場合に、対数増殖後期の増殖速度や到達 OD に有意な差がみられることから、チオ硫酸イオンの Cys 合成効率に起因することを裏付けている（図 43, 44）。私はチオ硫酸イオンによるこの生育への効果こそが、大腸菌が TSR という機構を備える理由だと考えている。

また、酸化的リン酸化経路が活発な好気条件と比べて、ATP 生産が低下する嫌気条件では、硫酸イオンに比べてチオ硫酸イオンを硫黄源にした時の方が、大腸菌の生育がさらに良く、チオ硫酸イオンのより顕著な効果が現れた。動物の腸内は腸内細菌によって放出される硫化水素が、約 10 mM と高濃度で蓄積している。硫化水素はミトコンドリアにおける電子伝達系を阻害することによる細胞毒性が高いため、動物はミトコンドリアで、硫化水素を二段階の酸化反応によりチオ硫酸イオンに解毒する（Hildebrandt *et al.*, 2008）。そのため、チオ硫酸イオンは腸内に mM オーダーと豊富に存在し、嫌気環境であるためより安定に存在できる。このことから、腸内に豊富にあるチオ硫酸イオンを優先的に利用する TSR を大腸菌が備えていることは、理に適っていると考えられる。

他の生物種における TSR の保存性

また、TSR は大腸菌などの腸内細菌に限定的な現象ではなく、①嫌気環境のようにチオ硫酸イオンが存在する環境で生育する生物、かつ②硫黄同化を行う生物、であれば TSR のような機構が保存されているのではないかと考えている。酸素が豊富に存在する大気下では、多くの硫黄化合物は硫酸イオンへと酸化され、硫酸イオンが豊富に存在する。しかし、土中や海中などの酸素濃度が低下する環境では、硫黄細菌や硫酸還元菌などの働きで、硫黄化合物の酸化還元サイクルが機能する（Amend *et al.*, 2004）。その結果、チオ硫酸イオン、亜硫酸イオン、硫化物イオンなどが豊富に存在するようになり、硫黄同化にもこれらの無機硫黄源が利用される。細菌以外でも、植物には *cysM* のオルソログ *cs26* が葉緑体に高度に保存

されており、チオ硫酸イオンからの Cys 合成が長日期での活性酸素種の除去に重要であることが報告されている (Bermudez *et al.*, 2010)。植物と細菌の硫黄代謝経路は相同性が極めて高く、植物においてもチオ硫酸イオンの利用によって ATP や NADPH の消費を抑えることができると考えられる。そのため、チオ硫酸イオンを優先的に利用するための機構が存在することが期待される。しかしながら、植物には CysPTWA インポーターや転写因子 CysB のオルソログは存在しないため、そのメカニズムは大腸菌と異なるであろう。

このような考えに基づき、現在当研究室では酵母（分裂酵母、出芽酵母）やシアノバクテリアにおいても、TSR のようなチオ硫酸イオンの選択的利用機構が存在するかについて検証を行っている。

他の硫黄源に対する選択的利用について

本研究では、無機硫黄源の選択的利用機構として初めて TSR を提唱するとともに、その分子機構の一端（無機硫黄源のセンシングと下流の硫黄同化経路制御）を明らかにした。大腸菌が生育する環境には、他の無機や有機の硫黄源が豊富に存在する場合も考えられ、別の硫黄源のセンシングを介した制御機構を備えていると考えられる (Muyzer *et al.*, 2008)。特に、チオ硫酸経路の中間代謝物である SSC は Cys の合成に関しては、チオ硫酸イオン同様に効率が良いと考えられ、選択的に利用されるはずである。SSC は図 35 に示すようにチオ硫酸イオンと共通する構造をもち、チオ硫酸イオンと類似の反応機構により硫酸経路の抑制が起こる可能性がある。今後は TSR の研究を糸口に、他の硫黄源（シスチン、SSC、グルタチオン、メチオニン、亜硫酸イオンなど）を含めた複数の細胞外硫黄化合物に対するセンシングと硫黄代謝経路の応答、さらには炭素・窒素源代謝の制御機構への解明が期待される。そして、本研究で得られた知見は微生物を用いた新たな物質生産プロセスの開発に繋がるものと考えられる。

