

博士論文番号：1281008

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における  
チオ硫酸イオン同化経路の解析

佐伯 恭平

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 29 年 1 月 23 日

# 目次

序論.....	5
大腸菌における硫黄同化経路.....	7
酵母における硫黄同化経路.....	11
第1章 酵母におけるチオ硫酸イオン同化経路の探索.....	14
1-1 . 緒言.....	14
1-2 . 材料と方法.....	15
1-2-1 . 使用菌株.....	15
1-2-1-1 . 酵母.....	15
1-2-1-2 . 大腸菌.....	15
1-2-2 . プラスミド.....	15
1-2-3 . 培地組成および生育条件.....	20
1-2-3-1 . 酵母.....	20
1-2-3-2 . 大腸菌.....	22
1-2-4 . サルファーインデックス解析.....	22
1-2-5 . 硫黄転移酵素遺伝子の探索.....	23
1-2-6 . その他.....	23
1-3 . 結果.....	26
1-3-1 . チオ硫酸イオンは酵母にとって好ましい硫黄源である.....	26
1-3-2 . チオ硫酸イオンは細胞内で亜硫酸イオンおよび硫化物イオンへ変換される.....	29
1-3-3 . <i>RDL1</i> 遺伝子の破壊はチオ硫酸イオン同化能の低下につながる.....	31
1-3-4 . システインシンターゼ様遺伝子 <i>YGR012W</i> はチオ硫酸イオン同化において主要な役割を有していない.....	36
1-3-5 . 他のロダネーゼドメインを持つタンパク質はチオ硫酸イオン同化において主要な役割を有していない.....	36
1-3-6 . チオ硫酸イオン同化経路を担うロダネーゼには重複性がある.....	38
1-3-7 . <i>Rdl1</i> および <i>Rdl2</i> はチオ硫酸イオン同化経路を担う主たるロダネーゼである.....	41
1-3-8 . グルタレドキシンはチオ硫酸イオン同化経路に関与する可能性.....	

がある .....	44
<b>1-4 . 考察.....</b>	<b>50</b>
1-4-1 . Rdl1 および Rdl2 の機能.....	50
1-4-2 . 先行研究との相違点 .....	51
1-4-3 . Uba4 の機能.....	52
1-4-4 . チオ硫酸イオン同化経路の局在 .....	53
1-4-5 . チオ硫酸イオンの取り込み系 .....	53
1-4-6 . チオレドキシンおよびグルタレドキシン .....	54
1-4-7 . 酵母におけるチオ硫酸リプレッション .....	54
1-4-8 . チオ硫酸同化経路のエネルギー的な有利さ .....	55
<b>第2章 チオ硫酸イオン同化経路が酵母の細胞機能に及ぼす影響の解析.....</b>	<b>58</b>
<b>2-1 . 緒言.....</b>	<b>58</b>
<b>2-2 . 材料と方法.....</b>	<b>59</b>
2-2-1 . 使用菌株 .....	59
2-2-2 . プラスミド .....	59
2-2-3 . 培地組成および生育条件 .....	59
2-2-4 . 細胞内代謝産物の抽出と CE-MS 解析 .....	59
2-2-4-1 . 細胞内の NADPH 含量の測定 .....	60
2-2-4-2 . <sup>13</sup> C グルコースを用いた炭素代謝フラックス解析.....	60
2-2-5 . エタノール生産能の評価 .....	60
2-2-5-1 . 培地中グルコース濃度の測定 .....	60
2-2-5-2 . 培地中エタノール濃度の測定 .....	61
2-2-6 . ファーモグラフ .....	61
2-2-7 . ストレス感受性の試験 .....	61
2-2-8 . 硫化水素の検出 .....	61
<b>2-3 . 結果.....</b>	<b>63</b>
2-3-1 . チオ硫酸イオン同化時には細胞内の NADPH 量が上昇する.....	63
2-3-2 . チオ硫酸イオン同化時にはペントースリン酸経路のフローが低下し、解糖系のフローが亢進する .....	64
2-3-3 . チオ硫酸イオン同化時にはエタノール発酵速度が向上する ....	66
2-3-4 . チオ硫酸イオンを硫黄源とした際にはストレス耐性が向上する .....	69

2-3-5 . チオ硫酸イオンを硫黄源とした際にグルコースが枯渇すると硫化水素が生成する .....	72
<b>2-4 . 考察.....</b>	<b>74</b>
2-4-1 . 代謝フローの変化 .....	74
2-4-2 . ストレス耐性のメカニズム .....	74
2-4-3 . エタノール発酵生産速度の向上とその発酵産業への応用性 ....	75
2-4-4 . 硫化水素の生成 .....	76
<b>総括.....</b>	<b>79</b>
<b>謝辞.....</b>	<b>80</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>81</b>

## 序論

硫黄は全生命に必須な元素である。多くの微生物や植物は、動物にはない「硫黄の同化能」を有しており、無機性の硫黄化合物（硫酸イオン、チオ硫酸イオンなど）から有機性の硫黄化合物（システイン、メチオニン、グルタチオンなど）を合成できる。つまり、我々ヒトを含めた動物は生命活動に必要な硫黄の供給を微生物や植物に依存しており、地球規模で考えれば動物が有機性硫黄化合物を分解することで無機性硫黄化合物を生成し、その無機性硫黄化合物をもとに微生物や植物が再び有機性硫黄化合物へ変換するという循環が起こっていると言える（図1）。実際、原核生物から真核生物の一部にまで、硫黄原子を炭素骨格分子に組み込む無機硫黄の同化経路は保存されていることから、その重要性が伺える。

また、硫黄は酸化数が+6（酸化型）から-2（還元型）まで様々な状態の化合物として存在することや、その高い反応性から酵素反応や生体内のシグナル伝達において重要な役割を担うことが知られているが、その動態の追跡は技術的に困難であり、未解明な点も多い。

チオ硫酸イオンは無機性硫黄化合物の1つであり、自然界では温泉や間欠泉等に存在する。また、動物の腸内にも豊富に存在することが知られている。そのナトリウム塩であるチオ硫酸ナトリウムは、写真の定着剤や、魚類飼育における脱塩素剤、医療分野でのシアン化合物の解毒剤など多岐に渡り使用されている。また、微生物培養においても大腸菌 *Escherichia coli*（以下、大腸菌）やサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium*（以下、サルモネラ菌）はチオ硫酸イオンを直接の基質とするシステインシンターゼによってこれを同化できることが知られている（Nakamura et al., 1983 ; Sirko et al., 1987）。

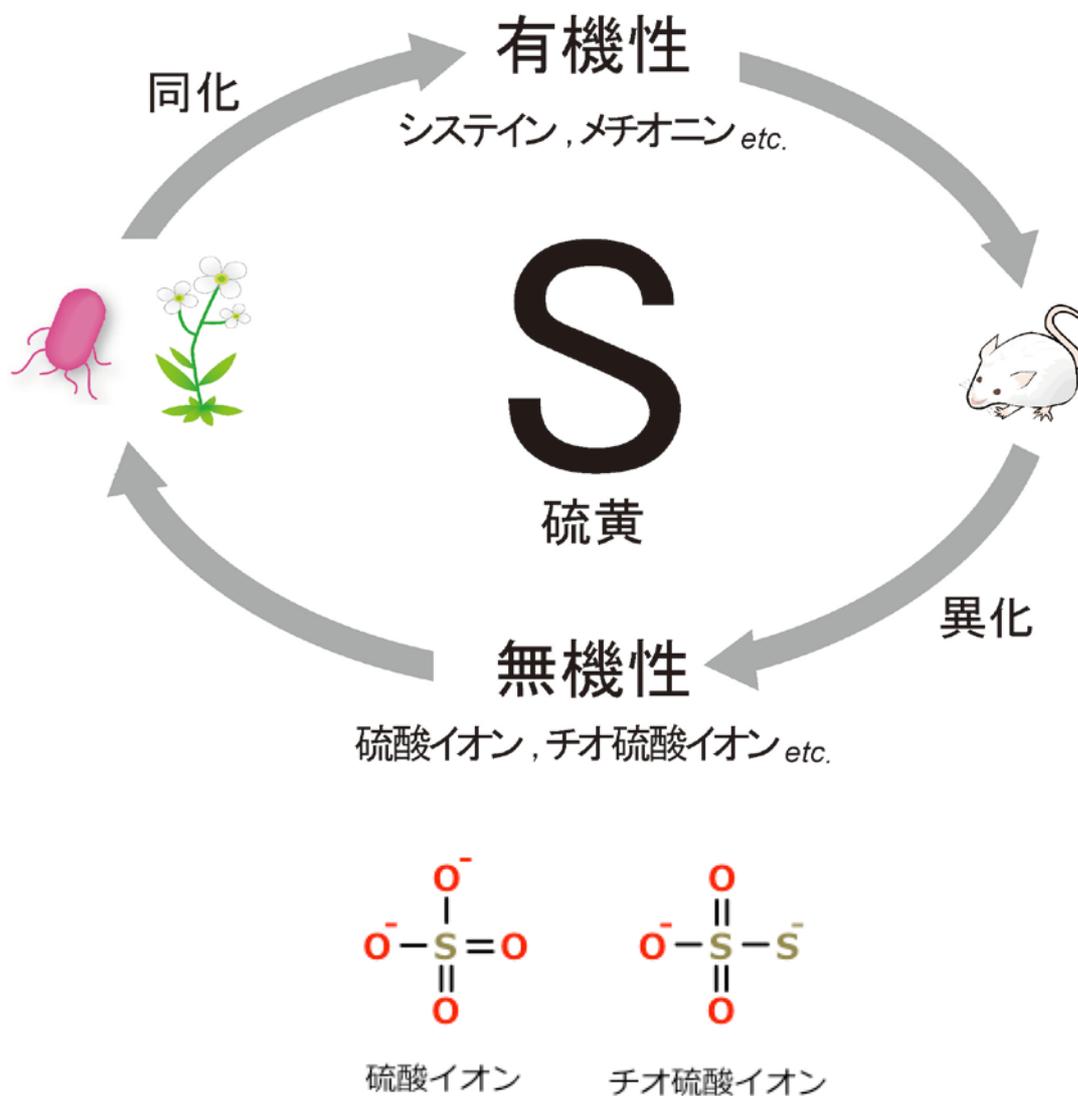


図1. 地球上の硫黄サイクル

微生物や植物は動物にはない硫黄同化能を有しており、硫酸イオンやチオ硫酸イオンなどの無機性の硫黄化合物をメチオニンやシステインなどの有機性の硫黄化合物に変換できる。

当研究室では現在までに、大腸菌やシアノバクテリアなどが生育する際、チオ硫酸イオン ( $S_2O_3^{2-}$ ) が一般的な微生物培養に用いられる硫酸イオン ( $SO_4^{2-}$ ) よりもエネルギー的に好ましい硫黄源であることを明らかにしてきた (仲谷豪: 平成25年度博士論文)。特に大腸菌においては、含硫アミノ酸であるシステインの発酵生産をきっかけに、チオ硫酸イオンと硫酸イオンが同時に環境中に存在する際、硫酸イオンの利用が抑制され、チオ硫酸イオンが優先的に利用される機構、すなわち硫黄源におけるカタボライトリプレッションを見出し、「チオ硫酸リプレッション」と名付けた (仲谷豪: 平成25年度博士論文)。

しかしながら、他の生物種におけるチオ硫酸イオンの代謝経路やその生理的役割に関しては不明な点が多い。

### 大腸菌における硫黄同化経路

大腸菌において、硫酸イオンの同化経路は、取り込まれた硫酸イオンが多段階の酵素反応により還元されることから始まる (図2) (Kredich, 1992)。まず硫酸イオン ( $SO_4^{2-}$ ) は ABC トランスポーターである CysTWA 複合体と基質結合タンパク質 Sbp によって、細胞内へ取り込まれる。次に、ATP スルフリラーゼ (CysDN) により、アデニル硫酸 (APS) へと変換され、その後は APS キナーゼ (CysC) によってホスホアデニル硫酸 (PAPS) へと変換される。さらに、PAPS レダクターゼ (CysH) によって亜硫酸イオンへと変換される。亜硫酸イオン ( $SO_3^{2-}$ ) は亜硫酸レダクターゼ (CysIJ) とシロヘムシンターゼ (CysG) によって硫化物イオン ( $S^{2-}$ ) となる。この硫化物イオンがシステインシンターゼ A (CysK) によって、*O*-アセチルセリンと結合し、システインへと変換される。大腸菌においては、システインが初発の有機性硫黄化合物であり、これをもとにメチオニンやグルタチオンといった生体機能に必要な有機性硫黄化合物を合成する。

一方、チオ硫酸イオンの同化経路については、以下のことが明らかになっている。チオ硫酸イオンは硫酸イオンと共通のトランスポーターである CysTWA 複合体と基質結合タンパク質 CysP によって取り込まれる。細胞内に取り込まれたチオ硫酸イオンがシステインシンターゼ B (CysM) によって *S*-スルホシステインへと変換される。*S*-スルホシステインはチオレドキシシンである NrdH、グルタレドキシシンである Grx1、そして非酵素的反応によって還元され、システインへと変換される (Nakatani et al., 2012)。また、この際に副産物として生じた亜硫

酸イオンは硫酸イオンの同化経路へ合流すると考えられている。

大腸菌における硫黄同化経路は以下のメカニズムで制御されている。システインが合成される際の炭素骨格となる *O*-アセチルセリンは、セリンアセチルトランスフェラーゼ (CysE) によってセリンから生成されるが、CysE の酵素活性はシステインによってフィードバック阻害を受ける (Denk and Böck, 1987 ; Kai et al., 2006)。また、硫黄同化経路に関与する遺伝子群の発現は転写因子 CysB によって制御されているが、CysB の活性化には *O*-アセチルセリンから非酵素的に生成される *N*-アセチルセリンが必要である (Hryniewicz and Kredich, 1991; Hryniewicz and Kredich, 1994)。これらの制御によって、過剰なシステインの合成が回避されている。

大腸菌において、CysM はチオ硫酸イオンの同化における鍵酵素であり、その破壊株 ( $\Delta$ cysM 株) はチオ硫酸イオンを単一の硫黄源とした環境で著しく生育が低下する。当研究室における解析から、過剰発現により  $\Delta$ cysM 株の生育を回復させる酵素としてチオ硫酸硫黄転移酵素 (以下、ロダナーゼ) を見出した (図 3)、ロダナーゼは進化的に広く保存されているが、その生理的機能についてはあまり明らかになっていない。一方で、呼吸鎖を阻害することで毒性を示すシアンに対してチオ硫酸イオンの硫黄原子を転移することで、チオシアンを生成し、無毒化することは知られている (Cheng et al., 2008)。注目すべきことに、この反応の副産物としては亜硫酸イオンが生成する。また、ロダナーゼにチャージされた硫黄原子がシアンに対して転移するのではなく、硫化物イオンとして遊離するのであれば、ロダナーゼはチオ硫酸イオンから亜硫酸イオンおよび硫化物イオンを生成させることができると言える。

一方で、 $\Delta$ cysM 株はチオ硫酸単一硫黄源下での生育が強く制限されていることから、大腸菌においてロダナーゼを介した経路の活性はそれほど高くないと考えられる。また、 $\Delta$ cysM 株においてロダナーゼを過剰発現させると、程度の差はあるものの複数のロダナーゼがチオ硫酸単一硫黄源下での生育能を回復させることから、ロダナーゼを介した経路には重複性があると考えられる。

