

(別紙1)

論文内容の要旨

申請者氏名 仲谷 豪

微生物にはカタボライトリプレッションのような特定の炭素源・窒素源を優先的に利用する機構が存在する。しかしながら、硫黄源に関する選択的な利用機構については、分子レベルでほとんど理解されていない。大腸菌には、*O*-アセチルセリン (OAS) をシステイン (Cys) に変換する酵素として、2種類の OAS スルフヒドラーゼ (CysK, CysM) が存在する。前者は硫酸経路によって、 SO_4^{2-} (硫酸イオン) から2分子の ATP を消費して生成する S^{2-} (硫化物イオン) を硫黄源として Cys を合成する。一方、後者はチオ硫酸経路で作用し、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (チオ硫酸イオン) を硫黄源として *S*-スルホシステイン (SSC) を合成し、その後 Cys へと還元される。これまでに硫酸経路の制御機構はよく理解されているが、チオ硫酸経路は SSC を Cys へ還元する酵素の同定を含め、制御機構が不明であることから、この経路の解明は大腸菌における Cys 生合成系の完全な理解と Cys の発酵生産への応用に極めて重要である。

本研究では、まず SSC から Cys への変換にグルタレドキシシン様還元酵素 (Grx1, NrdH) が関わること、およびその過剰発現が Cys の発酵生産に有効であることを明らかにした。またその研究過程において、チオ硫酸経路を欠損させると、硫酸経路を介して Cys を合成できるにも関わらず、チオ硫酸イオンの添加により Cys 合成が著しく抑制されることを見出した。チオ硫酸経路は硫酸経路と比較して、ATP と NADPH の消費、反応ステップが少ないなどの利点があり、実際に硫黄源を硫酸イオンからチオ硫酸イオンに変えると、大腸菌の生育が促進されることも判明した。以上のことから、チオ硫酸イオンと硫酸イオンの両方が細胞外に存在する場合、チオ硫酸イオンによって硫酸イオンの利用が抑制され、チオ硫酸イオン優先的な Cys 合成が起こることが示唆された。本研究では、この現象を無機硫黄源の優先的な利用機構であると考え、「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。

まず、チオ硫酸イオン添加時の野生株の転写応答をトランスクリプトーム解析により調べた。その結果、硫酸経路の遺伝子群を含む複数の硫黄同化関連遺伝子の転写が有意に抑制されることを見出した。また、転写が抑制された遺伝子の誘導に関わる転写因子 CysB の構成的活性型変異体を用いた解析から、チオ硫酸イオンによる転写抑制は CysB に依存することが判明した。さらに、TSR のサプレッサー変異株 (Sup1) を単離し、解析したところ、Sup1 ではチオ硫酸結合タンパク質 CysP をコードする遺伝子に 81 bp の欠失が生じていた。また、チオ硫酸イオンの取り込みはインポーター CysPTWA が担っており、この CysPTWA によるチオ硫酸イオンの細胞質内への輸送が CysB による転写抑制に必要であることが示された。以上の結果より、CysPTWA により取り込まれたチオ硫酸イオンが CysB を介して硫酸経路遺伝子の発現を抑制することで、チオ硫酸経路優先的に Cys が合成されるという TSR の作用モデルが考えられた。

(別紙2)

論文審査結果の要旨

申請者氏名 仲谷 豪

微生物にはカタボライトリプレッションのような特定の炭素源・窒素源を優先的に利用する機構が存在する。しかしながら、硫黄源に関する選択的な利用機構については、分子レベルでほとんど理解されていない。大腸菌には、硫酸イオンとチオ硫酸イオンそれぞれを硫黄源とする2種類のシステイン (Cys) 合成経路が存在する。硫酸経路の制御機構はよく理解されているが、チオ硫酸経路は *S*-スルホシステイン (SSC) を Cys へ還元する酵素の同定を含め、制御機構が分かっておらず、この経路の解明は Cys 生合成系の完全な理解と Cys 発酵生産への応用に直結する。申請者は、大腸菌におけるチオ硫酸経路の解析、及びその Cys 発酵生産への応用を通して、以下に示す硫黄源の選択的な利用機構について新たな知見や重要な結果を得た。

- 1) チオ硫酸経路における SSC の Cys への還元を亢進するタンパク質として、グルタレドキシシン様酵素である 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を硫酸経路にリクルートし、還元反応を促進することで、発酵生産性の向上に成功した。
- 2) 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、チオ硫酸イオンによって硫酸イオンの利用が抑制され、チオ硫酸経路優先的な Cys 合成が起こることを見出した。また、硫黄源を硫酸イオンからチオ硫酸イオンに変えることで、大腸菌の生育が促進されることが判明した。
- 3) 上記の現象を無機硫黄源の優先的な利用機構であると考え、「チオ硫酸リプレッション (ThioSulfate Repression; TSR)」と名付けた。
- 4) TSR の分子機構として、チオ硫酸イオンによって転写因子 CysB 依存的な硫酸経路遺伝子群の転写が有意に抑制されることを明らかにした。
- 5) TSR のサプレッサー変異株 (Sup1) の解析から、遊離のチオ硫酸イオンの取り込みはインポーター CysPTWA が担っており、CysPTWA によるチオ硫酸イオンの細胞質内への輸送が CysB による転写抑制に必要であることが強く示唆された。

これらの結果から、大腸菌の細胞外にチオ硫酸イオンと硫酸イオンが存在する場合、チオ硫酸イオンが転写因子 CysB 依存的に硫酸経路遺伝子群の発現を抑制することで、チオ硫酸経路優先的な Cys 合成 (TSR) が起こることを初めて明らかにした。TSR の発見を糸口に、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、炭素源・窒素源の代謝制御などに関する新しい分子機構の発見に繋がる可能性がある。

以上のように、本論文は大腸菌においてチオ硫酸経路の強化による Cys 発酵生産性の向上、及びその過程で無機硫黄源の選択的な利用機構として TSR を見出したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。