総括

第 1 章においては、チオ硫酸経路における SSC の還元を亢進する酵素として、Grx1 と NrdH を同定し、これらの過剰発現が Cys の発酵生産に有効であることを示した。また、SSC の還元で生じる亜硫酸イオンが硫酸経路へとリクルートされ、Cys 合成に利用されること、またその亜硫酸イオンの還元反応を促進することで、発酵生産性が向上することを見出した。

第 2 章においては、チオ硫酸イオンと硫酸イオンが同時に細胞外に存在する場合、硫酸経路が不活性化することで、チオ硫酸経路優先的な Cys 合成が起こることを見出した。この機構を「チオ硫酸リプレッション (ThioSulfate Repression : **TSR**)」と名付け、その分子機構を解析した。その結果、培地へのチオ硫酸の添加により硫酸経路遺伝子群の転写抑制、及び硫酸イオンの取り込み抑制が起こることを明らかにした。硫酸イオンの取り込みはチオ硫酸イオンが高濃度で存在する時には阻害されるが、低濃度では起こらず、硫酸経路の不活化には転写の制御がより本質的なものと考えられた。また、TSR が起こらないサプレッサー変異株の解析から、CysPTWA インポーターによる細胞質内へのチオ硫酸イオンの取り込みが、転写制御の引き金となることが判明した。さらに、取り込まれた細胞質内のチオ硫酸イオンが転写因子 CysB 依存的に硫酸経路遺伝子を含む硫黄同化関連遺伝子群の転写を抑制することを明らかにした (図 45, 46)。

さらに、硫黄源としてチオ硫酸イオンを用いる方が硫酸イオンよりも、最少培地での増殖速度が向上することが判明した。これは、細胞内での ATP や NADPH 消費量の差によるものと考えられ、この効果が大腸菌における TSR の生理的意義ではないかと示唆された。

また TSR の分子機構とは別に、サプレッサー変異株の解析から、同一のオペロンより発現するチオ硫酸イオンインポーター YeeE と硫黄転移酵素 YeeD が新規なチオ硫酸イオン同化経路を形成することを初めて明らかにした。YeeE により取り込まれたチオ硫酸イオンを、YeeD が亜硫酸イオンと硫化物イオンへと変換し、生成した両イオンが硫酸経路で Cys の合成へ利用されるものである (図 39)。