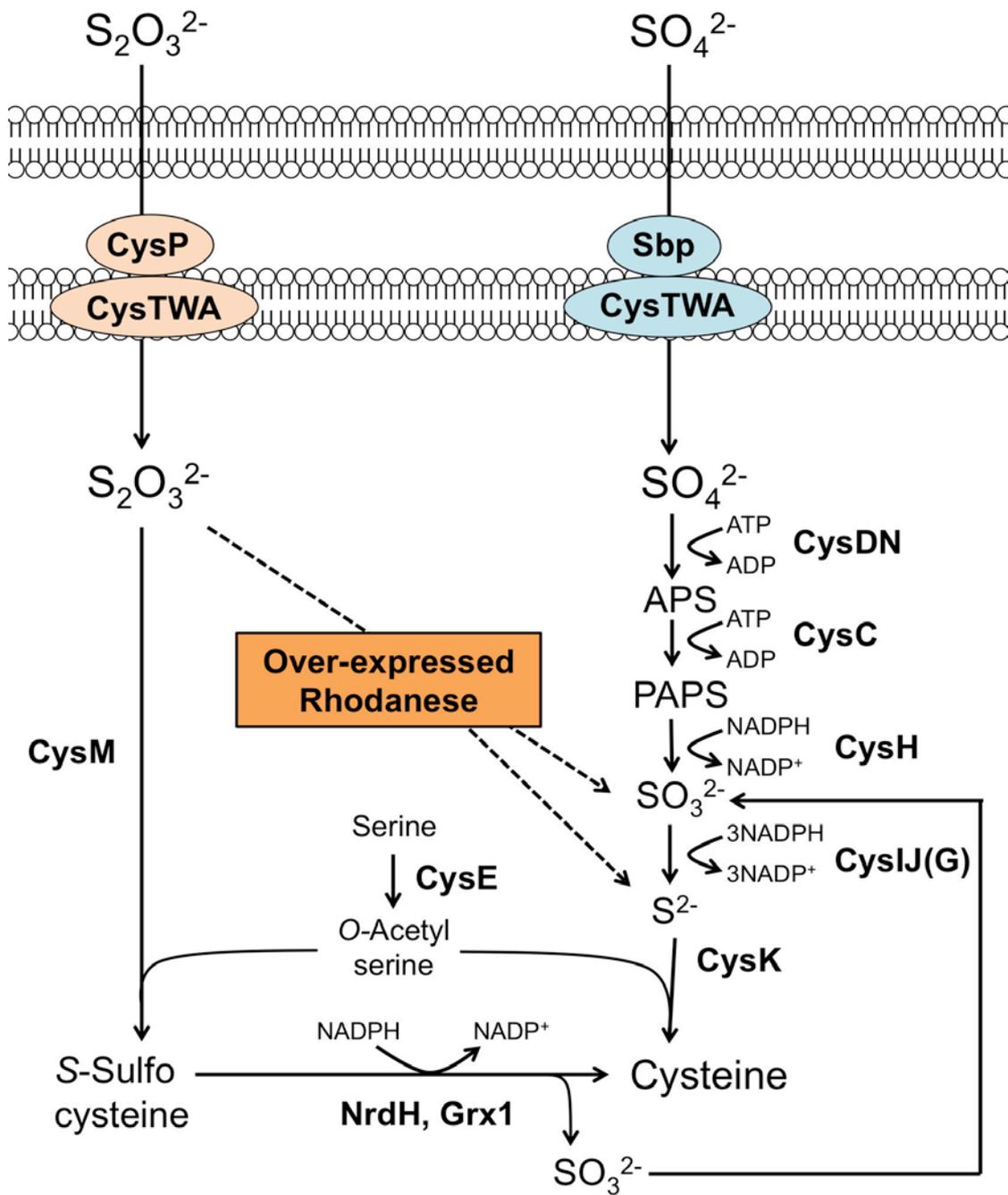


図 2. 大腸菌における硫黄同化経路

大腸菌における無機硫黄化合物の取り込みと代謝、およびそれらに関与する酵素を示す。

$S_2O_3^{2-}$ : チオ硫酸イオン,  $SO_4^{2-}$ : 硫酸イオン, APS: アデニル硫酸, PAPS: ホスホアデニル硫酸,  $SO_3^{2-}$ : 亜硫酸イオン,  $S^{2-}$ : 硫化物イオン。タンパク質名を太字で示す。

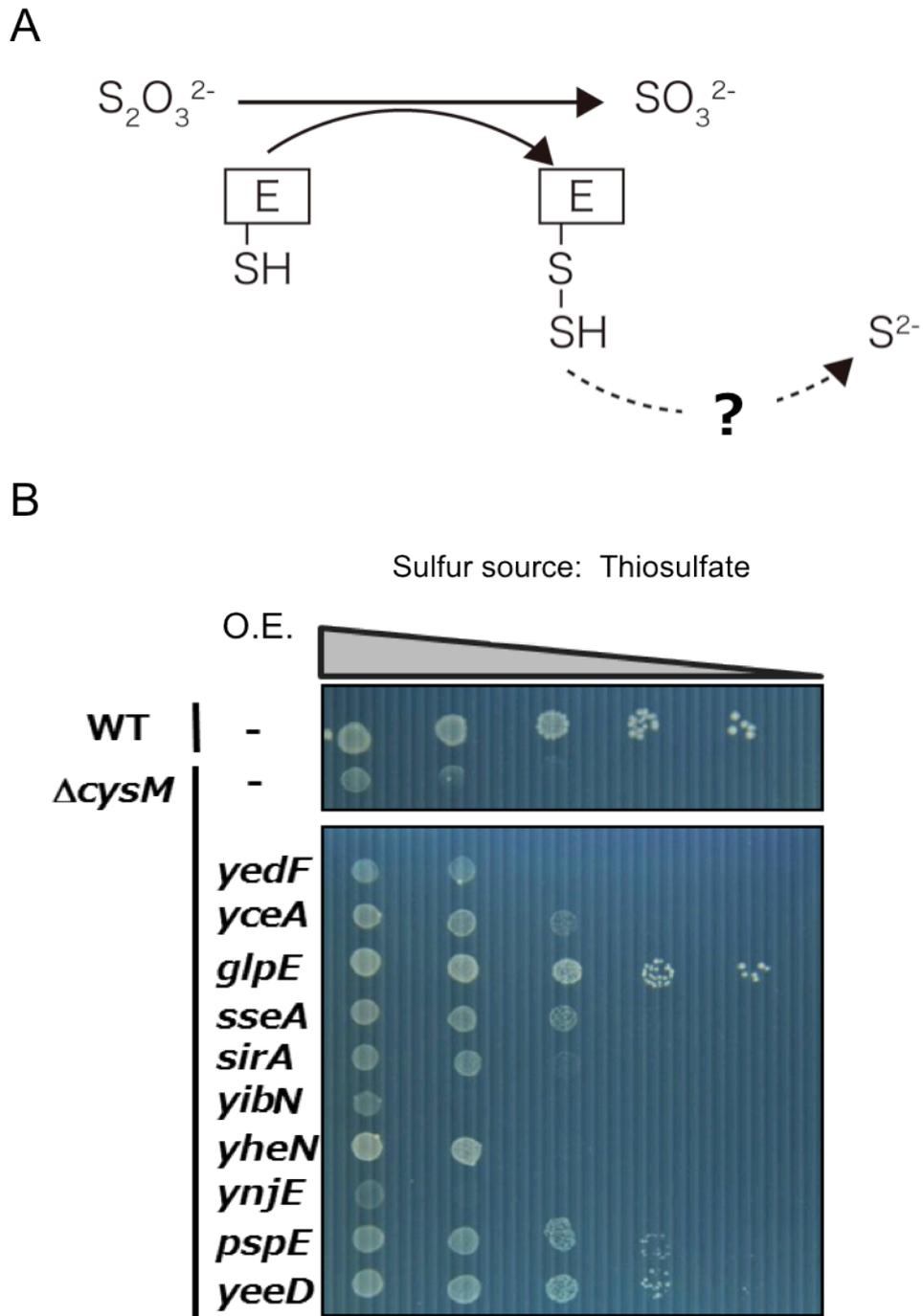


図3. 大腸菌におけるロダネーゼを介したチオ硫酸同化経路

A: チオ硫酸イオン同化経路において想定されるロダネーゼの反応。B: 野生型株 (WT: BW25113) ,および $\Delta cysM$ 株に大腸菌ゲノム上のロダネーゼ遺伝子をプラスミドで過剰発現させた株の前培養液を段階希釈し、チオ硫酸イオンを単一の硫黄源としたM9最少培地にスポットし、37°Cで培養を行った。O.E.は過剰発現を示す (平成26年度 城山真恵加 修士論文より改変)。

## 酵母における硫黄同化経路

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*（以下、酵母）は生物学における高等真核生物の優れたモデルであり、真核生物として最初にゲノム配列が解読されたことをはじめ（Goffeau et al., 1996）、細胞周期、細胞内輸送、オートファジーといった基礎生物学上、極めて重要な現象の発見に多大な貢献を果たしている。

加えて、酵母の特徴である発酵を人類が有効利用した歴史は古く、紀元前3000年頃にはメソポタミア文明において酵母を用いたビールの醸造が行われていたという記録が残っている。これは現代においてさらなる進歩を遂げており、発酵の歴史とともに、選抜、育種されてきた酵母は製パン、酒類醸造、バイオエタノール生産など、8兆円規模の市場を持つ発酵化学産業に欠かせない重要な微生物である。

上記で述べたように、酵母は基礎・応用の両面から非常に重要な役割を果たしている微生物であり、酵母の代謝経路についての知見を深めることは生物学的観点のみならず産業利用の観点からも重要な意味がある。

酵母においても硫黄同化経路は古く研究されており、1970年代にはメチオニン要求性の変異株が取得され、その遺伝学的解析から硫酸イオンの同化経路が明らかにされてきた（Masselot and De Robichon-Szulmajster, 1975 ; Thomas and Surdin-Kerjan, 1997）。酵母における硫酸イオンの同化経路は大腸菌のそれとよく似ている（図4）。硫酸イオンは、トランスポーターであるSul1およびSul2によって細胞内に取り込まれ（Cherest et al., 1997）、ATPスルフリラーゼ（Met3）によって、APSへと変換される。その後、APSキナーゼ（Met14）によってPAPSへと変換される。PAPSはPAPSレダクターゼ（Met16）によって、還元され、亜硫酸イオンとなり、亜硫酸イオンはMet5およびMet10の複合体からなる亜硫酸レダクターゼによって硫化物イオンへと変換される。この硫化物イオンはホモシステインシンターゼ（Met17）によってO-アセチルホモセリンと結合し、有機性硫黄化合物であるホモシステインが合成される。

ホモシステインは酵母における初発の有機性硫黄化合物であり、これをもとにメチオニン、システイン、グルタチオンといった生体機能に必須な有機性硫黄化合物が合成される（Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012）。その詳細を以下に示す。

メチオニンはホモシステインにメチルトランスフェラーゼ（Met6）がメチル基を転移させることで生合成される。システインの合成経路では、まずシスタ

チオニンβシンターゼ (Cys4) がホモシステインとセリンを基質にシスタチオニンが合成される。その後、シスタチオニンγリアーゼ (Cys3) がシスタチオニンを分解することでα-酪酸とともにシステインが生成する。

グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチドであり、細胞内の主要な抗酸化物質として機能することで、細胞を酸化ストレスから保護する。グルタチオンはシステインを出発物質にγ-グルタミルシステインシンターゼ (Gsh1) によって、グルタミン酸が付加することで、γ-グルタミルシステインへと変換され、その後、グルタチオンシンターゼ (Gsh2) によって、さらにグリシンが付加されることで合成される。

これらの代謝経路は転写因子であるMet4によって正に制御されている。Met4はロイジンジッパー型の転写因子であるが、DNA結合部位を欠いており、DNA結合補因子であるCbf1, Met31もしくはMet32と複合体を形成することで転写活性を持つ。さらに、Met4は細胞内のシステイン量によっても制御されており (Grabowska and Chelstowska, 2003)、十分量のシステインが細胞内に存在するとユビキチンリガーゼ複合体であるSCF<sup>Met30</sup>によりポリユビキチン化され、プロテアソームで分解される (Menant et al., 2006)。このメカニズムによって過剰な有機性硫黄化合物の合成を回避している。

以上のように、酵母において硫酸イオンの同化経路、およびその下流の有機性硫黄化合物の生合成経路については理解が進んでいる。一方で、大腸菌におけるCysM様のチオ硫酸イオンを基質とする (ホモ) システインシンターゼに関する報告はなく、酵母におけるチオ硫酸イオンの同化経路は不明な点が多い。

そこで本研究では、酵母のチオ硫酸同化経路の全容とその生理的役割を明らかにすることを目的とした。

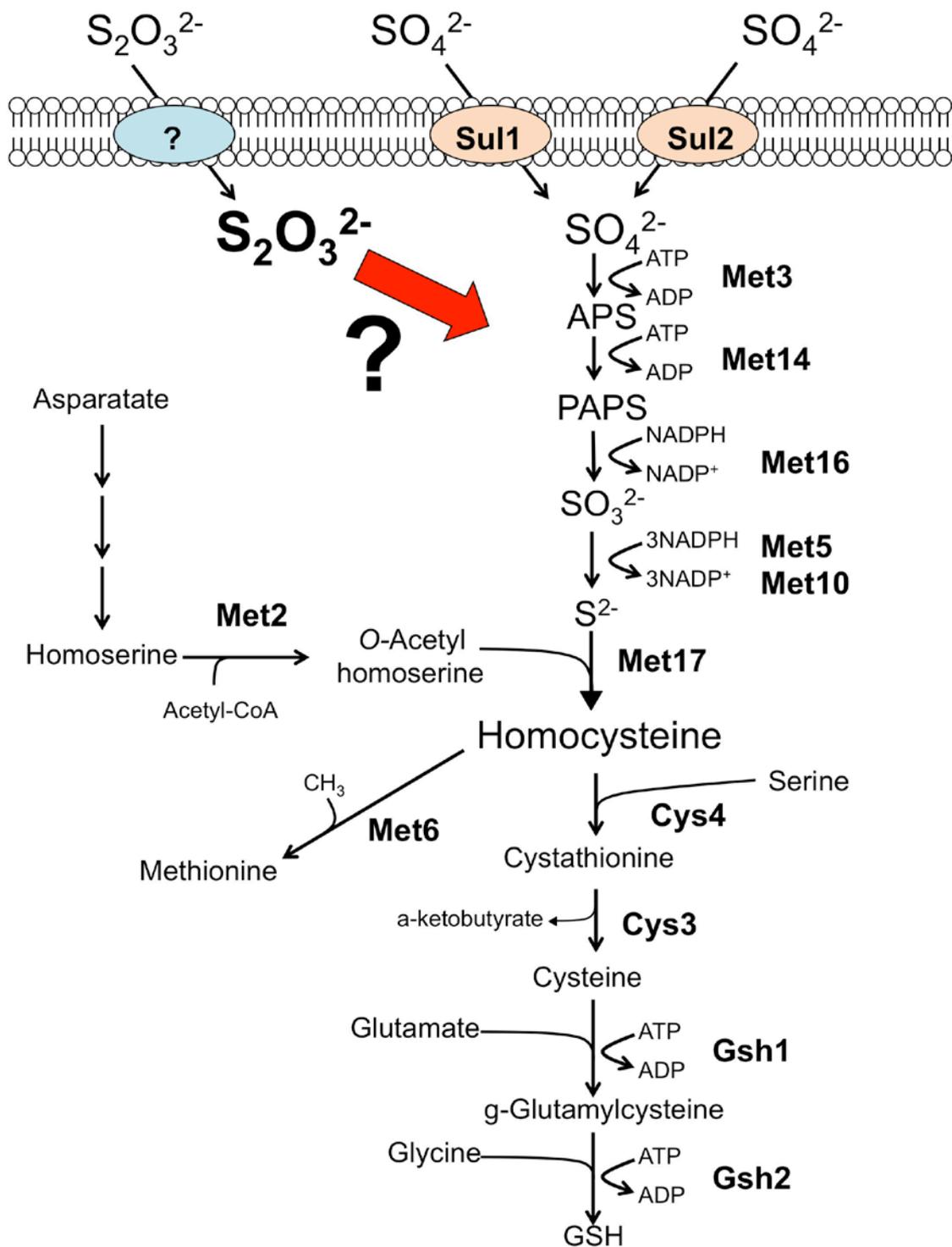


図4. 酵母における硫黄同化経路

酵母における無機硫黄化合物の取り込みと代謝、およびそれらに関与する酵素を示す。 $S_2O_3^{2-}$ : チオ硫酸イオン,  $SO_4^{2-}$ : 硫酸イオン, APS: アデニル硫酸, PAPS: ホスホアデニル硫酸,  $SO_3^{2-}$ : 亜硫酸イオン,  $S^{2-}$ : 硫化物イオン。タンパク質名を太字で示す。

# 第1章

## 酵母におけるチオ硫酸イオン同化経路の探索

### 1-1. 緒言

生物は効率的に代謝（同化・異化）することが可能な栄養源、すなわち好ましい栄養源を優先的に利用し、環境中でより優位に増殖する。これは生物の持つ巧みな生存戦略である。

硫黄は炭素、窒素と同様に細胞を構成する成分であり、生命活動に必須である。多くの微生物は無機性の硫黄化合物から有機性の硫黄化合物を合成する硫黄同化能を有していることから、無機性の硫黄化合物を硫黄源として利用でき、その利用のしやすさは細胞の増殖に影響を与える。

当研究室ではこれまでに硫酸イオンよりもチオ硫酸イオンが微生物にとって好ましい硫黄源であることを明らかにしてきた。

酵母がチオ硫酸イオンを硫黄源として利用できることは知られていたが（Thomas and Surdin-Kerjan, 1997）、チオ硫酸イオンが酵母にとって好ましい硫黄源であるかどうかは明らかになっていない。

また酵母には大腸菌やサルモネラ菌のように、チオ硫酸イオンを基質とするシステインシンターゼを持たないと言われることからチオ硫酸イオンの同化経路の詳細も不明である。

以上の背景をもとに本章では、チオ硫酸イオンが酵母にとって好ましい硫黄源であるかどうか、またどのような経路で同化されるのかを解明することを目的とした。

## 1-2. 材料と方法

### 1-2-1. 使用菌株

#### 1-2-1-1. 酵母

研究室のストックから、BY4741+を野生型株として用いた。BY4741+は実験室酵母の一倍体であるBY4741とその親株であるS288Cを掛け合わせて得られた原栄養株 (prototroph) である。

各遺伝子の破壊株は、BY4741+を親株にPCR断片および酢酸リチウムを用いた形質転換法 (Gietz and Schiestl, 2007) によって対象の遺伝子座を薬剤耐性遺伝子で置換することで、作製した。この際の鋳型DNAはYeast Knock Out Strain Collection (Thermo Fisher Scientificより購入。以下、破壊株コレクション) の菌株に由来するゲノムDNA、または後述のプラスミドを用いた。選択はG418またはhygomycin Bを含んだYPD培地 (組成は後述) で行い、PCRによって遺伝子の破壊を確認した。

