

# 論文内容の要旨

申請者氏名 伊計 舞

大腸菌は、無機硫黄である硫酸イオン ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) やチオ硫酸イオン ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) を細胞内に取り込み、硫黄を含むアミノ酸であるシステインやメチオニンなどの有機硫黄化合物を合成する。硫酸イオンとチオ硫酸イオンの取り込みには CysU/W/A 複合体が主に働くが、近年、膜タンパク質 YeeE (TsuA) が新たなチオ硫酸イオン輸送体として働くことが示され、その結晶構造が報告された。YeeE は 9 本の膜貫通ヘリックスを含む 13 のヘリックスとループで構成された他のタンパク質には見られない特徴的な構造をもつ。立体構造とそれに基づく解析から、YeeE はペリプラズム側の正に帯電した凹みでチオ硫酸イオンを捕捉し、内部のループに位置する保存された 3 つのシステイン残基を用いてチオ硫酸イオンを細胞質までリレー輸送することが提唱された。YeeD (TsuB) は、YeeE と同一オペロンから転写される細胞質タンパク質であり、YeeE と共同して働く可能性が示唆されている。また、YeeD は、硫黄源転移酵素に保存された活性モチーフ (CPxP) を持っており、チオ硫酸イオンを分解する機能を持つことが予測される。しかし、YeeE と YeeD がどのように連携してチオ硫酸イオンを取り込んでいるのかは不明であり、また YeeD の機能の詳細も明らかになっていない。そこで本研究では、YeeE, YeeD を経由するチオ硫酸イオンの代謝経路を解明することを目的とした。はじめに、好熱菌 *Spirochaeta thermophila* 由来 YeeE (*StYeeE*) を再構成したプロテオリポソームを用いた固体支持膜電気生理学的手法により、*StYeeE* がチオ硫酸イオンを選択的に輸送することを実験的に示した。次に無機硫黄源取り込みの経路が機能しない  $\Delta \text{cysPUWA} \Delta \text{yeeE}$  大腸菌株を用いた生育相補解析により、*EcYeeE* だけでなく *EcYeeD* もチオ硫酸イオンの取り込みに必須であることが示された。同様に *EcYeeD* 変異体を用いた生育相補解析を行い、*EcYeeD* の重要な残基 C13 と C39 を同定した。さらに、YeeE と YeeD による協働的なチオ硫酸イオン取り込みのより詳細な解析を目指し、*StYeeE-StYeeD* 融合タンパク質の結晶を用いて X 線回折実験を行ったところ、約 2.6 Å の回折データが得られた。得られた立体構造から、*StYeeD* は *StYeeE* の細胞質側の凹みに存在し、YeeD のシステイン残基は、YeeE とのインターフェースに存在し、YeeE-YeeD 複合体の 4 つ目のシステインとして機能することで、YeeE に保存された 3 つのシステイン残基からチオ硫酸を享受しやすくなっていることが示唆された。次に、YeeE-YeeD の相互作用を検証するため、精製した *StYeeE-StYeeD* を用いて、バイオレイヤー干渉法 (BLI) を利用した *in vitro* 相互作用解析実験を行ったところ、YeeE は YeeD と直接相互作用し、YeeE-YeeD の相互作用は基質であるチオ硫酸イオンの影響を受けることが示唆された。さらに、精製 *StYeeD* を用いた YeeD の *in vitro* 活性測定と質量分析を行い、YeeD が保存されたシステイン残基を用いてチオ硫酸イオンを分解することを見出した。さらに、X 線回折実験により得られた *StYeeE-StYeeD* 融合タンパク質の立体構造をもとに変異体を作成し、*in vitro* 相互作用解析や、*in vivo* 生育相補解析を行い、YeeE と YeeD の相互作用に重要なアミノ酸を同定・評価した。最後に得られた研究結果から、YeeE, YeeD を介した新しいチオ硫酸イオン取り込みと分解のモデルを提唱した。

やむを得ない事由[ 図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ( ) ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 伊計 舞

申請者はチオ硫酸イオンの取り込みに関与する膜タンパク質 YeeE 及びその関連因子である YeeD を対象として、構造生物学的、遺伝学的、生化学的手法などを用いた研究を行った。

チオ硫酸イオン取り込みに関与する膜タンパク質 YeeE については、*Spirochaeta thermophila* 由来 YeeE を再構成したプロテオリポソームを用いた固体支持膜電気生理学的手法により、StYeeE を含むプロテオリポソームがチオ硫酸イオンを選択的に取り込むことを明らかにした。先行研究により YeeE によるチオ硫酸取り込みの機能が *in vivo* の解析から示唆されていたが、本成果は精製タンパク質を用いて初めて実験的に示した。

YeeE と YeeD の機能連携については、*in vivo* 生育相補解析実験から、チオ硫酸取り込みには、YeeE だけでなく YeeD も重要であることを明らかとし、加えて YeeD に保存されたシステイン残基が重要であることも示した。このことにより、YeeE と YeeD が機能を連携していることが強く示唆された。

さらに、申請者は本論文にて、これまで明らかになっていなかった YeeE-YeeD 複合体の構造を 2.6 Å 分解能で決定した。この成果は、YeeE-YeeD 複合体の構造や機能に関する詳細な議論を可能とするものである。この構造情報から、YeeE は YeeD の細胞質側の凹みに位置していること、YeeD に保存されたシステインが YeeE-YeeD 複合体の 4 つ目のシステインとして機能することで、チオ硫酸イオンを受け取り分解しやすくなっていることが示唆された。

YeeE と YeeD の相互作用を検証するため、申請者は精製タンパク質を用いた *in vitro* 相互作用解析実験を行い、YeeE は YeeD と直接相互作用し、YeeE と YeeD の相互作用は基質であるチオ硫酸イオンの影響を受けることを見出した。さらに、YeeE-YeeD 複合体構造を基に相互作用や機能に重要とされるアミノ酸残基を本手法により評価した。

YeeE 関連因子 YeeD の機能を探るため、YeeD の *in vitro* 活性測定と質量分析を行い、YeeD に保存されたシステイン残基が、チオ硫酸イオンを分解することを見出した。この成果は、YeeD の機能を実験的に解明したものである。

これらの結果を統合して申請者は、YeeE と YeeD によるチオ硫酸イオンの取り込みと分解の分子メカニズムを提唱した。これまで、大腸菌のチオ硫酸取り込みのタンパク質として、ATP のエネルギーを使用する ABC 輸送体が知られていたが、申請者の進めた一連の研究成果は、それとは全く異なった新たなチオ硫酸取り込みの経路の詳細な理解である。本研究成果は輸送体の分子メカニズムを明らかとする研究の基盤情報となるだけでなく、微生物による効率的なシステイン生産を可能とする基盤情報ともなる。

以上のように、本論文は、生物にとって重要な硫黄源のタンパク質による取り込みや分解などの代謝経路に新たな知見を提供し、人類の生活に貢献するもので、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。

やむを得ない事由[ 図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他（ ）]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】