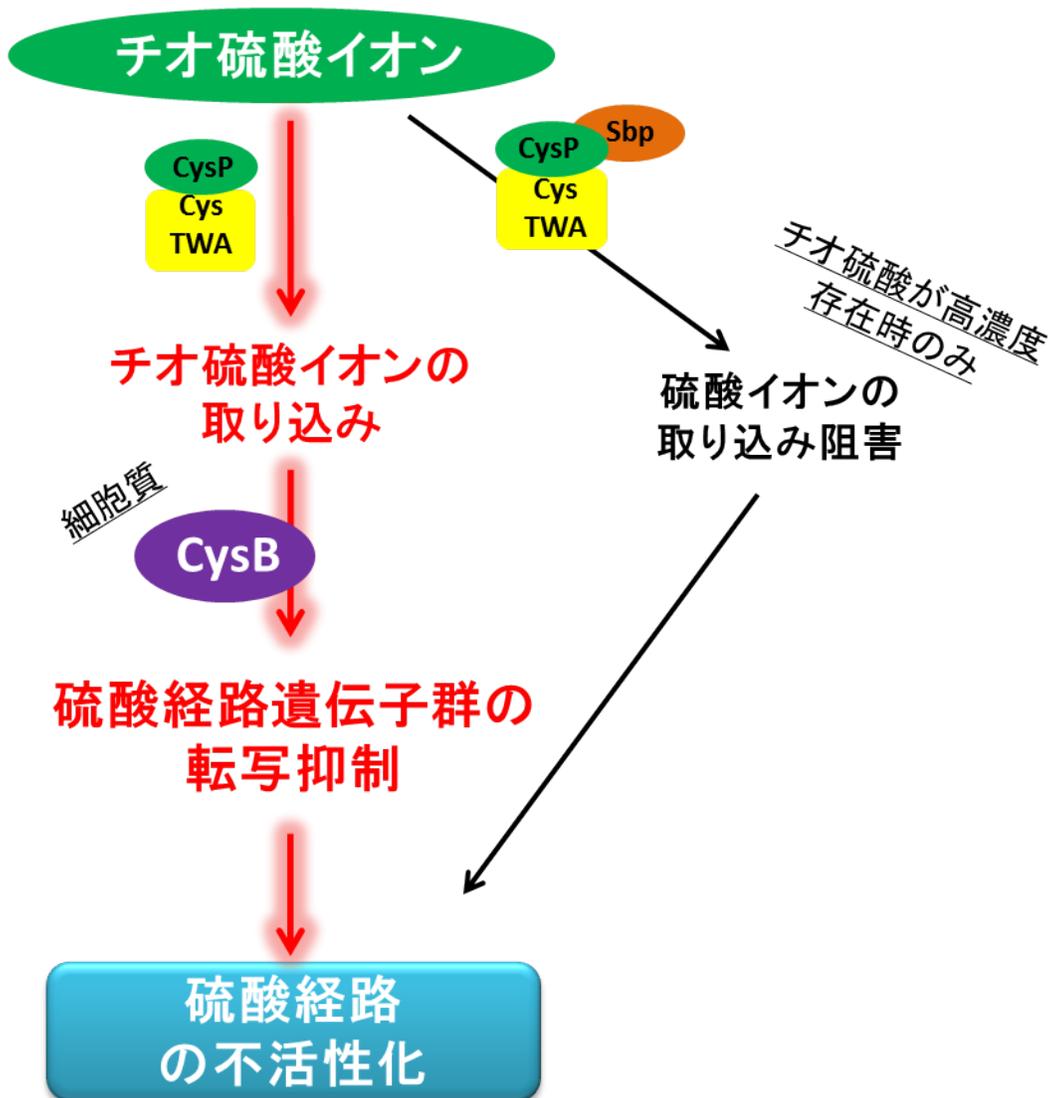
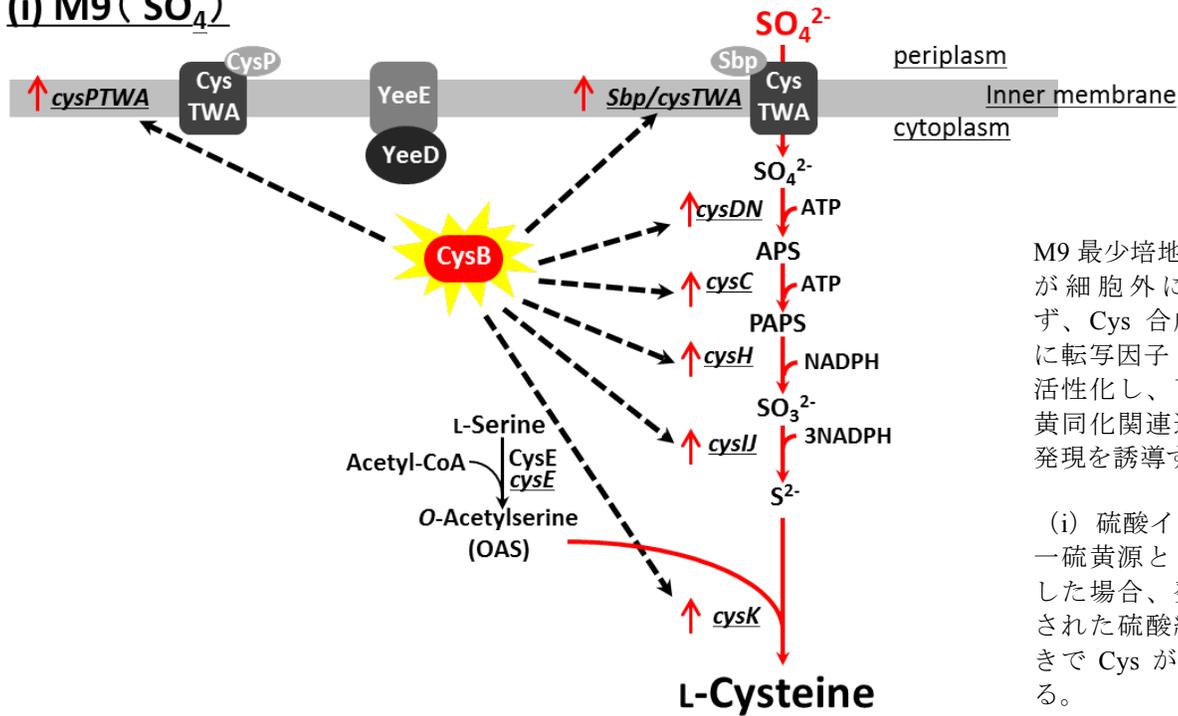