破壊株コレクションの菌株はBY4741を親株とし、薬剤耐性遺伝子の*KanMX4*によって対象の遺伝子座を破壊してある。これらを用いた実験では $\Delta his3$ 株をコントロールとして用いた。また、この際には後述のpRS415-*cgHis3-MET17*およびpRS416を導入することで、栄養要求性を相補した。

#### 1-2-1-2. 大腸菌

Keio collectionから親株であるBW25113株と $\Delta cysM$ 株を用いた。これらの株は本研究科の森浩禎教授より分譲して頂いた (Baba et al., 2006)。クローニングにはDH5 $\alpha$ 株を使用した。形質転換は通常のヒートショック法によって行った。

### 1-2-2. プラスミド

pRS415 (Stratagene) はYCp型のプラスミドであり、酵母のセントロメア配列および*LEU2*遺伝子の配列を含む。このことから、*leu2*遺伝子欠損株において低コピー数で安定的に維持される。大腸菌での複製起点と選択マーカーのアンピ

シリリン耐性遺伝子の配列を含んでいる。

pRS416 は pRS415 の *LEU2* 遺伝子の配列の代わりに *URA3* 遺伝子の配列を含んでいる。このことから、*ura3* 遺伝子欠損株において低コピー数で安定的に維持される。

本研究ではそれぞれ自身のプロモーターとターミネーターを含む *CgHIS3* および *MET17* の配列を組み込んだ pRS415-*CgHis3-MET17*, および pRS416 を栄養要求性マーカーの相補に用いた。

pFA6a-*KanMX6* は、G418 耐性遺伝子 *KanMX6* 配列を有するプラスミドであり、遺伝子破壊株を作製する際の鋳型として用いた (Janke et al., 2004)。

また pFA6a *hphNT1* は、ハイグロマイシン B 耐性遺伝子 *hphNT1* 配列を持つプラスミドであり、遺伝子破壊株を作製する際の鋳型として用いた (Janke et al., 2004)。

pCold I (Takara) は大腸菌のコールドショックプロテイン遺伝子 *cspA* のプロモーター配列と *lac operator* を利用した低温誘導型のプラスミドであり、大腸菌での複製起点と選択マーカーのアンピシリン耐性遺伝子を含んでいる。イソプロピルチオガラクトシド (IPTG) を加えた培養液を冷却することで、効率よく目的タンパク質の発現を誘導できる。本プラスミドは後述する大腸菌  $\Delta$ *cysM* 株の機能相補実験に用いた。

本章で使用した菌株、プラスミドおよびプライマーのリストを表 1、表 2 および表 3 にそれぞれ示す。

表 1. 本章で使用了した菌株のリスト

Yeast		
Name	Genotype	Source
BY4741+	<i>MATa</i>	Lab stock
KYO6	BY4741+ <i>rdl1::kanMX6</i>	This study
KYO16	BY4741+ <i>rdl2::kanMX6</i>	This study
KYO22	BY4741+ <i>tum1::kanMX6</i>	This study
KYO30	BY4741+ <i>uba4::kanMX</i>	This study
KYO93	BY4741+ <i>ych1::kanMX6</i>	This study
KYO41	BY4741+ <i>met16::KanMX4</i>	This study
KYO44	BY4741+ <i>ygr012w::KanMX4</i>	This study
KYO33	BY4741+ <i>met10::kanMX6</i>	This study
KYO35	BY4741+ <i>met17::kanMX6</i>	This study
KYO38	BY4741+ <i>met5::KanMX4</i>	This study
KYO41	BY4741+ <i>met16::KanMX4</i>	This study
KYO109	BY4741+ <i>rdl1/2::hphNT1</i>	This study
KYO37	BY4741+ <i>rdl1::kanMX6 ych1::hphNT1</i>	This study
KYO53	BY4741+ <i>rdl1::kanMX6 tum1::hphNT1</i>	This study
KYO55	BY4741+ <i>rdl1::kanMX6 uba4::hphNT1</i>	This study
$\Delta his3$	BY4741( <i>MATa his3</i> $\Delta$ 1 <i>met17</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0) <i><math>\Delta his3::KanMX4</math></i>	Euroscarf
$\Delta trx1$	BY4741 <i>trx1::KanMX4</i>	Euroscarf
$\Delta trx2$	BY4741 <i>trx2::KanMX4</i>	Euroscarf
$\Delta trx3$	BY4741 <i>trx3::KanMX4</i>	Euroscarf
$\Delta grx1$	BY4741 <i>grx1::KanMX4</i>	Euroscarf
$\Delta grx2$	BY4741 <i>grx2::KanMX4</i>	Euroscarf
$\Delta grx3$	BY4741 <i>grx3::KanMX4</i>	Euroscarf
$\Delta grx4$	BY4741 <i>grx4::KanMX4</i>	Euroscarf
$\Delta grx5$	BY4741 <i>grx5::KanMX4</i>	Euroscarf
$\Delta grx6$	BY4741 <i>grx6::KanMX4</i>	Euroscarf
$\Delta grx7$	BY4741 <i>grx7::KanMX4</i>	Euroscarf
$\Delta grx8$	BY4741 <i>grx8::KanMX4</i>	Euroscarf
<i>E. coli</i>		
Name		Source
BW25113	F <sup>-</sup> , DE( <i>araD-araB</i> )567, <i>lacZ4787(del)::rrnB-3</i> , LAM <sup>-</sup> , <i>rph-1</i> , DE( <i>rhaD-rhaB</i> )568, <i>hsdR514</i>	KO collection
$\Delta cysM$	BW25113 <i><math>\Delta cysM::Km^r</math></i>	KO collection
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\Phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda$ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Lab stock

※*RDL1* および *RDL2* 遺伝子はゲノム上で同方向に並んでおり、同時に *hphNT1* に置換することで両遺伝子を破壊した。

表 2. 本章で使用したプライマーのリスト

Name	Sequence (5'-3')
d-met16-kanMX6-f	CTAAGGCCAGCAAAGGTATCAACCCATAGCAACTCATAAAActgcaggtcgacggatcc
d-met16-kanMX6-r	TTAGTCACATACATATGGTTATATATCGTACTCTATCTATatagggcactagtgatctg
d-met5-kanMX6-f	AGTAGGGAACGGGAACCAGAGAAAAACAAAAGATTGGCGActgcaggtcgacggatcc
d-met5-kanMX6-r	GAAAACCCAATAGTATGTCCTACTATGTCATATGCTATCAatagggcactagtgatctg
d-met10-kanMX6-f	TCAACTGCTTTTCTCGAGGTCACCCAAATATACAACGAGctgcaggtcgacggatcc
d-met10-kanMX6-r	GTTCAATAAATAGATATTTAGTTTTTATTACTATATTAATatagggcactagtgatctg
d-met17-kanMX6-f	TCAGATACATAGATACAATTCTATTACCCCATCCATACActgcaggtcgacggatcc
d-met17-kanMX6-r	AAGTAGGTTTATACATAATTTTACAACCTATTACGCACACatagggcactagtgatctg
d-rdl1-kanMX6-f	CGTTTATTTTCAGGGTTGTGACTAAGAAACGATATTAActgcaggtcgacggatcc
d-rdl1-kanMX6-r	TTACGAAAATACACAGGGTACATACCTAGAGTATACAAGGatagggcactagtgatctg
d-rdl2-kanMX6-f	TCTCAACAAATGGAAGCGAGACAGAAGAAAAAGACCAACGctgcaggtcgacggatcc
d-rdl2-kanMX6-r	TATATACAGGATATATCGATTATACTTGTTCCTTTTGGCatagggcactagtgatctg
d-Tum1-kanMX6-f	CAAAAGCATAAAGTTGTGAAGAAAATTGCCATACATTCActgcaggtcgacggatcc
d-tum1-kanMX6-r	TAGCTAAATAAATCGACTTGTCAAGAATATATTTCTCTTAatagggcactagtgatctg
d-uba4-kanMX6-f	GCCGTTGACTGCAAAAAGGAAGTAAATAGAAGTCAATAACActgcaggtcgacggatcc
d-uba4-kanMX6-r	AAATAAAGTTACATATACACGTTTATACATGTATAGGTCAAatagggcactagtgatctg
d-ych1-kanMX6-f	GCCAGATAGAAGCAAAAAGAGAAGTCAATTGCAAAAAAAATctgcaggtcgacggatcc
d-ych1-kanMX6-r	TCATGGCAAATATATGATCACGTGCGATTGTGTAAACCTGatagggcactagtgatctg
d-rdl1/2-hph-f	ATCAATCAAAGAATTCTTTCTCGTTTATTTTCAGGGTTGTGACTAAGAAACGAT ATTAAAcgtacgctgcaggtcgac
d-rdl1/2-hph-r	TGAAATACACAAAAGGTTGTCTATATACAGGATATATCGATTATACTTGTTCCTT TTGGCacgatgaattcgagctcg
d-rdl1-check-f	TGGAGAATATATTACCCGCGGGGA
d-rdl1-check-r	CTTCCTAATTTCTTTGCGCCGCCGCT
d-rdl2-check-f	GCGGCGGCGCAAAGAAATTAGGAAG
d-rdl2-check-r	AAGAGGTTATCCGCGAACCAAGG
d-tum1-check-f	CTTCTTAGAAAGTACCTTTAAAGAGC
d-tum1-check-r	TTGCCAGCAGTCTTATTTTTGCTG
d-uba4-check-f	AATATACCATGTTTGTATATAGAG
d-uba4-check-r	CAAGTGTGTCGAAAACATTCCTGTT
d-ych1-check-f	TGCACATTCGCTTATGGGT
d-ych1-check-r	TGATTTCAATAGCAATATTGCTTCT
d-ygr012w-check-f	ACGTCTATAGTAACTTAAAAGTCTT
d-ygr012w-check-r	GCACTTTTTAGCGGCATCATTACC
d-met10-check-f	AATGCCTACAGGGCTTATGAA
d-met10-check-r	ACGCAGGGTTTAGAGGTTAAA
d-met16-check-f	GCCAGTTCTTGCTGCAATTGT
d-met16-check-r	GCAAATTACCTTCAGAGCGTT
d-met5-check-f	TGACAAAGACGTATCAAACCAA
d-met5-check-r	GTCATGTTCACTTTTGTACGCTG
Nde1-RDL1-f	ggagatatacatATGTGGAAGGCCGTGATGAATGCTTGAATG
RDL1_Hind3-r	cccaagcttCTATAAGTCAAGTTTATCACCCCATGAGAAAACCAATC
Nde1-RDL2-f	ggagatatacatATGTTCAAGCATAGTACAGGTATTCTCTCGAGGACAGTTTCTG
RDL2-Hind3-r	gggaagcTTATTTTTTGGGCTTAACGTCAGCACCACCTTTAGC
Nde1-YCH1-f	ggagatatacatATGGACTCGTACTCAATAACAAAC
YCH1-Hind3-r	cccaagcttTCAACGCCACAGATCGGGTA
XhoI-TUM1-f	gggctcgagATGCCATTATTTGATCTTATTTCTCC
EcoRI-TUM1-r	ggggaattcTTAATCTCTGTTTTTCAGCAATCCAC
pCold-F	ACGCCATATCGCCGAAAGG
pCold-R	GGCAGGGATCTTAGATTCTG

表 3. 本章で使用したプラスミドのリスト

For yeast		
Name	Description	Source
pRS415-cgHIS3-MET17	<i>CEN/ARS, LEU2, CgHIS3, MET17</i>	Lab stock
pRS416	<i>CEN/ARS, URA3</i>	Lab stock
For <i>E.coli</i>		
Name	Description	Source
pColdI	Cold-shock expression vector, <i>Amp</i>	Takara
pColdI- <i>RDL1</i>	pColdI carrying <i>RDL1</i> from yeast	This study
pColdI- <i>RDL2</i>	pColdI carrying <i>RDL2</i> from yeast	This study
pColdI- <i>TUM1</i>	pColdI carrying <i>TUM1</i> from yeast	This study
pColdI- <i>UBA4</i>	pColdI carrying <i>UBA4</i> from yeast	This study
pColdI- <i>YCH1</i>	pColdI carrying <i>YCH1</i> from yeast	This study
For PCR template		
Name	Description	Source
pFA6a- <i>KanMX6</i>	<i>kanMX6</i> cassette	Euroscarf
pFA6a- <i>hphNT1</i>	<i>hphNT1</i> cassette	Euroscarf

### 1-2-3. 培地組成および生育条件

本研究では、単一硫黄源による培養を実施する目的で、最少培地には酵母用 (SD 培地)、大腸菌用 (M9 培地) とともに硫黄源を含まない組成に改変したものをを用いた。培養に使用する際には硫酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、チオ硫酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )、メチオニン、シスチンを単一の硫黄源として加えた。

以下、硫酸ナトリウムを単一の硫黄源とした培地を「硫酸塩培地」、「チオ硫酸ナトリウムを単一の硫黄源とした培地を「チオ硫酸塩培地」と表記する。硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウムおよびチオ硫酸ナトリウムの濃度は終濃度 1 mM とした。

#### 1-2-3-1. 酵母

富栄養培地として YPD 培地を、最少培地として SD 培地をそれぞれ用いた。組成を以下に示す。

**表 4. YPD 培地組成 (1L 中)**

Yeast extract	10 g
Bacto peptone	20 g
Glucose	20 g

**表 5. SD 培地組成 (1L 中)**

Ammonium chloride	10 g
Potassium dihydrogen phosphate	1.42 g
Magnesium chloride	0.25 g
Sodium chloride	142 mg
Calcium chloride	142 mg
× 1,000 Vitamines	1 ml
× 1,000 Minerals	1 ml

使用時には終濃度 2% となるようにグルコース溶液を添加した。

**表 6. ×1,000 Vitamins 組成(1L 中)**

Niacin	567 mg
Pyridoxine	567mg
Thiamine-HCl	567mg
Folic acid	2.8mg
Biotin	2.8mg
<i>p</i> -Amino benzoic acid	283mg
Calcium pantothenate	567mg

**表 7. ×1,000 Minerals 組成(1L 中)**

Boric acid	708 mg
Manganese chloride	567 mg
Zinc chloride	567 mg
Copper chloride	57 mg
Ferric chloride	283 mg
Sodium molybdate	283 mg
Potassium iodide	142 mg

固体培地を調製する際は YPD 培地では 2%寒天、SD 培地では 1%精製寒天（ナカライテスク）を添加した。また、必要に応じて抗生物質の G418（終濃度 200 $\mu$ g/L）、hygromycin B（終濃度 200 $\mu$ g/L）を添加した。

酵母の培養は 30 $^{\circ}$ Cで行い、生育は 600 nm または 660 nm の吸光度 (OD<sub>600</sub>, OD<sub>660</sub>) により測定した。

### 1-2-3-2. 大腸菌

富栄養培地として LB 培地を、最少培地として M9 培地をそれぞれ用いた。組成を以下に示す。

**表 8. LB 培地組成(1L 中)**

Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g

**表 9. M9 培地組成(1L 中)**

Sodium hydrogen phosphate	6 g
Potassium dihydrogen phosphate	3 g
Sodium chloride	0.5 g
Ammonium chloride	1 g
Glucose	0.4% (w/v)
Thiamine-HCl	0.00005% (w/v)

M9 培地の使用時には塩化マグネシウム溶液（終濃度 1mM）を添加した。また、必要な際には、プラスミドを維持する目的でアンピシリン（終濃度 100 $\mu$ g/L）を、*lac* プロモーター制御下の遺伝子を誘導する目的で IPTG（終濃度 0.1 mM）を添加した。固形培地を作製する際は 1.5% 精製寒天（ナカライテスク）を添加した。

大腸菌の培養は特に表記がない場合 37°Cで行い、生育は 660 nm の吸光度 (OD<sub>660</sub>) により測定した。

### 1-2-4. サルファーインデックス解析

細胞内の硫黄代謝産物群を定量するためにモノブロモビマン (mBBR) 処理による硫黄代謝産物の修飾と LC-MS/MS によるそれらの修飾誘導体の定量を組み合わせた「サルファーインデックス解析」を行った (Kawano et al., 2015)。なお、mBBR 修飾ではチオール基が誘導体化される。例えば、硫化物イオンの場合には、

図 5 のような反応様式で誘導体化される。誘導体化された硫黄代謝産物は、疎水性カラムによる液体クロマトグラフィー (LC) で分離を行いながら、オンライン接続された質量分析器 (MS/MS) の MRM 解析 (特定の標的分子固有の質量と、さらなるガス衝突誘起開裂後の分子断片の部分質量の組み合わせを設定し、選択的に標的分子を定量する方法) により定量化される。