図 45 本研究により示された TSR の作用モデル

CysPTWA により細胞質内に取り込まれたチオ硫酸イオンが転写因子 CysB を介して、硫酸経路遺伝子群の転写を抑制し、硫酸経路を不活性化する。チオ硫酸イオンが高濃度（硫酸イオンと等量以上）存在するときには、さらに細胞内への硫酸イオンの取り込み阻害も同時に起こる。

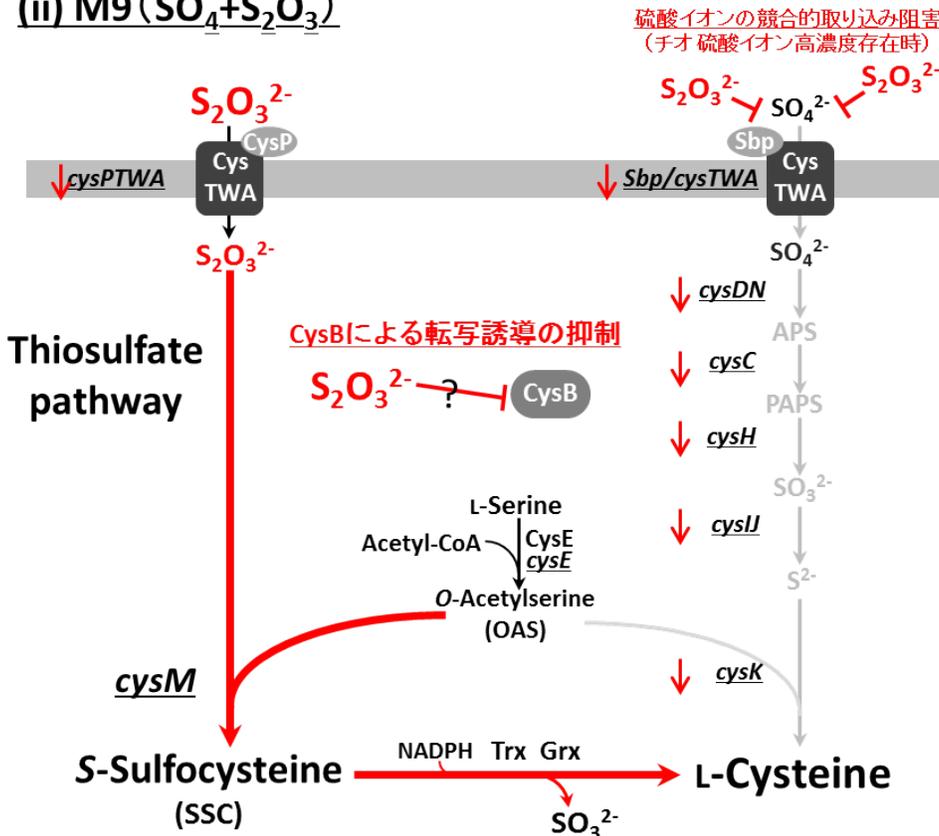
(i) M9 (SO₄)



M9 最少培地では Cys が細胞外に存在せず、Cys 合成のために転写因子 CysB が活性化し、下流の硫黄同化関連遺伝子の発現を誘導する。

(i) 硫酸イオンを単一硫黄源として培養した場合、発現誘導された硫酸経路の働きで Cys が合成される。

(ii) M9 (SO₄+S₂O₃)



硫酸イオンの競合的取り込み阻害
(チオ硫酸イオン高濃度存在時)

(ii) チオ硫酸イオンと硫酸イオンが共存する場合 (TSR が起こる条件)。

CysPTWA 依存的に細胞質内に、チオ硫酸イオンが輸送される。チオ硫酸イオンが硫酸イオンと等量以上存在する場合のみ、CysTWA において硫酸イオンの競合的な取り込み阻害が起こる。さらに、細胞質内に取り込まれたチオ硫酸イオンが、転写因子 CysB の活性を低下させることで、CysB レギュロンの発現誘導が解除される。

このとき、CysB レギュロン非依存的に発現する CysM 及び Trx・Grx (SSC の還元酵素) の働きにより、チオ硫酸経路優先的に Cys が合成されることが示唆された。

図 46 TSR における転写因子 CysB の働き

謝辞

博士前期課程を修了後、私の本学の博士後期課程へ復学したいという申し入れを快諾してくださり、また本研究の遂行を通して熱心にご指導いただいた奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 ストレス微生物学研究室の高木博史教授に心より御礼申し上げます。

また、日頃から実験面で直接ご指導頂き、公私共に大変お世話になった同研究室の大津巖生助教に御礼申し上げます。大津助教との時間を惜しまないディスカッションは、研究の考え方、及び人として未熟な自分を成長させてもらえました。そして、同研究室で様々なご助言やご協力を頂いた吉田信行助教（現・静岡大学工学部 准教授）、森ヶ崎進博士（現・同大学院大学 細胞シグナル研究室 博士研究員）、河野祐介博士に深く御礼申し上げます。

さらに、アドバイザーとして、本研究の遂行にあたり様々なご指摘、ご助言を頂いた本学の原核生物分子遺伝学研究室の真木寿治教授、秋山昌広准教授、システム微生物学研究室の森浩禎教授、にも心より御礼申し上げます。また、菌株の提供、二重欠損株ライブラリーの構築に関してお世話になった、本学、システム微生物学研究室の森浩禎教授、中屋敷徹助教（現・神戸大学 博士研究員）、山本奈津子博士、竹内力矢氏にも厚く御礼申し上げます。また、細胞内還元力の測定にあたり、ご協力いただいた東京工業大学 資源科学研究所 生物資源部門の島田友裕助教にも厚く御礼申し上げます。

さらに、日頃より多大なるご協力を頂き、日々の生活を支えていただいたシステムグループのメンバーを始め、同研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。

最後に、企業を退職して博士後期課程に進みたいという私のわがまを許し、常に私をサポートし続けてくれた妻の芳理を始め、家族に心から感謝いたします。

参考文献

- Aguilar-Barajas, E., Díaz-Pérez, C., Ramírez-Díaz, M. I., Riveros-Rosas, H. and Cervantes, C. (2011) Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions. *Biometals* **24**, 687-707.
- Amend, J. P., Edwards, K. J. and Lyons, T. W. (2004) Sulfur Biogeochemistry—Past and Present. *Geol. Soc. Amer.* **379**, 97-116.
- Awano, N., Wada, M., Kohdoh, A., Oikawa, T., Takagi, H. and Nakamori, S. (2003) Effect of cysteine desulfhydrase gene disruption on l-cysteine overproduction in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 239-243.
- Awano, N., Wada, M., Mori, H., Nakamori, S. and Takagi, H. (2005) Identification and functional analysis of cysteine desulfhydrases in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4149-4152.
- Baba, T., Arai, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Kirill, Tomita, M., Warner, B. L. and Mori, K. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, E1–E11.
- Cheng, H., Donahue, J. L., Battle, S. E., Ray, W. K. and Larson, T. J. (2008) Biochemical and genetic characterization of PspE and GlpE, two single-domain sulfurtransferases of *Escherichia coli*. *Open. Microbiol. J.* **2**, 18-28.
- Cipollone, R., Ascenzi, P., Tomao, P., Imperi, F. and Visca, P. (2008) Enzymatic detoxification of cyanide: clues from *Pseudomonas aeruginosa* Rhodanese. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 199-211.
- Claus, T. M., Zocher, G. E., Maier, T. H. P. and Schulz, G. E. (2005) Structure of the O-Acetylselene sulfhydrase isoenzyme CysM from *Escherichia coli*. *Biochem. US.* **44**, 8620-8626.
- Colyer, T. E. and Kredich, N. M. (1994) Residue threonine-149 of the *Salmonella typhimurium* CysB transcription activator: mutations causing constitutive expression of positively regulated genes of the cysteine regulon. *Mol. Microbiol.* **13**, 797-805.