各酵母菌株は硫酸イオンまたはチオ硫酸イオンを単一の硫黄源とした SD 培地に  $OD_{600} = 0.05$  で植菌し、対数増殖期 ( $OD_{600} = 0.4$ ) まで培養を行った。次いで、 $OD_{600} = 2$  量の細胞についてフィルターろ過による洗浄と集菌を行なった。フィルターをマイクロチューブに回収後、予め作製しておいた mBBBr 溶液 (100 mM mBBBr : 20  $\mu$ M カンファースルホン酸 (CSA、MS 定量時の内部標準) 水溶液 : メタノール = 1 : 1 : 1000 [v/v]) を、1ml 添加し、室温で 10 分間、攪拌処理を行った。この処理により、標的の硫黄化合物を含む代謝産物の細胞から抽出し、同時に mBBBr による硫黄代謝産物の修飾を行った。フィルターを取り除いた後、これを 4°C、13,000 rpm で 1 分間遠心分離し、上清を 900  $\mu$ l 回収、エバポレーター (Eppendorf) を用いて減圧下にて乾固を行った。乾固後は 100  $\mu$ l の純水に再懸濁し、濃縮を行った。これを 4°C、13,000 rpm で 1 分間遠心分離し、上清 80  $\mu$ l を回収し、mBBBr 誘導体化サンプルとして以下の LC-MS/MS 解析に供した。

LC-MS/MS 解析のためには、トリプル四重極型質量分析計 LCMS-8030 (島津製作所) を用いた。サンプルは 10  $\mu$ l をアプライし、LC の逆相カラムには Acquity CSH C18 HPLC column (1.7  $\mu$ m, 2.1  $\times$  150 mm; Waters) を用いた。LC の移動相には、(A) 0.1% ギ酸水溶液と (B) 0.1% ギ酸 アセトニトリルを用いた。その他の LC-MS/MS 設定条件も既報の方法に従った。それぞれの硫黄代謝産物の定量値は、内部標準である CSA に対するマスクロマトグラフィーのピーク面積比として算出した (相対値)。

#### 1-2-5. 硫黄転移酵素遺伝子の探索

出芽酵母ゲノムデータベース SGD (Saccharomyces Genome Database : <http://www.yeastgenome.org/>) における検索により、チオ硫酸硫黄転移酵素をコードする遺伝子を検索した。

#### 1-2-6. その他

大腸菌からのプラスミド調製は、アルカリ SDS 法で行った。その他、大腸菌

の形質転換、DNAの制限酵素による切断、連結などの遺伝子操作は「バイオマニュアルシリーズ1 遺伝子工学の基礎技術」(羊土社)および「バイオ実験 イラストレイテッド」(秀潤社)に、酵母の取り扱いや遺伝子操作は「バイオ マニュアルシリーズ10 酵母による遺伝子実験法」(羊土社) および「生物化学 実験法 39 酵母分子遺伝子実験法」(学会出版センター)に従った。

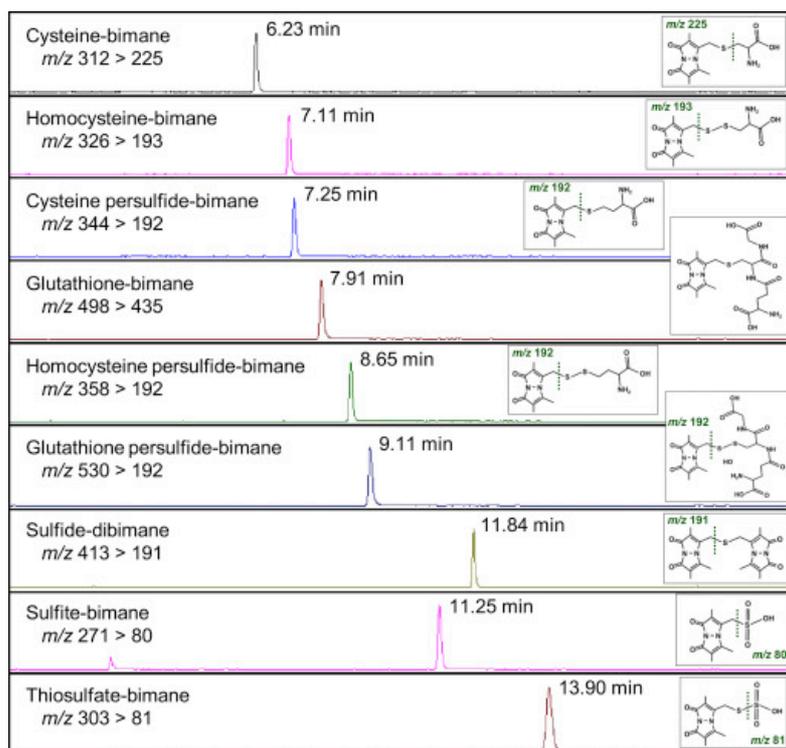


図 5. サルファーインデックス解析の測定分子種とその標品における増すクロマトグラフィーのピークプロファイル

本解析で検出可能な硫黄分子種標品の mBBBr 誘導体化後の構造式と、LC-MS/MS 解析した場合に得られるマスクロマトグラフィーによる溶出ピークプロファイル。構造式中の点線は、MS/MS 時における開裂部位であり、開裂前後の  $m/z$  を化合物ごとに示す (Kawano et al., 2015)。

## 1-3. 結果

### 1-3-1. チオ硫酸イオンは酵母にとって好ましい硫黄源である

はじめに、酵母を硫酸イオンまたはチオ硫酸イオンを単一の硫黄源とする培地（硫酸塩培地およびチオ硫酸塩培地）において液体培養を行い、生育を調べた（図 6）。その結果、チオ硫酸塩培地では硫酸塩培地に比べて生育の亢進が見られた（Funahashi et al., 2015）。

次に細胞内の硫黄関連の代謝産物を解析するため、サルファーインデックス解析を行った（図 7）。硫酸塩培地またはチオ硫酸塩培地で酵母を対数増殖期まで生育させ、解析を行ったところ、チオ硫酸塩培地で生育させた酵母では、ホモシステイン、システイン、グルタチオンといった有機性硫黄化合物が有意に増加していた。また、無機性硫黄化合物である亜硫酸イオンや硫化物イオンも増加傾向にあった。

これらの結果から、チオ硫酸イオンは、他の微生物と同様に酵母にとっても生育に好ましい硫黄源であることが明らかになった。また、このことから、チオ硫酸イオンは硫酸イオンと同様にホモシステインへと代謝されることが示唆された。加えて、亜硫酸イオンや硫化物イオンが増加傾向であったことから、チオ硫酸イオンはこれらの無機性硫黄化合物に変換され、代謝されている可能性が示された。

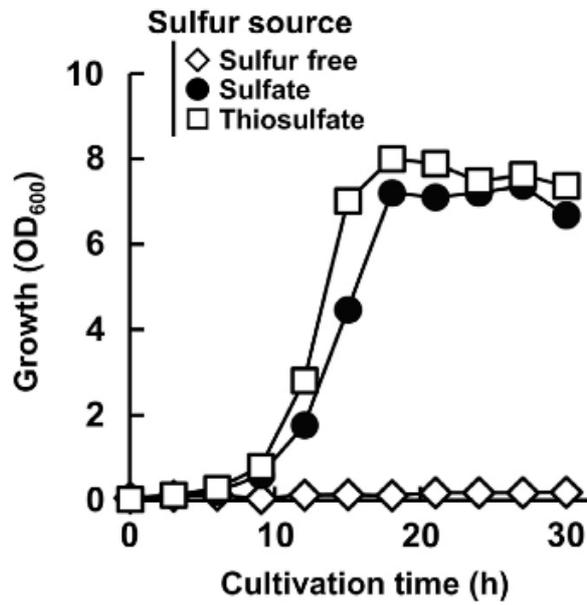


図 6. 硫酸イオンまたはチオ硫酸イオン単一硫黄源下における酵母の生育

野生型株 (BY4741+) を硫酸塩培地で前培養を行った後によく洗浄し、硫酸塩培地またはチオ硫酸塩培地に  $OD_{600} = 0.1$  で植菌し、 $30^{\circ}\text{C}$  で振とう培養を行った。

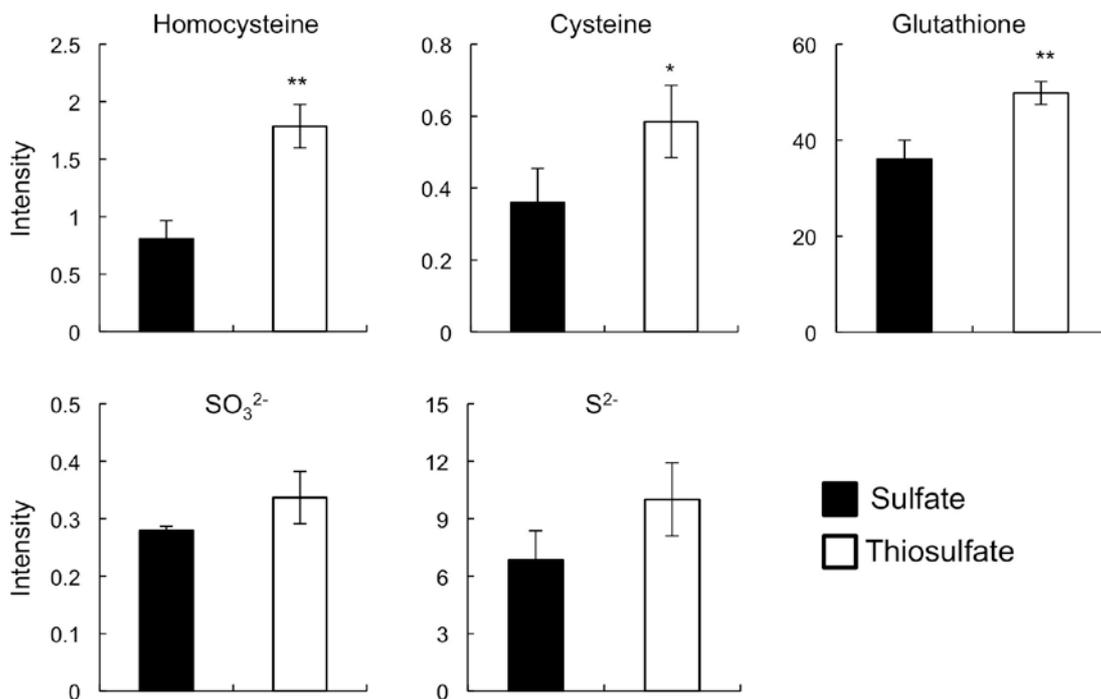


図 7. 硫酸イオンまたはチオ硫酸イオン単一硫黄源下における酵母のサルファーインデックス解析

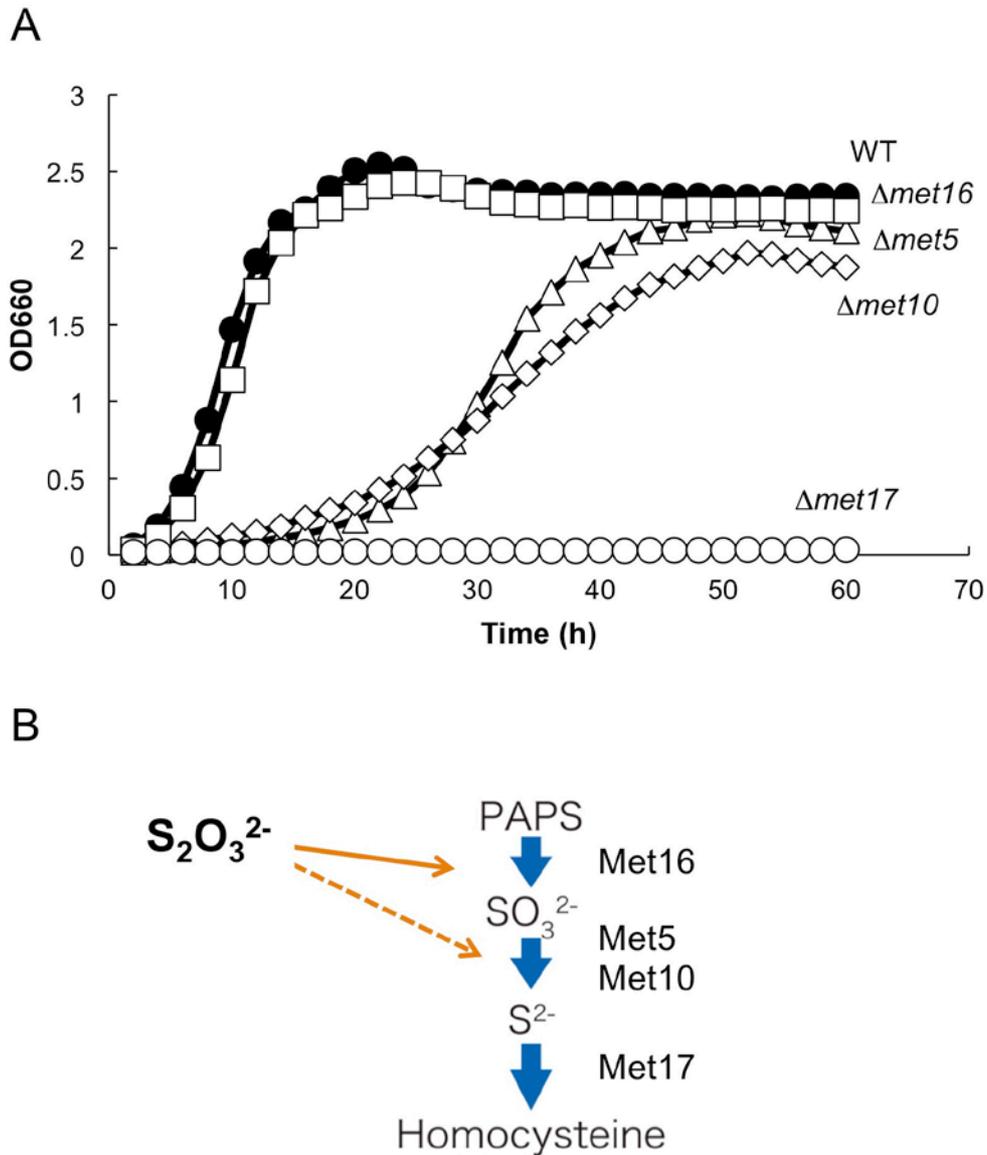
野生型株 (BY4741+) を硫酸塩培地で前培養を行った後によく洗浄し、硫酸塩培地またはチオ硫酸塩培地に  $OD_{600} = 0.05$  で植菌し、対数期まで  $30^{\circ}\text{C}$  で振とう培養を行った。次にフィルター回収した菌体をサルファーインデックス解析に供した。各化合物の定量値は、マスクロマトグラムにおける内部標準 (10-camphorsulfonic acid) に対するピーク比として、相対値 (Intensity) で示している。  $n=3$ , \*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$

### 1-3-2. チオ硫酸イオンは細胞内で亜硫酸イオンおよび硫化物イオンへ変換される

サルファーインデックス解析の結果から、チオ硫酸イオンの同化経路は硫酸イオンの同化経路と一部共通している可能性が考えられた。この可能性を検証するために、硫酸イオン代謝経路の構成因子がチオ硫酸イオン代謝経路に関与するかを検討した。具体的には、各反応を触媒する酵素の遺伝子破壊株をそれぞれ作製し ( $\Delta met16$  株、 $\Delta met5$  株、 $\Delta met10$  株、 $\Delta met17$  株)、チオ硫酸塩培地における生育を調べた (図 8)。

その結果、 $\Delta met16$  株は野生型株と同程度の生育を示し、 $\Delta met5$  株および  $\Delta met10$  株では対数増殖期に入るまでの誘導期が長いものの、最終的には野生型株と同程度の生育を示した。一方で、 $\Delta met17$  株ではほとんど生育が見られなかった。このことは、チオ硫酸イオンは主として亜硫酸イオンに変換され、培養後期には硫化物イオンに変換されていることが示された。以上の結果から、チオ硫酸イオンは亜硫酸イオンおよび硫化物イオンへと変換され、硫酸イオンの同化経路へと合流していることが示された。これは過去の報告とも一致する (Thomas et al., 1992)。

前述したように、大腸菌においてはチオ硫酸イオンを亜硫酸イオンおよび硫化物イオンに変換する酵素 (ロダネーゼ) を介した代謝経路が示唆されている (図 3)。そこで、酵母のチオ硫酸イオン同化経路においても、チオ硫酸イオンから亜硫酸イオンおよび硫化物イオンへの変換はロダネーゼが関与しているとの仮説を立て、検証を行った。



**図 8. チオ硫酸イオン単一硫黄源下における硫黄同化経路遺伝子破壊株の生育**

A: 野生型株 (WT: BY4741+),  $\Delta met16$  株 (KYO41),  $\Delta met5$  株 (KYO38),  $\Delta met10$  株 (KYO33),  $\Delta met17$  株 (KYO35) をメチオニンを単一硫黄源とする SD 培地で前培養を行った後によく洗浄し、チオ硫酸塩培地に  $OD_{600} = 0.05$  で植菌し、 $30^{\circ}\text{C}$  で振とう培養を行った。B: 想定されるチオ硫酸イオン同化経路の模式図。

### 1-3-3. *RDL1* 遺伝子の破壊はチオ硫酸イオン同化能の低下につながる

まず、酵母のゲノムデータベース (Saccharomyces genome database: <http://www.yeastgenome.org/>) からロダネーゼとしてアノテーションされている遺伝子を探索したところ、5種類の候補遺伝子を見出した (表 10)。これらの遺伝子破壊株 ( $\Delta rdl1$  株,  $\Delta rdl2$  株,  $\Delta uba4$  株,  $\Delta tum1$  株,  $\Delta ych1$  株) を作製し、硫酸塩培地およびチオ硫酸塩培地における生育能について調べた。その結果、 $\Delta rdl1$  株および  $\Delta uba4$  株は、野生型株と比べて、チオ硫酸単一硫黄源における生育能の低下を示した (図 9)。特に  $\Delta rdl1$  株では、チオ硫酸塩培地での生育が硫酸塩培地での生育を下回った。また  $\Delta uba4$  株では、チオ硫酸塩培地での生育促進効果が消失し、硫酸塩培地とチオ硫酸培地での生育がほぼ同じであった。