- Crane, B. R. and Getzoff, E. D. (1996) The relationship between structure and function for the sulfite reductases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 744–756.
- Crane, B. R., Siegel, L. M. and Getzoff, E. D. (1997) Structures of the siroheme and Fe₄S₄-containing active center of sulfite reductase in different states of oxidation: heme activation via reduction-gated exogenous ligand exchange. *Biochemistry* **36**, 12101–12119.
- Daßler, T., Maier, T., Winterhalter, C. and Böck, A. (2000) Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway. *Mol. Microbiol.* **36**, 1101-1112.
- Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6640-6645.
- Deana, A., Celesnik, H. and Belasco, J. G. (2008) The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. *Nature* **451**, 355-358.
- Denk, D. and Böck, A. (1987) L-Cysteine biosynthesis in *Escherichia coli*: nucleotide sequence and expression of the serine acetyltransferase gene from the wild-type and cysteine excreting mutant. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 515-525.
- Duffy, J.I. (1980) Chemicals by enzymatic and microbial processes. *Chem. Tech. Rev.* **161**, New Jersey: Noyes Data Corporation.
- Fernandes, A. P., Fladvad, M., Berndt, C., Andresen, C., Lillig, C. R., Neubauer, P., Sunnerhagen, M., Holmgren, A. and Vlamis-Gardikas, A. (2005) A novel monothiol Glutaredoxin (Grx4) from *Escherichia coli* can serve as a substrate for Thioredoxin Reductase. *J.Biol.Chem.* **280**, 24544- 24552.
- Funane, K., Iwahashi, H. and Nakamura, T. (1986) Metabolism of S-Sulfocysteine in *Salmonella typhimurium*. Role of Thioredoxin in the reduction of S-Sulfocysteine. *Agric. Biol.Chem.* **51**, 215-218
- Gaitonde, M.K. (1967) A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem. J.* **104**, 627-633.

Gladyshev, V. N., Liu, A., Novoselov, S. V., Krysan, K., Sun, Q., Kryukov, V. M., Kryukov, G. V. and Lou, M. F. (2001) Identification and Characterization of a New Mammalian Glutaredoxin (Thioltransferase), Grx2. *J. Biol.Chem.* **10**, 30374-30380.

Görke, B. and Stülke, J. (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 613-624.

Hara, M. R., Agrawal, N., Kim, S. F., Cascio, M. B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J. H., Tankou, S. K., Hester, L. D., Ferris, C. D., Hayward, S. D., Snyder, S. H. and Sawa, A.(2005) *S*-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol.* **7**, 665-674.

Hildebrandt, T. M. and Grieshaber, M. K. (2008) Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *FEBS. J.* **275**, 3352-3361.

Hockenhul, J. D. (1949) The sulphur metabolism of mould fungi: the use of biochemical mutant strains of *Aspergillus nidulans* in elucidating the biosynthesis of cysteine. *Biochim. biophys. Acta.* **3**, 826-831.

Holmgren, A. (1979) Reduction of disulfides by Thioredoxon. *J. Biol.Chem.* **254**, 9113-9119.

Holmgren, A. and Aslund, F. (1995) Glutaredoxin. *Method. Enzymol.* **252**, 283-292.

Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lonn, M. E., Hudemann, C. and Lillig, C. (2005) Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1375-1377.

Hryniewicz, M. M. and Kredich, N. M. (1991) The *cysP* promoter of *Salmonella typhimurium*: characterization of two binding sites for CysB protein, studies of *in vivo* transcription initiation, and demonstration of the anti-inducer effects of thiosulfate. *J. Bacteriol.* **173**, 5876-5886.

Hryniewicz, M. M., Sirko, A., Pałucha, A., Böck, A. and Hulanicka, D. (1990) Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: identification of a gene encoding a novel protein involved in thiosulfate binding. *J. Bacteriol.* **172**, 3358-3366.

- Ikeda, M. (2003) Amino acid production process. *Adv. Biochem. Eng.* **79**, 1-35.
- Ismail, T. H., Hart, C. A. and McLennan, A. G. (2003) Regulation of dinucleoside polyphosphate pools by the YgdP and ApaH hydrolases is essential for the ability of *Salmonella enterica serovar Typhimurium* to invade cultured mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 32602-32607.
- Janick, P. A., Rueger, D. C., Krueger, R. J., Barber, M. J. and Siegel, L. M. (1983) Characterization of complexes between *Escherichia coli* sulfite reductase hemoprotein subunit and its substrates sulfite and nitrite. *Biochemistry* **22**, 396-408.
- Jordan, A., Åslund, F., Pontis, E., Reichard, P. and Holmgren, A. (1997) Characterization of *Escherichia coli* NrdH. *J. Biol. Chem.* **272**, 18044-18050.
- Jovanovic, M., Lilic, M., Savic, D. J. and Jovanovic, G. (2003) The LysR-type transcriptional regulator CysB controls the repression of hslJ transcription in *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**, 3449-3459.
- Kredich, N.M. (1992) The molecular basis for positive regulation of *cys* promoters in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**, 2747-2753.
- Leinfelder, W. and Heinrich, P. (1997) Process for preparing *O*-acetylserine, L-cysteine and L-cysteine-related products. *German patent* number WO 97/15673.
- Liu, Y., Zhu, X., Nakamura, A., Orlando, R., Söll, D. and Whitman, W. B. (2012) Biosynthesis of 4-thiouridine in tRNA in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *J. Biol. Chem.* **26**, 287, 36683-36692.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lochowska, A., Iwanicka-Nowicka, R., Plochocka, D. and Hryniewicz, M. M. (2001). Functional dissection of the LysR-type CysB transcriptional Regulator. *J. Biol. Chem.* **276**, 2098-2107.
- Lochowska, A., Iwanicka-Nowicka, R., Zaim, J., Witkowska-Zimny, M., Bolewska, K. and Hryniewicz, M. M. (2004) Identification of activating region (AR) of *Escherichia coli*

LysR-type transcription factor CysB and CysB contact site on RNA polymerase alpha subunit at the *cysP* promoter. *Mol. Microbiol.* **53**, 791-806.

Meyer, Y., Buchanan, B.B., Vignols, F. and Reichheld, J. P. (2009) Thioredoxins and Glutaredoxins : Unifying elements in redox biology. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 335-367.

Migueluez, E. M., Fernandez, M. and Hardisson, C.(1997) Nitrogen starvation-induced glycogen-synthesis depends on the developmental stage of *Streptomyces-antibioticus* mycelium. *FEMS microb. lett.***153**, 57-62.

Morigasaki, S., Shimada, K., Ikner, A., Yanagida, M. and Shiozaki, K. (2008) Glycolytic enzyme GAPDH promotes peroxide stress signaling through multistep phosphorelay to a MAPK cascade. *Mol. Cell* **30**, 108-113.

Muyzer1, G. and Stams, A. J. M. (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat. Rev. Microb.***6**, 441-454.

Nakamori, S. (2008) Systematic survey of the technical development of fermentative production of amino acids. *Nat. Muse. Nat. Sci.* **43**, 335-367.

Nakamura, T., Kon,Y., Iwahashi, H. and Eguchi, Y. (1983) Evidence that thiosulfate assimilation of *Salmonella typhimurium* is catalyzed by cysteine synthase B. *J. Bacteriol.* **156**, 656-662.