これらの破壊株について、硫黄関連代謝産物での変化を調べるためにサルファーインデックス解析を行った (図 10)。具体的には、硫酸塩培地またはチオ硫酸塩培地でそれぞれの変異株を対数増殖期まで生育させ、解析を行った。その結果、チオ硫酸塩培地で生育させた  $\Delta rdl1$  株では硫酸塩培地と比べて、ホモシステインおよびシステイン量の有意な増加が見られず、グルタチオンについては有意に減少していた。一方、 $\Delta uba4$  株は野生型株と同様にチオ硫酸塩培地においてホモシステインおよびシステインが有意に増加していた。このことから、*RDL1* は酵母のチオ硫酸イオン同化において重要な役割を担っていることが示された。

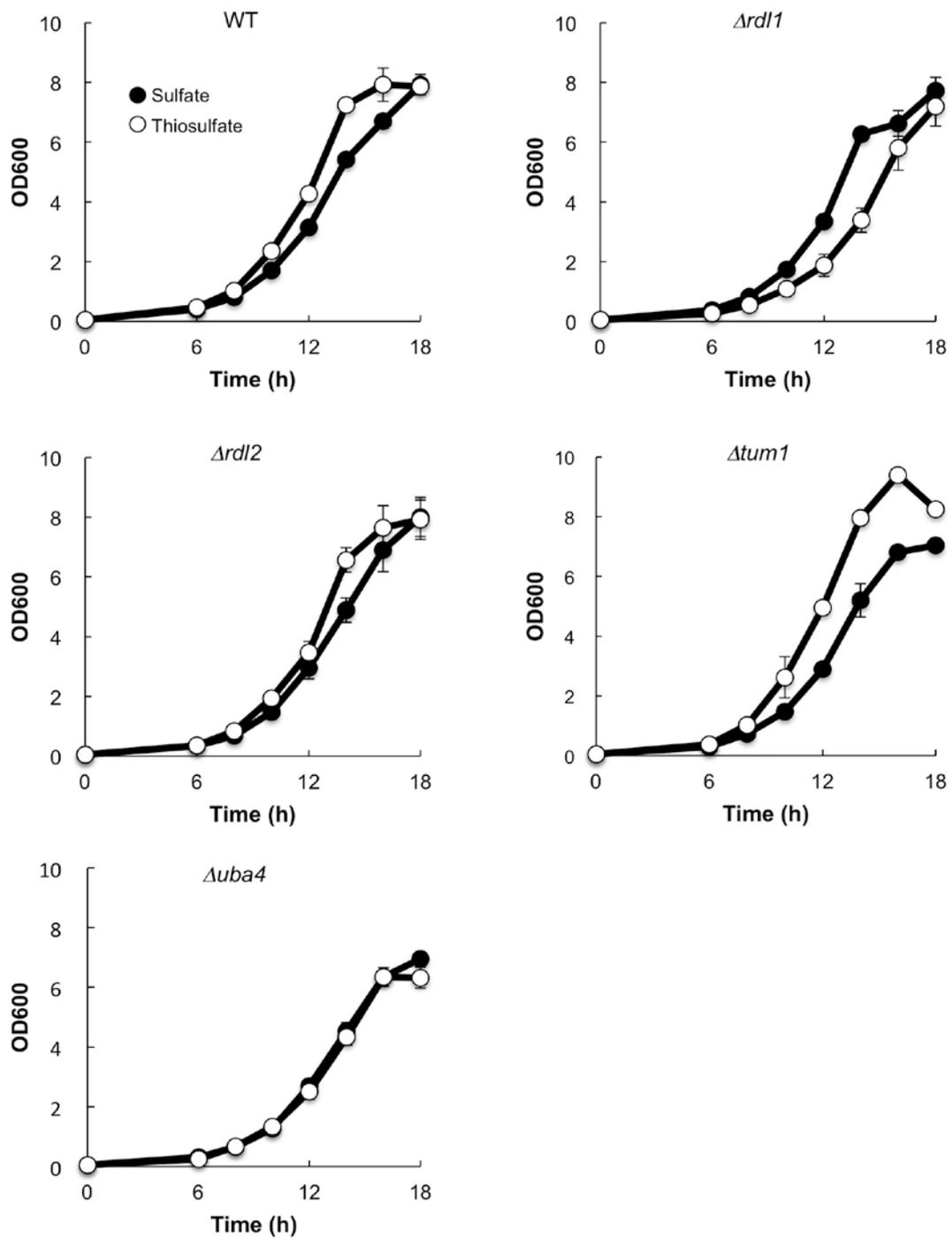
しかしながら、 $\Delta rdl1$  株においてもチオ硫酸塩培地における生育そのものは可能であり、最終到達 OD に関しても野生型株と差がなかった。また、代謝産物に関しても、チオ硫酸塩培地においてグルタチオンの低下は見られるものの、ホモシステインやシステインに関しては硫酸塩培地で培養した野生型株と同程度検出された。

これらのことから、以下の可能性が考えられた。1. ロダネーゼを介した経路以外に別の経路が存在する 2. 他に主要なロダネーゼが存在する。3. 複数のロダネーゼが機能的に重複性を有する。次にこれらについて検討を行うこととした。

表 10. 酵母ゲノムデータベース上のロダネーゼ遺伝子

Systematic name	Gene name	Description	Localization
<i>YOR285W</i>	<i>RDL1</i>	Thiosulfate sulfur transferase	ER, Mitochondrion
<i>YOR286W</i>	<i>RDL2</i>	Thiosulfate sulfur transferase	Mitochondrion
<i>YOR251C</i>	<i>TUM1</i>	tRNA thiolation	Cytoplasm
<i>YHR111W</i>	<i>UBA4</i>	E1-like Protein, tRNA thiolation	Cytoplasm
<i>YGR203W</i>	<i>YCH1</i>	Protein phosphatase	Nucleus, Cytoplasm

A



(次のページに続く)

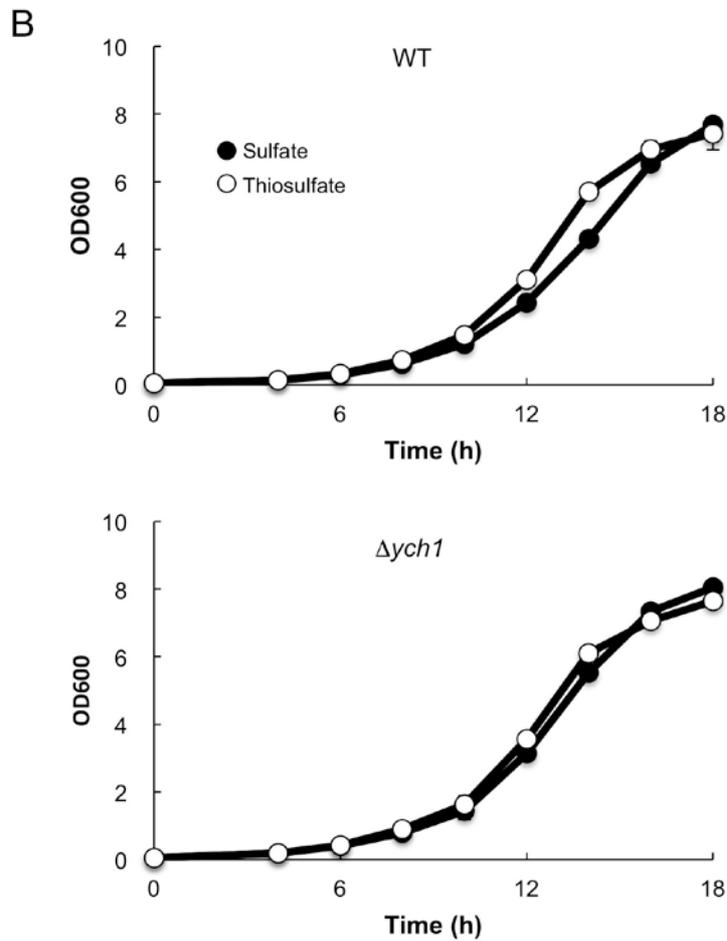


図 9. 硫酸イオンまたはチオ硫酸イオン単一硫黄源下におけるロダネーゼ遺伝子破壊株の生育

A: 野生型株 (WT: BY4741+) ,  $\Delta rdl1$  株 (KYO6) ,  $\Delta rdl2$  株 (KYO16) ,  $\Delta tum1$  株 (KYO22) ,  $\Delta uba4$  株 (KYO30) を硫酸塩培地で前培養を行った後によく洗浄し、硫酸塩培地およびチオ硫酸塩培地に OD = 0.05 で植菌し、30°Cで振とう培養を行った。n=3。B: 野生型株 (WT: BY4741+) ,  $\Delta ych1$  株 (KYO93) を硫酸塩培地で前培養を行った後によく洗浄し、チオ硫酸塩培地に OD = 0.05 で植菌し、30°Cで振とう培養を行った。n=3。

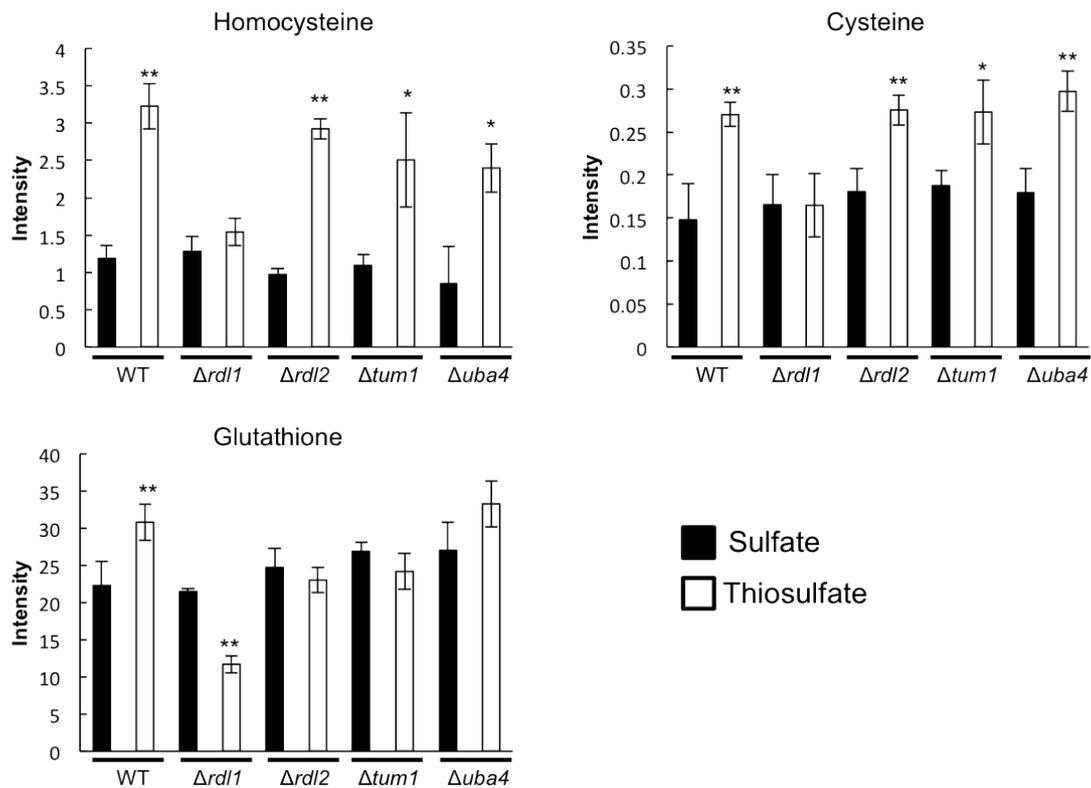


図 10. 硫酸イオンまたはチオ硫酸イオン単一硫黄源下におけるロダネーゼ遺伝子破壊株のサルファーインデックス解析

野生型株 (WT: BY4741+),  $\Delta rd11$  株 (KYO6),  $\Delta rd12$  株 (KYO16),  $\Delta tum1$  株 (KYO22),  $\Delta uba4$  株 (KYO30) を硫酸塩培地で前培養を行った後によく洗浄し、硫酸塩培地およびチオ硫酸塩培地に  $OD_{600} = 0.05$  で植菌し、対数増殖期まで  $30^{\circ}\text{C}$  で振とう培養を行った。次にフィルター回収した菌体をサルファーインデックス解析に供した。各化合物の定量値は、マスクロマトグラムにおける内部標準 (10-camphorsulfonic acid) に対するピーク比として、相対値 (Intensity) で示している。n=3, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  (それぞれ硫酸塩培地とチオ硫酸塩培地の結果について有意差検定を実施)。

#### 1-3-4. システインシンターゼ様遺伝子 *YGR012W* はチオ硫酸イオン同化において主要な役割を有していない

最初にロダネーゼ以外の酵素がチオ硫酸イオン同化経路に関与する可能性として、チオ硫酸イオンを直接の基質として炭素骨格に結合させることが可能な酵素、すなわち大腸菌における *CysM* のオーソログが存在する可能性を考えた。そこで、酵母ゲノムから相同性検索を行ったところ、大腸菌の *CysM* に類似した一次構造をもつタンパク質をコードする遺伝子 *YGR012W* が見つかった。この遺伝子がチオ硫酸イオン同化経路に関与するかどうかについて破壊株を作製し、その生育能を検討したが、野生型株と同様にチオ硫酸塩培地においては硫酸塩培地よりも生育が促進することが確認された (図 11)。したがって、*YGR012W* はチオ硫酸イオン同化経路において主要な役割を担っていないと考えられた。

#### 1-3-5. 他のロダネーゼドメインを持つタンパク質はチオ硫酸イオン同化において主要な役割を有していない

ロダネーゼには保存されたロダネーゼドメインが存在する (Bordo and Bork, 2002)。2 番目の可能性である「他に主要なロダネーゼが存在する」を検証するために、再び酵母のゲノムデータベースより、ロダネーゼドメインを有するタンパク質をコードする遺伝子を探索した。その結果、5 種の候補遺伝子が得られた (*ARR2, MIH1, PTP3, UBP5, UBP7*) (表 10)。これらの遺伝子破壊株について硫酸塩培地およびチオ硫酸塩培地での生育能について評価を行った (図 12)。しかしながら、これらの破壊株では全て野生型株と同様にチオ硫酸塩培地における生育促進が見られた。このことから、「他に主要なロダネーゼが存在する」という可能性は低いと考えられた。

表 11. 酵母ゲノム上に存在するロダネーゼドメインを有する遺伝子

Systematic name	Gene name	Description	Localization
<i>YPR200C</i>	<i>ARR2</i>	Arsenate reductase	-
<i>YMR036C</i>	<i>MIH1</i>	Proteine phosphatase	Mitochondrion
<i>YER075C</i>	<i>PTP3</i>	Proteine phosphatase	Nucleus, Cytoplasm
<i>YER144C</i>	<i>UBP5</i>	Putative ubiquitin-specific protease	Cytoplasm
<i>YIL156W</i>	<i>UBP7</i>	Ubiquitin-specific protease	Cytoplasm

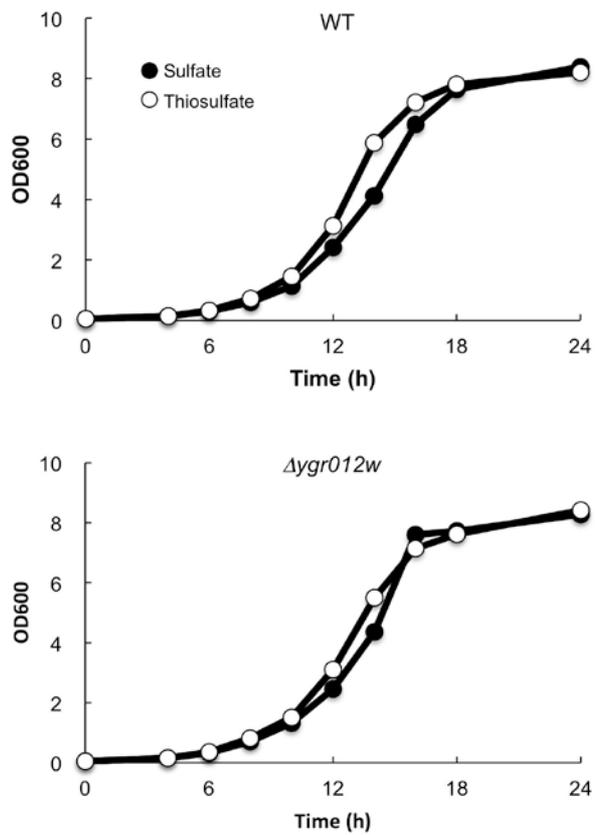


図 11. 硫酸イオンまたはチオ硫酸イオン単一硫黄源下における *ygr012w* 遺伝子破壊株の生育

野生型株 (WT: BY4741+) ,  $\Delta ygr012w$  株 (KYO44) を硫酸塩培地で前培養を行った後によく洗浄し、チオ硫酸塩培地に  $OD_{600} = 0.05$  で植菌し、 $30^{\circ}\text{C}$  で振とう培養を行った。