Nakatani, T., Ohtsu, I., Nonaka, G., Wiriathanawudhiwong, N., Morigasaki, S. and Takagi, H. (2012) Enhancement of thioredoxin/glutaredoxin-mediated L-cysteine synthesis from S-sulfocysteine increases L-cysteine production in *Escherichia coli*. *Microb. Cell. Fact.* **11**: 62, doi: 10.1186/1475-2859-11-62.

Ohtsu, I., Wiriathanawudhiwong, N., Morigasaki, S., Nakatani, T., Kadokura, H. and Takagi, H. (2010) The L-cysteine/L-cystine shuttle system provides reducing equivalents to the periplasm in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **285**, 17479-17487.

Quan, J. A., Schneider, B. L., Paulsen, I. T., Yamada, M., Kredich, N. M. and Saier, M. H. (2002) Regulation of carbon utilization by sulfur availability in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* **148**, 123-131.

Richardson, B., Orcutt, D. M., Schwertner, H. A., Martinez, C. L. and Wickline, H. E. (1969) Effects of nitrogen limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture. *Appl. Microbiol.* **18**, 245-250.

Russel, M., Model, P. and Holmgren, A. (1990) Thioredoxin or glutaredoxin in *Escherichia coli* is essential for sulfate reduction but not for deoxyribonucleotide synthesis. *J. Bacteriol.* **172**, 1923-1929.

Sano, K., Eguchi, C., Yasuda, N. and Mitsugi, K. (1979) Metabolic pathway for L-cysteine formation from dl-2-amino- Δ^2 -thiazoline-4-carboxylic acid by *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 2373-2374.

Sano, K. and Mitsugi, K. (1978) Enzymatic production of l-cysteine from dl-2-amino- Δ^2 -thiazoline-4-carboxylic acid by *Pseudomonas thiazolinophium*: optimal conditions for the enzyme formation and enzymatic reaction. *Agric. Biol. Chem.* **42**, 2315-2321.

Schure, E. G., Van-Riel, N. A. and Verrips, C. T. (2000) The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS.Microbiol. Rev.* **24**, 67-83.

Sekowska, A., Kung, H. F. and Danchin, A. (2000) Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 145-177.

Soda, K. (1987). Microbial sulfur amino acids: an overview. *Methods Enzymol.* **143**, 453-459.

Tyrrell, R., Verschueren, K. H., Dodson, E. J., Murshudov, G. N., Addy, C. and Wilkinson, A. J. (1997) The structure of the cofactor-binding fragment of the LysR family member, CysB: a familiar fold with a surprising subunit arrangement. *Structure* **5**, 1017-1032.

Vlami-Gardikas, A. (2008) The multiple function of the thiol based electron flow pathways of *Escherichia coli*: Eternal concepts revisited. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **1780**, 1170-1200.

Wada, M. and Takagi, H. (2006) Metabolic pathways and biotechnological production of L-cysteine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 48-54.

Wiriyathanawudhiwong, N., Ohtsu, I., Li, Z., Mori, H. and Takagi, H. (2009) The outer membrane TolC is involved in cysteine tolerance and overproduction in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 903-913.

Yamada, S., Awano, N., Inubushi, K., Maeda, E., Nakamori, S., Nishino, K., Yamaguchi, A. and Takagi, H. (2006) Effect of drug transporter genes on cysteine export and overproduction in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 4735-4742.

Ziyatdinov, M. K., Redkina, E. I. and Gussyatiner, M. M. (2005) Method for producing L-cysteine using bacteria belonging to genus *Escherichia*. Japanese patent 2005-137369.

Zopfi, J., Ferdelman, T. G. and Fossing, H. (2004) Distribution and fate of sulfur intermediates sulfite, tetrathionate, thiosulfate, and elemental sulfur in marine sediments *Geol. Soc. Am.* **379**, 97-116.

草田善之, 大腸菌の二重遺伝子欠失による大規模遺伝的相互作用解析, 平成 21 年度 本学修士論文, 0871044

船岡宣孝, 大腸菌二重欠失株作製による遺伝子間相互作用ネットワークの解明, 平成 21 年度, 本学修士論文, 0871099