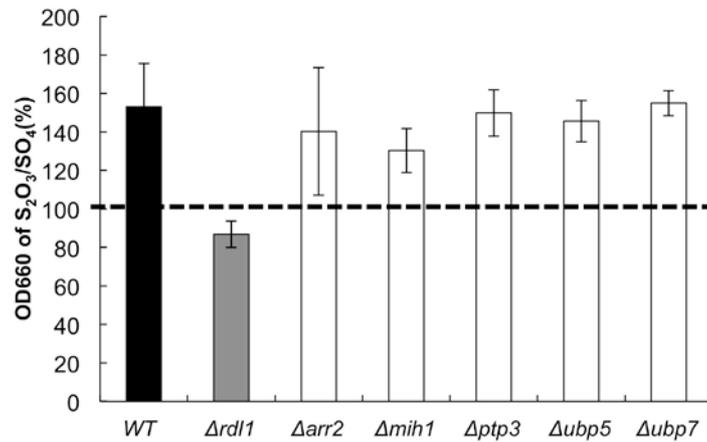


図 12. 硫酸イオンまたはチオ硫酸イオン単一硫黄源下におけるロダネーゼドメインを有する遺伝子の破壊株の生育（平成26年度 舟橋依里 修士論文を改変）

破壊株コレクション由来の野生型株 (WT:  $\Delta his3$ ) ,  $\Delta rdl1$  株,  $\Delta arr2$  株,  $\Delta mih1$  株,  $\Delta ptp3$  株,  $\Delta ubp5$  株,  $\Delta ubp7$  株に pRS415-CgHIS3-MET17 および pRS415 を導入することで、栄養要求性を相補後、硫酸塩培地で前培養を行った。これをよく洗浄し、硫酸塩培地およびチオ硫酸塩培地に OD<sub>660</sub> = 0.1 で植菌し、30°Cで12時間の振とう培養を行った。硫酸塩培地における OD<sub>660</sub> の値でチオ硫酸塩培地における OD<sub>660</sub> の値を標準化した。

### 1-3-6. チオ硫酸イオン同化経路を担うロダネーゼには重複性がある

ロダネーゼを介した経路が重複している可能性を検証するために、大腸菌を

用いた代謝経路の相補性試験を行った。前述したように大腸菌のチオ硫酸イオン同化経路においては、*S*-スルホシステインシンターゼである *CysM* が極めて重要な役割を果たしており、*cysM* 遺伝子を破壊した株 ( $\Delta cysM$ 株) はチオ硫酸イオンを単一硫黄源とした場合に生育が著しく低下する。一方で、大腸菌由来のロダネーゼ (*GlpE*, *PspE*, *YeeD* など) の過剰発現は $\Delta cysM$ 株の生育能を回復させることが明らかになっている (図 3)。そこで、大腸菌 $\Delta cysM$ 株の細胞内で酵母由来のロダネーゼを過剰発現させ、チオ硫酸イオンを単一硫黄源とした培地での生育能が回復するかどうか検討を行った。具体的には、大腸菌の発現ベクターにクローニングした酵母由来のロダネーゼ 5 種 (*RDL1*, *RDL2*, *UBA4*, *TUM1*, *YCH1*) をそれぞれ $\Delta cysM$ 株へ導入後、得られた形質転換体をチオ硫酸塩培地で培養し、その生育能を解析した (図 13)。

その結果、これらの形質転換体では全てチオ硫酸塩培地において生育能の回復が見られた。特に *RDL1* および *RDL2* の過剰発現株では、野生型株とほぼ同程度の生育が見られた。また、*YCH1* の過剰発現株では、*RDL1* および *RDL2* より弱いものの、生育能の回復が見られた。*TUM1* および *UBA4* の過剰発現株ではさらに弱くではあるが、生育がやや回復した。

これらの結果から、酵母においては少なくとも 5 種類のロダネーゼがチオ硫酸イオンから亜硫酸イオンおよび硫化物イオンへの変換に関与することが明らかになった。

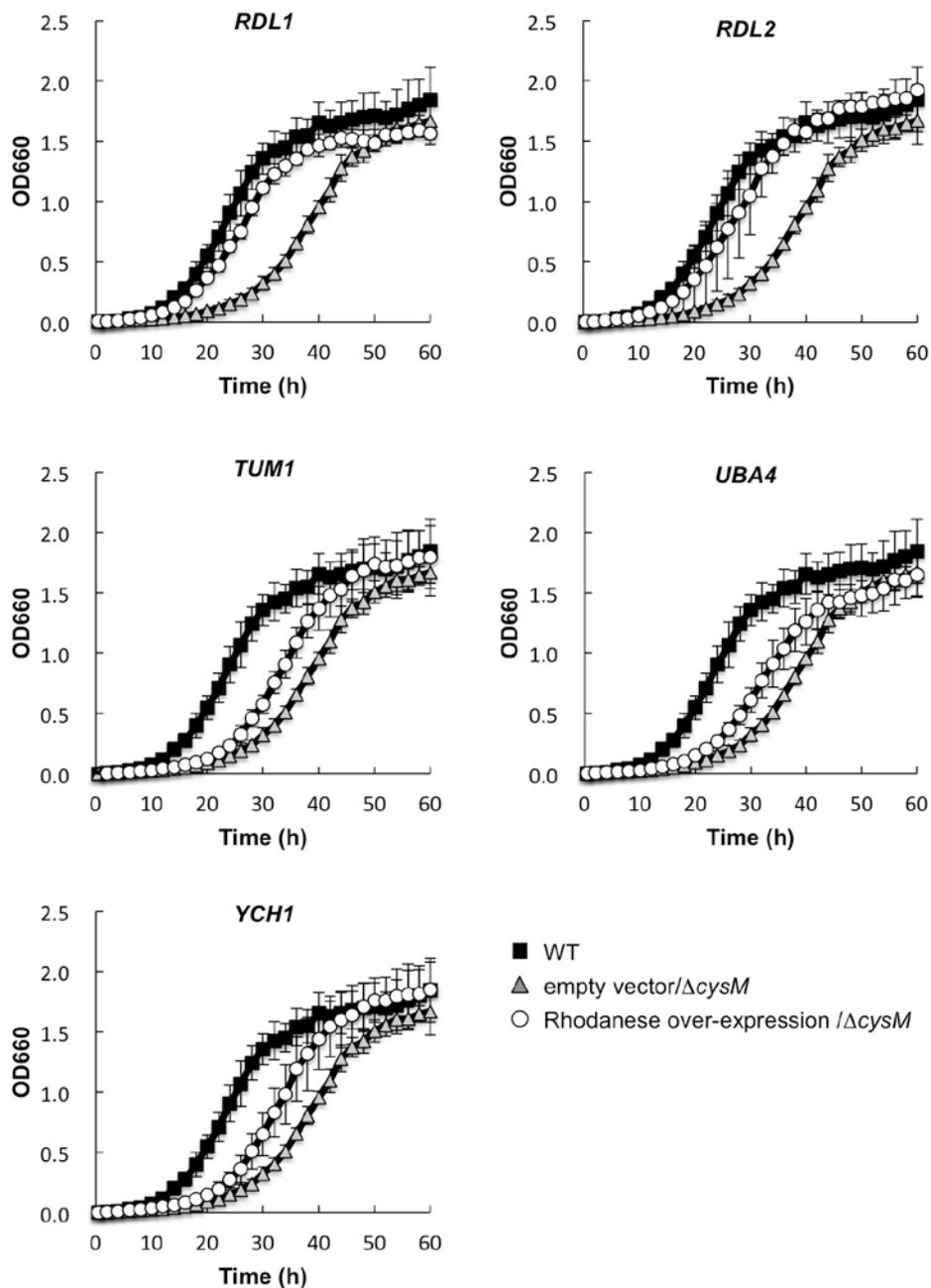


図 13. 酵母由来ロダネーゼの過剰発現が大腸菌 *cysM* 遺伝子破壊株の生育に及ぼす影響

野生型株 (WT: BW25113),  $\Delta cysM$  株,  $\Delta cysM$  株に酵母由来のロダネーゼ (*RDL1*, *RDL2*, *TUM1*, *UBA4*, *YCH1*) を過剰発現させた株について、シスチンを単一の硫黄源とする M9 培地で前培養を行った後によく洗浄し、0.1 mM の IPTG を含むチオ硫酸イオンを単一の硫黄源とする M9 培地に OD = 0.02 で植菌し、25°C で振とう培養を行った。

### 1-3-7. Rdl1 および Rdl2 はチオ硫酸イオン同化経路を担う主たるロダネーゼである

ロダネーゼには重複性があることが明らかになったことから、酵母における単独破壊で最も効果があった *RDL1* 遺伝子に注目した。そこで、*RDL1* と別のロダネーゼ遺伝子との二重破壊株 ( $\Delta rdl1\Delta rdl2$  株,  $\Delta rdl1\Delta uba4$  株,  $\Delta rdl1\Delta tum1$  株,  $\Delta rdl1\Delta ych1$  株) を作製し、その生育について検討を行った (図 14)。その結果、 $\Delta rdl1\Delta rdl2$  株は硫酸塩培地においては野生型株と同程度に生育するが、チオ硫酸塩培地では著しく生育が低下することが明らかになった。

これについて、 $\Delta rdl1\Delta rdl2$  株に対してチオ硫酸イオンが毒性を示すなど、硫黄同化経路以外の要因で生育が阻害されている可能性も考えられた。そこで、チオ硫酸に加えて、硫酸イオン、またはメチオニンを硫黄源として加えて培養すると、それらの生育が回復した (図 15)。以上の結果から、 $\Delta rdl1\Delta rdl2$  株はチオ硫酸イオンを殆ど同化できないことが明らかになった。したがって、*Rdl1* および *Rdl2* がチオ硫酸イオン同化経路において主要な役割を果たすロダネーゼであると結論づけた。

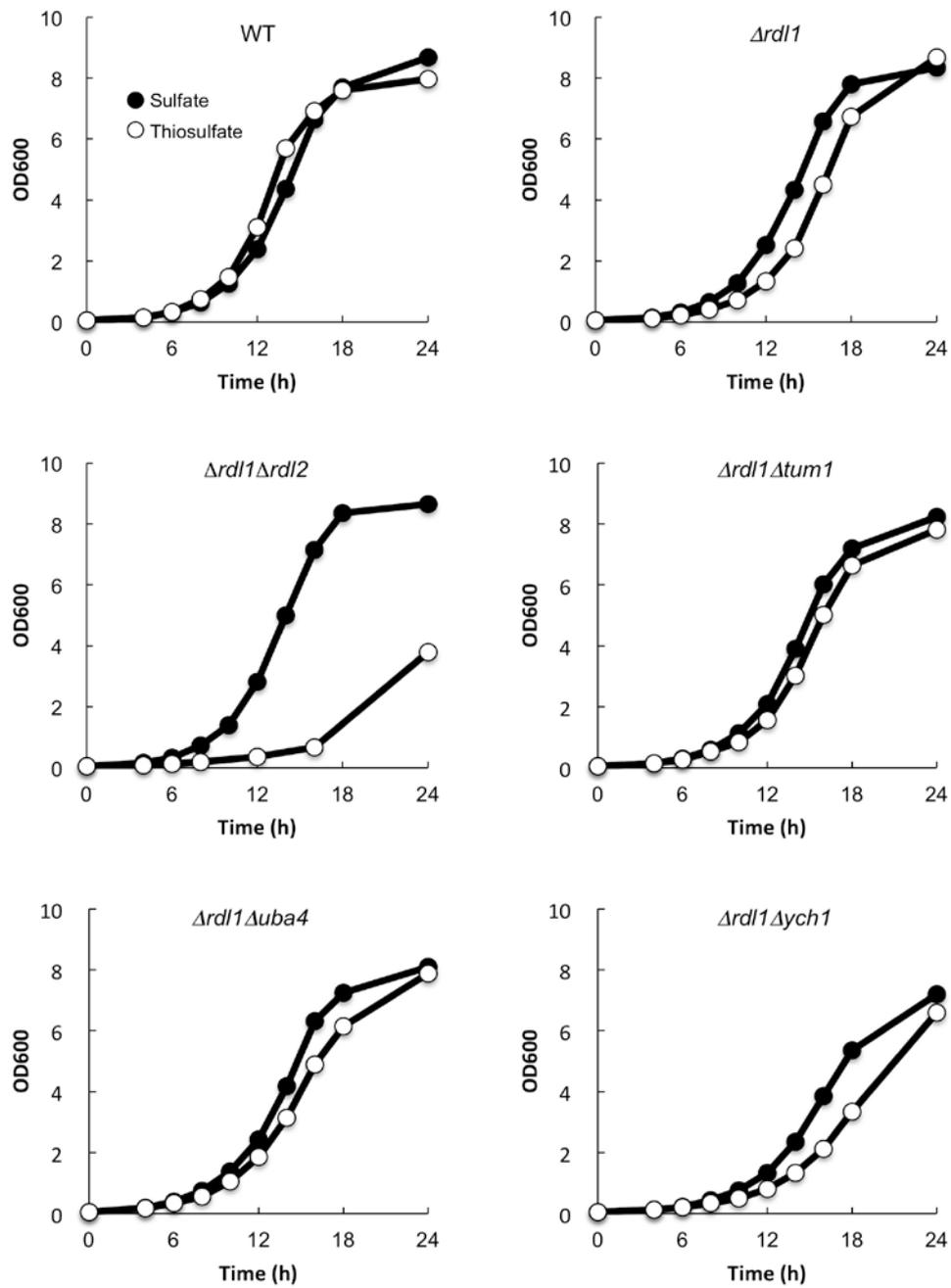


図 14. 硫酸イオンまたはチオ硫酸イオン単一硫黄源下におけるロダネーゼ遺伝子二重破壊株の生育

野生型株 (WT: BY4741+) ,  $\Delta rd11$  株 (KYO6) ,  $\Delta rd11\Delta rd12$  株 (KYO09) ,  $\Delta rd11\Delta tum1$  株 (KYO37) ,  $\Delta rd11\Delta uba4$  株 (KYO53) ,  $\Delta rd11\Delta ych1$  株 (KYO55) を硫酸塩培地で前培養を行った後によく洗浄し、硫酸塩培地およびチオ硫酸塩培地に OD<sub>600</sub> = 0.05 で植菌し、30°Cで振とう培養を行った。

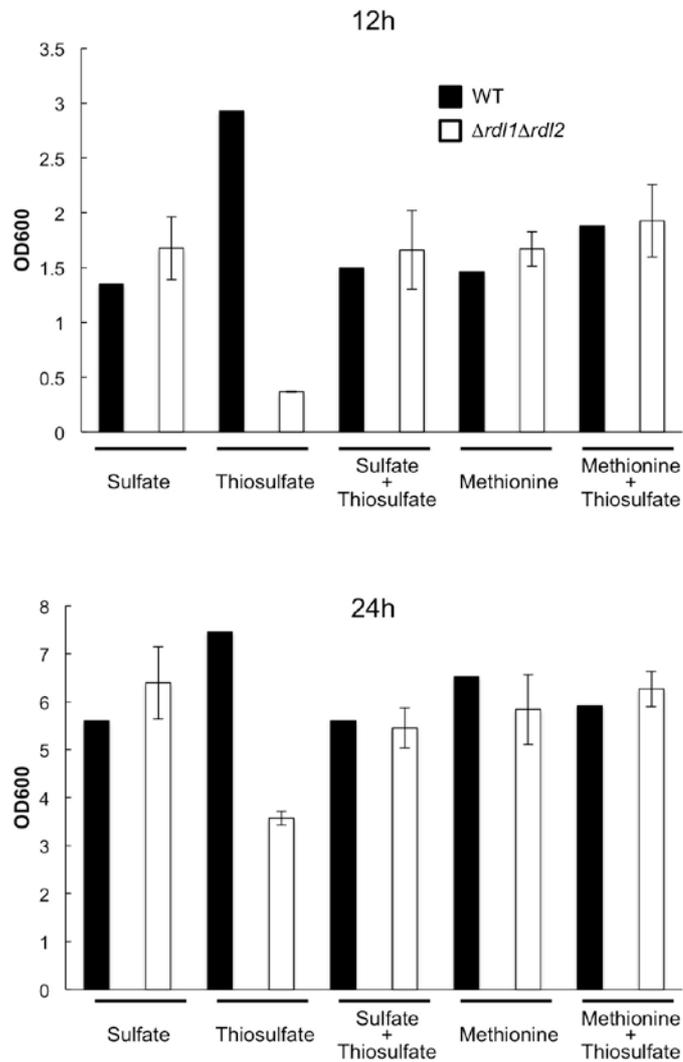


図 15. 各種硫黄源下における *RDL1* 遺伝子および *RDL2* 遺伝子の二重破壊株の生育

野生型株 (WT: BY4741+) ,  $\Delta rd1\Delta rd2$  株 (KYO109) , を硫酸塩培地で前培養を行った後によく洗浄し、各種硫黄源の培地に  $OD_{600} = 0.05$  で植菌し、 $30^{\circ}\text{C}$  で振とう培養を行った。培養 12 時間後および 24 時間後に  $OD_{600}$  の測定を行った。

### 1-3-8. グルタレドキシンはチオ硫酸イオン同化経路に関与する可能性がある

チオ硫酸培地における $\Delta met5$ 株および $\Delta met10$ 株の生育が $\Delta met16$ 株と比べて遅延したことから、チオ硫酸イオン同化の際にはまず亜硫酸イオンが生成し、その後、硫化物イオンが生成することが示唆された(図6)。また、ロダネーゼの反応ではチオ硫酸イオンの硫黄原子が酵素自身に一度チャージされ、基質に転移する。これらのことから、硫化物イオンの生成はロダネーゼから硫黄原子が遊離する還元反応ではないか考えた。還元反応を担う酵素は多数存在するが、大腸菌においてロダネーゼGlpEがチオレドキシシと相互作用することが報告されていたことから(Ray et al., 2000)、酵母においてもチオレドキシシもしくはグルタレドキシシがチオ硫酸イオンの同化経路に関与する可能性を考えた(図16)。

これらのレドキシシファミリーがチオ硫酸同化経路に関与するかどうかを調べるために、各遺伝子の単独破壊株コレクションを用いて探索を行った。この探索系では破壊株コレクション由来の株にプラスミドを導入し、栄養要求性を相補して実験に用いた。これらの株の生育能について硫酸塩培地とチオ硫酸培地で評価を行った。

その結果、チオレドキシシの遺伝子破壊株では(図17)、チオ硫酸塩培地の生育能が硫酸塩培地より低下する株は見だせなかった。一方で、 $\Delta trx3$ 株ではチオ硫酸塩培地では正常な生育能を示すが、硫酸塩培地では生育能の低下が見られた。これはTrx3が硫酸イオンの同化経路において、何らかの役割を果たしている可能性を示唆している。

一方、グルタレドキシシの遺伝子破壊株では(図18)、 $\Delta grx1$ 株および $\Delta grx2$ 株のチオ硫酸培地における生育が硫酸塩培地より低下することが明らかになった。 $\Delta grx1$ 株では、チオ硫酸塩培地における生育が硫酸塩培地よりも低下した。また、 $\Delta grx2$ 株では、チオ硫酸塩培地での生育が硫酸塩培地と同程度であった。これら以外の株ではチオ硫酸塩培地、硫酸塩培地の両方で野生型株に比べて生育能が低下していた。このことから、チオ硫酸イオン同化経路において、グルタレドキシシが関与する可能性が示唆された。

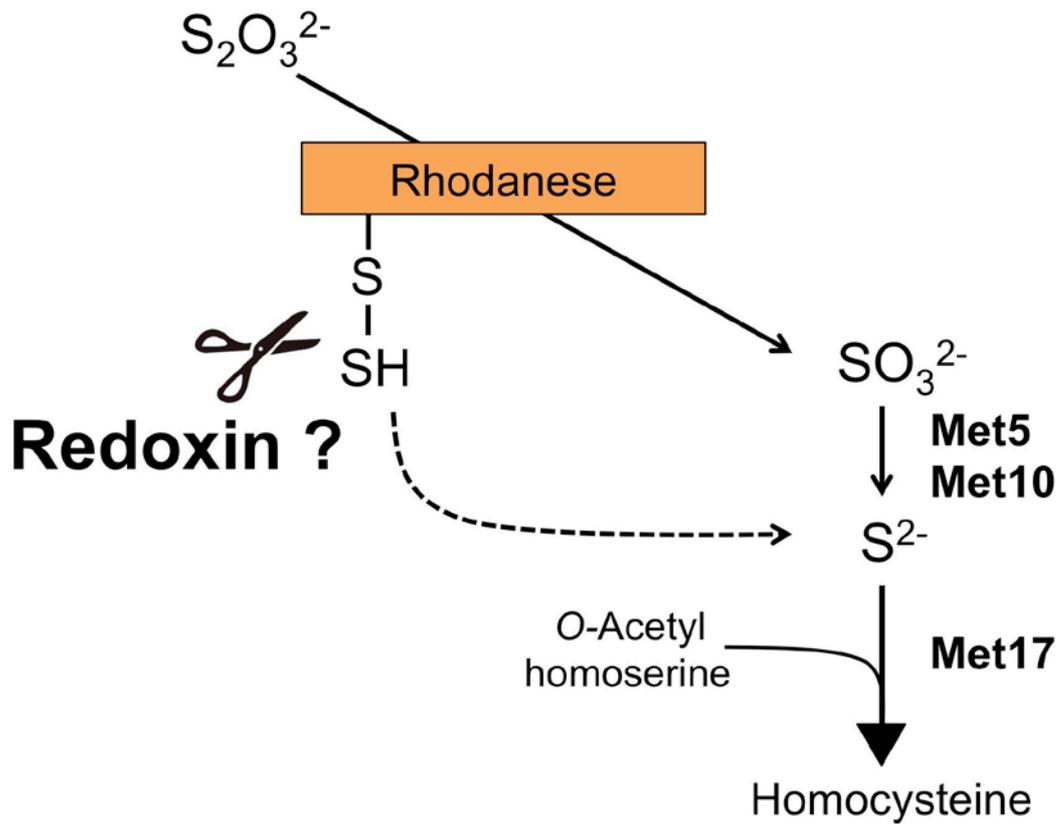


図 16. 想定されるレドキシンとロダナーゼの相互作用モデル

ロダナーゼにチャージされた硫黄原子がチオレドキシンまたはグルタレドキシンによって還元され、遊離することで硫酸イオンの同化経路へ合流する可能性を想定した。

表 11. 酵母ゲノム上に存在するチオレドキシソおよびグルタレドキシソの遺伝子  
(Saccharomyces Genome Database より)

Thioredoxin		
Systematic name	Gene name	Description
YLR043C	TRX1	Cytoplasmic thioredoxin isoenzyme; part of thioredoxin system which protects cells against oxidative and reductive stress; forms LMA1 complex with Pbi2p; acts as a cofactor for Tsa1p; required for ER-Golgi transport and vacuole inheritance; with Trx2p, facilitates mitochondrial import of small Tims Tim9p, Tim10p, Tim13p by maintaining them in reduced form; abundance increases under DNA replication stress; TRX1 has a paralog, TRX2, that arose from the whole genome duplication.
YGR209C	TRX2	Cytoplasmic thioredoxin isoenzyme; part of thioredoxin system which protects cells against oxidative and reductive stress; forms LMA1 complex with Pbi2p; acts as a cofactor for Tsa1p; required for ER-Golgi transport and vacuole inheritance; with Trx1p, facilitates mitochondrial import of small Tims Tim9p, Tim10p, Tim13p by maintaining them in reduced form; abundance increases under DNA replication stress; TRX2 has a paralog, TRX1, that arose from the whole genome duplication.
YCR083W	TRX3	Mitochondrial thioredoxin; highly conserved oxidoreductase required to maintain the redox homeostasis of the cell, forms the mitochondrial thioredoxin system with Trr2p, redox state is maintained by both Trr2p and Glr1.
Glutaredoxin		
Systematic name	Gene name	Description
YCL035C	GRX1	Glutathione-dependent disulfide oxidoreductase; hydroperoxide and superoxide-radical responsive, heat-stable, with active site cysteine pair; protects cells from oxidative damage; GRX1 has a paralog, GRX2, that arose from the whole genome duplication; protein abundance increases in response to DNA replication stress.
YDR513W	GRX2	Cytoplasmic glutaredoxin; thioltransferase, glutathione-dependent disulfide oxidoreductase involved in maintaining redox state of target proteins, also exhibits glutathione peroxidase activity, expression induced in response to stress; GRX2 has two in-frame start codons resulting in a shorter isoform that is retained in the cytosol and a longer form translocated to the mitochondrial matrix; GRX2 has a paralog, GRX1, that arose from the whole genome duplication.
YDR098C	GRX3	Glutathione-dependent oxidoreductase; hydroperoxide and superoxide-radical responsive; monothiol glutaredoxin subfamily member along with Grx4p and Grx5p; protects cells from oxidative damage; with Grx4p, binds to Aft1p in iron-replete conditions, promoting its dissociation from promoters; evidence exists indicating that the translation start site is not Met1 as currently annotated, but rather Met36; GRX3 has a paralog, GRX4, that arose from the whole genome duplication.
YER174C	GRX4	Glutathione-dependent oxidoreductase; hydroperoxide and superoxide-radical responsive; monothiol glutaredoxin subfamily member along with Grx3p and Grx5p; protects cells from oxidative damage; with Grx3p, binds to Aft1p in iron-replete conditions, promoting its dissociation from promoters; mutant has increased aneuploidy tolerance; transcription regulated by Yap5p; GRX4 has a paralog, GRX3, that arose from the whole genome duplication.
YPL059W	GRX5	Glutathione-dependent oxidoreductase; mitochondrial matrix protein involved at an early step in the biogenesis of iron-sulfur centers along with Bol1p; hydroperoxide and superoxide-radical responsive; monothiol glutaredoxin subfamily member along with Grx3p and Grx4p.
YDL010W	GRX6	Cis-golgi localized monothiol glutaredoxin, binds Fe-S cluster; more similar in activity to dithiol than other monothiol glutaredoxins; involved in the oxidative stress response; GRX6 has a paralog, GRX7, that arose from the whole genome duplication.
YBR014C	GRX7	Cis-golgi localized monothiol glutaredoxin; more similar in activity to dithiol than other monothiol glutaredoxins; involved in the oxidative stress response; does not bind metal ions; GRX7 has a paralog, GRX6, that arose from the whole genome duplication.
YLR364W	GRX8	Glutaredoxin that employs a dithiol mechanism of catalysis; monomeric; activity is low and null mutation does not affect sensitivity to oxidative stress; GFP-fusion protein localizes to the cytoplasm; expression strongly induced by arsenic.

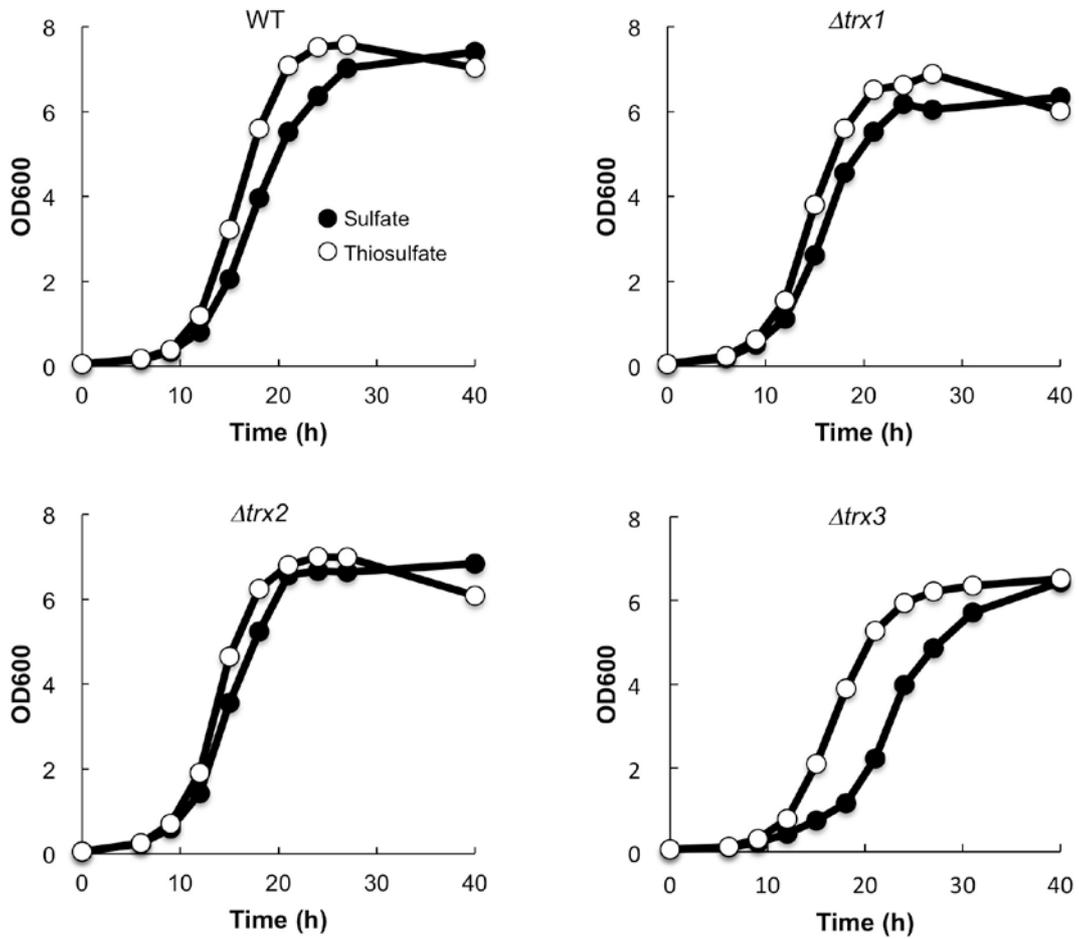
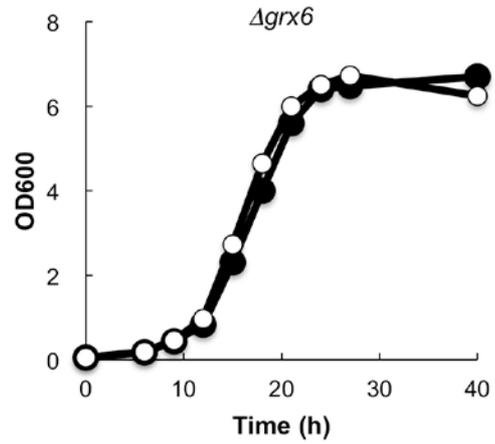
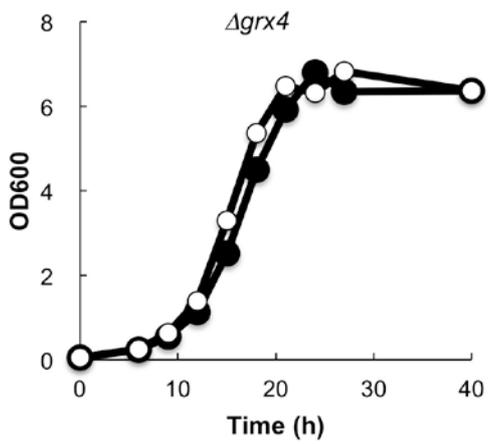
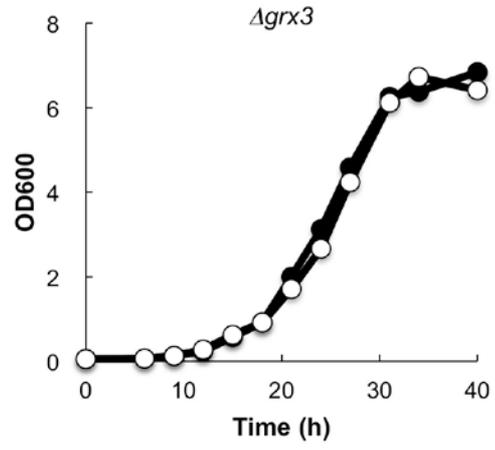
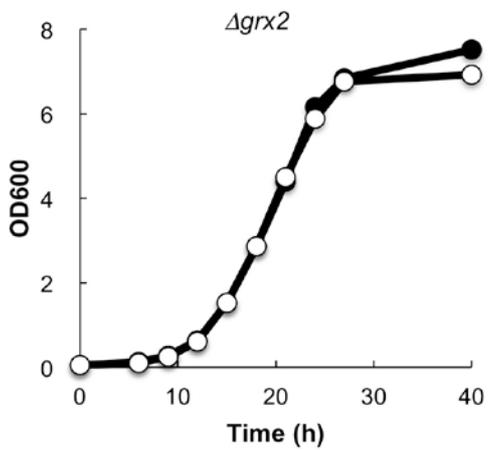
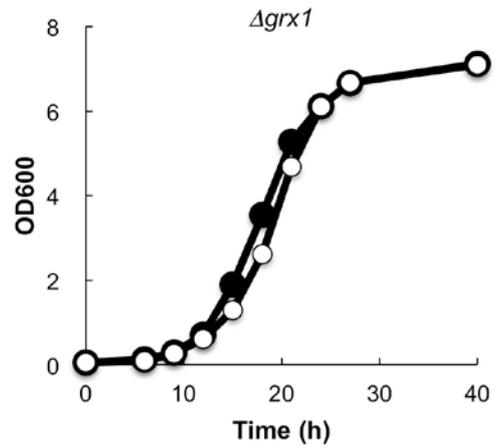
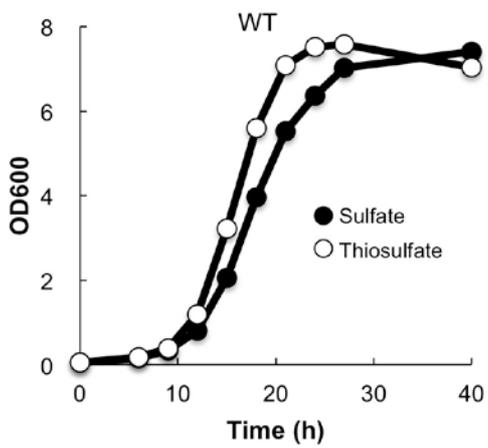


図 17. 硫酸イオンまたはチオ硫酸イオン単一硫黄源下におけるチオレドキシソ  
遺伝子破壊株の生育

破壊株コレクション由来の野生型株 (WT:  $\Delta his3$ ) ,  $\Delta trx1$  株,  $\Delta trx2$  株,  $\Delta trx3$  株に pRS415-*CgHIS3-MET17* および pRS415 を導入することで、栄養要求性を相補後、硫酸塩培地で前培養を行った。これをよく洗浄し、硫酸塩培地およびチオ硫酸塩培地に  $OD_{600} = 0.05$  で植菌し、 $30^{\circ}\text{C}$  で振とう培養を行った。



(次のページに続く)

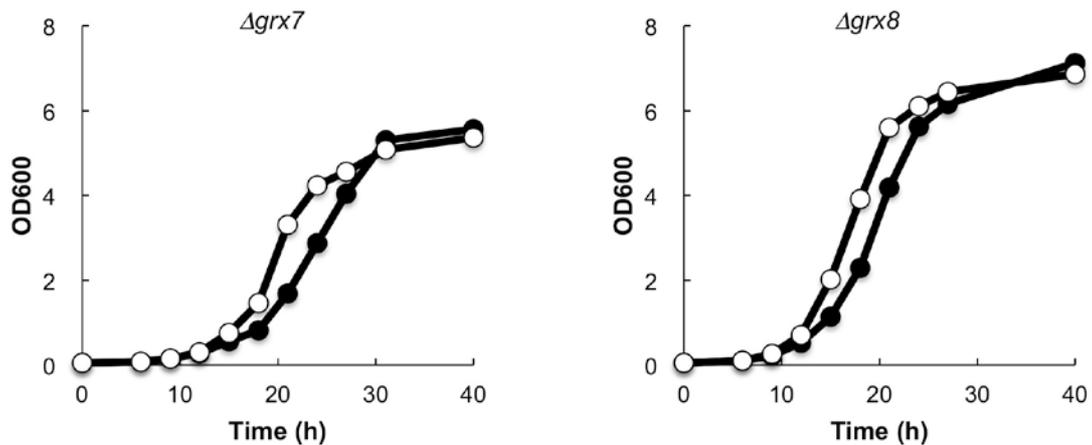


図 18. 硫酸イオンまたはチオ硫酸イオン単一硫黄源下におけるグルタレドキシ  
ン遺伝子破壊株の生育

破壊株コレクション由来の野生型株 (WT:  $\Delta his3$ ) ,  $\Delta grx1$  株,  $\Delta grx2$  株,  $\Delta grx3$  株,  $\Delta grx4$  株,  $\Delta grx5$  株,  $\Delta grx6$  株,  $\Delta grx7$  株,  $\Delta grx8$  株に pRS415-*CgHIS3-MET17* および pRS415 を導入することで、栄養要求性を相補後、硫酸塩培地で前培養を行った。これをよく洗浄し、硫酸塩培地およびチオ硫酸塩培地に  $OD_{600} = 0.05$  で植菌し、 $30^{\circ}\text{C}$  で振とう培養を行った (野生株は図 17 と共通)。

## 1-4. 考察

本章では、酵母におけるチオ硫酸イオン同化経路の同定を試みた。その結果、ロダネーゼである **Rdl1** および **Rdl2** によってチオ硫酸イオンが亜硫酸イオンおよび硫化物イオンに変換され、それらが硫酸イオン同化経路に合流することでホモシステインが合成されることが明らかになった。生理的条件においてチオ硫酸イオンから亜硫酸イオンおよび硫化物イオンへの変換の主たる部分は **Rdl1** および **Rdl2** が担うと考えられるが、その他のロダネーゼに関しても過剰発現系においてはこの変換が起こっていると考えられるため、この経路自身には重複性があることが示唆された。

加えて、ロダネーゼによる変換では通常、亜硫酸イオンが先に生成し、その後、硫化物イオンが生成することが明らかになった。このメカニズムとしては、グルタレドキシシンがロダネーゼにチャージされた硫黄原子を還元することで硫化物イオンとして遊離させる可能性が考えられた。

### 1-4-1. **Rdl1** および **Rdl2** の機能

二重遺伝子破壊株を用いた解析から、**Rdl1** および **Rdl2** が酵母においてチオ硫酸イオン同化を担う主たるロダネーゼであることが示された (図 14)。加えて、**Rdl1** および **Rdl2** は大腸菌  $\Delta cysM$  株のチオ硫酸イオン単一硫黄源下での生育を野生型株と同程度に回復させるロダネーゼであることが示された (図 13)。これは酵母における二重遺伝子破壊株の結果と一致している。

**RDL1** 遺伝子と **RDL2** 遺伝子はゲノム上で ORF 同士が隣接しており、タンパク質の一次構造も 42% の相同性がある。このことが機能の重複を招き、**RDL1** 遺伝子の単独破壊株では比較的表現型が抑えられた原因であると考えられる。

また、**Rdl1** および **Rdl2** 以外のロダネーゼに関しても過剰発現系では大腸菌  $\Delta cysM$  株の生育を相補できたことから (図 13)、 $\Delta rdl1\Delta rdl2$  株がチオ硫酸塩培地において 16 時間以降に徐々に生育可能であったのは (図 14)、他のロダネーゼによって **Rdl1** および **Rdl2** の機能が補完されている可能性が考えられる。今後、チオ硫酸イオン同化経路をより詳しく解析するためには、**Rdl1** および **Rdl2** の酵素的特性や相互作用因子、および酵母細胞内におけるロダネーゼ活性の検討が必要であると考えている。

*RDL1* 遺伝子はヒトにおいて硫化水素消去系の一端を担うロダネーゼをコードする *TSTD1* 遺伝子のオーソログであることが知られているが (Melideo et al., 2014)、酵母細胞内での *Rdl1* および *Rdl2* の機能はほとんど明らかになっていなかった。

このことから、本章では *Rdl1* および *Rdl2* の生理機能の一端を明らかにしたと言える。加えて、大腸菌におけるロダネーゼを介したチオ硫酸イオン同化経路の検証実験 (図 3B) は過剰発現系であったことから、生理的条件とは言い難く、本章の結果は生理的条件下でロダネーゼがチオ硫酸イオンの同化を担うことを示した初めての知見であると考えられる。

興味深いことに、放線菌の一種である *Saccharopolyspora erythraea* はロダネーゼを欠損することで、システイン要求性を示すことが報告されている (Donadio et al., 1990)。*S.erythraea* においては、ロダネーゼはチオ硫酸イオンから亜硫酸イオンおよび硫化物イオンを生成するのではなく、逆に亜硫酸イオンおよび硫化物イオンからチオ硫酸イオンを生成すると考えられている。硫黄代謝を理解する上でロダネーゼの生理機能は注目に値すると言える。

#### 1-4-2. 先行研究との相違点

本研究室の先行研究においても、酵母のチオ硫酸イオン同化経路の探索が行われていた (平成 26 年度 舟橋依里 修士論文)。この際には主として栄養要求性を持つ BY4741 を親株とする破壊株コレクションを用いた解析が行われた。

先行研究では、局在の観点から細胞質に存在するロダネーゼについてのみ評価を行い、チオ硫酸塩培地における生育促進効果が消失すること、およびその際に細胞内のホモシステインが低下することから、チオ硫酸イオン同化経路に関与する可能性のあるロダネーゼとして *Uba4* を挙げている。本研究において、原栄養株を親株とした  $\Delta$ *Uba4* 株について解析を行ったところ、チオ硫酸塩培地における生育促進効果がキャンセルされる結果については再現性が得られたが (図 9)、細胞内のホモシステイン量の低下に関しては再現が得られなかった (図 10)。また、本研究では、ホモシステインと同様に、システインおよびグルタチオンについても定量解析を行ったが、これらに関しても野生型株と同様の表現型を示した。

BY4741 は破壊株コレクションをはじめとした多くのリソースの親株であり、現在最も酵母研究で用いられている菌株の 1 つある。BY4741 の親株はゲノムプ

プロジェクトで使用された S288C であり、S288C に栄養要求性マーカーとして *MET17* (旧名: *MET15*) をはじめ複数の代謝関連遺伝子を破壊することで作製されている (Brachmann et al., 1998)。前述のとおり、*MET17* はホモシステインシンターゼをコードしており、酵母における硫黄同化経路において中心的な役割を果たす遺伝子である。先行研究では、*MET17* をプラスミドで発現させることで要求性を相補しているが、その場合本来の生理的条件と異なる結果を示す危険性がある。栄養要求性マーカーは安価かつ簡便に扱える酵母遺伝学における伝統的な手法であるが、代謝研究を行う際にはその存在を慎重に考慮する必要がある。実際に 2002 年に Pronk によって書かれた総説 (Pronk, 2002) では栄養要求性マーカーを避けるべきであると提案されており、現在は要求性を持たない破壊株コレクションが作られ始めている (VanderSluis et al., 2014 ; Mülleder et al., 2012)。本研究ではこの問題を考慮した上で、BY4741 と S288C を交配させることで原栄養株を作製し、実験に使用してきた。

一方で本研究においても、チオレドキシシンおよびグルタレドキシシンがチオ硫酸イオン同化経路に関与する可能性の検討の際には、迅速に網羅的な探索を行うために BY4741 の破壊株コレクションを用いた。これらについては、原栄養株を用いた詳細な解析が必要である。

#### 1-4-3. Uba4 の機能

本研究においても  $\Delta$ *Uba4* 株ではチオ硫酸塩培地における生育促進効果が見られなくなるという結果が得られた (図 9)。

ユビキチン活性化酵素 (E1) 様タンパク質として同定された Uba4 は (Furukawa et al., 2000)、tRNA の wobble 位のウリジンのチオール化に関与すると報告されており、このチオール化は細胞内にメチオニンおよびシステインが十分に存在するかどうかを判断するセンサーの役割を果たすことが示されている (Laxman et al., 2013)。細胞内にメチオニンおよびシステインが十分に存在しなければ、Uba4 を介した tRNA のチオール化は起こらず、細胞は生育を低下させメチオニンおよびシステインの生合成を行う。

このことから、*UBA4* 遺伝子破壊株のチオ硫酸塩培地での生育促進効果が見られなくなる表現型はこのセンシングの不全に起因すると考えられる。実際に *RDL1* との二重遺伝子破壊株である  $\Delta$ *rdl1* $\Delta$ *uba4* 株でもチオ硫酸塩培地における生育は単独破壊株である  $\Delta$ *rdl1* 株とほぼ同等であり (図 14)、過剰発現による

大腸菌 $\Delta$ cysM 株の相補実験においても生育を強くは回復させなかったことから (図 13)、Uba4 のチオ硫酸同化経路への寄与はあまり高くないと考えられた。

#### 1-4-4. チオ硫酸イオン同化経路の局在

酵母において、硫黄同化はそれに関与する酵素、特に Met17 が細胞質に局在するとされることから硫黄同化は細胞質で起こると考えられている。一方で、Rdl1 および Rdl2 は大規模な解析からともにミトコンドリアに局在することが示されている (Reinders et al., 2006)。

前述したように、硫黄同化経路では多段階の還元反応を経て、無機性硫黄化合物を硫化物イオンにまで還元する。この反応を酸化的环境であるミトコンドリアで行うことは一見矛盾を含んでいるように見える。

興味深いことに、Rdl1 は過剰発現によって大腸菌 $\Delta$ cysM 株の生育を相補可能な大腸菌のロダネーゼ PspE と相同性があるが、PspE もまた酸化的环境であるペリプラズムに局在する (Model et al., 1997)。このことは、酸化的环境に存在するロダネーゼがチオ硫酸イオン同化経路において何らかの役割を持つ可能性を示唆しているのかもしれない。

一方で、チオ硫酸イオンを硫黄源とした際の Rdl1 および Rdl2 の局在については明らかになっておらず、これらの局在が変化する可能性も否定できない。このことから、今後は Rdl1 や Rdl2、そして Met17 の時空間的な動態について解析を進める必要がある。

#### 1-4-5. チオ硫酸イオンの取り込み系

硫酸イオンの取り込みはアニオントランスポーターの Sul1 および Sul2 によって行われることが明らかになっている (Cherest et al., 1997)。一方でチオ硫酸イオンのトランスポーターは明らかになっていない。そこで、Boer らのマイクロアレイの報告 (Boer et al., 2003) に基づき、硫黄飢餓で発現が上昇する遺伝子の中からトランスポーターまたは機能未知で膜貫通型タンパク質をコードするもの、合計 20 種を選び出し、それらの遺伝子破壊株を用いて低濃度のチオ硫酸イオン単一硫黄源下で生育できなくなるものを探索した。しかしながら、チオ硫酸イオンの濃度を低下させていった際に生育できなくなる破壊株は得られなかった。一方で、 $\Delta$ sul1 株および  $\Delta$ sul2 株では若干の生育の低下が見られたことから、Sul1, Sul2 がチオ硫酸イオンの取り込みにも関与している可能性が考えられ

た。

#### 1-4-6. チオレドキシシンおよびグルタレドキシシン

破壊株コレクションを用いた探索からグルタレドキシシンの遺伝子破壊株がチオ硫酸塩培地において生育の低下を示すことが明らかになった (図 18)。

$\Delta grx1$  株はチオ硫酸塩培地での生育が硫酸塩培地での生育を下回り、 $\Delta grx2$  株では、チオ硫酸塩培地での生育促進効果が見られなくなった。

このことから、ロダネーゼにチャージされた硫黄をグルタレドキシシンが還元することで遊離の硫化物イオンを生成し、この硫化物イオンが硫酸イオンの同化経路に合流するモデルが考えられた。グルタレドキシシンは自身が酸化されることで還元力を示すが、酸化型グルタレドキシシンを還元型に再生するには 1 分子の NADPH が必要になる。このため、チオ硫酸イオンから硫化物イオンを生成する経路では 1 分子の NADPH が追加で必要になると言える。

一方で、大腸菌のチオ硫酸イオン同化経路における *S*-スルホシステインからシステインの生成のように非酵素的にも反応は進むが、チオレドキシシンおよびグルタレドキシシンによって、反応が促進されるという可能性も十分に考えられる (Nakatani et al., 2012)。今後はこれに基づき、Rdl1 および Rdl2 と相互作用するグルタレドキシシンについて、精製酵素を用いた解析が望まれる。

#### 1-4-7. 酵母におけるチオ硫酸リプレッション

酵母において取り込みレベルでのチオ硫酸リプレッションが存在しないことは、先行研究において放射性同位体である  $^{35}\text{S}$  で標識された硫酸イオンの取り込みから示されていた (平成 26 年度 舟橋依里 修士論文)。これに加えて、本章では、チオ硫酸イオン同化経路の機能を著しく低下させた  $\Delta rdl1\Delta rdl2$  株を硫酸イオンおよびチオ硫酸イオンが共存する環境においても場合、野生型株と同等程度の生育を示す事を明らかにした (図 15)。これらのことから、酵母においてチオ硫酸リプレッションは取り込み、生育の両方から存在しないと考えられる。

酵母においてにおいてもチオ硫酸イオンは好ましい硫黄源であると言えるが、なぜチオ硫酸リプレッション存在しないのだろうか？ 1 つの可能性として、自然界における生息環境が考えられる。酵母は自然界において花や果実といった糖分の多い場所に生息するとされ、これらの環境中においてチオ硫酸イオンが豊富に存在する事は考えにくい。一方で、大腸菌が自然界で生息する環境の 1

つである動物の腸内にはチオ硫酸イオンが豊富に存在すると言われている。つまり大腸菌にとって、チオ硫酸イオンは身近な硫黄源であり、酵母にとってはそうでない可能性が高い。

このことを硫黄同化経路から考察する。大腸菌のチオ硫酸イオン同化経路にはチオ硫酸イオンを直接の基質とするシステインシンターゼ **CysM** が中心的な役割を担っており、いわばチオ硫酸イオン専用の同化経路が存在する。一方、酵母においては、(大腸菌ではほとんど機能しないと考えられる) ロダナーゼを介した経路で同化が行われる。ロダナーゼを介したチオ硫酸イオンの同化経路はその構成要素の一部が硫酸イオンの同化経路と共通している。あくまで推測にはなるが、チオ硫酸イオンを身近な硫黄源としなかった酵母において、チオ硫酸イオン専用の同化経路が進化的に淘汰されたのかもしれない。その場合、チオ硫酸イオンの同化経路のタイプとチオ硫酸リプレッションの有無には関連性を見出すことができるかもしれない。

一方で、チオ硫酸リプレッションは大腸菌をはじめとした一部の生物に特有のシステムであるのか、酵母を例外とした普遍的なシステムであるのか、現状では結論が出せない状況である。このことについて理解するためにも、より多くの生物種においてチオ硫酸イオン同化経路とその効果の解明が望まれる。

#### 1-4-8. チオ硫酸同化経路のエネルギー的な有利さ

前述したように硫黄同化経路では2分子のATPと4分子のNADPHを用いて、無機性硫黄化合物を硫化物イオンにまで還元する。この点から考えると、本章で示したチオ硫酸イオンの同化経路では、チオ硫酸イオンから亜硫酸イオンおよび硫化物イオンを生成するために、硫酸イオンの還元ステップの前半を省略することができる。これは亜硫酸イオンの生成の場合であれば、2分子のATPおよび1分子のNADPH、硫化物イオンの生成の場合であれば、2分子のATPおよび3分子のNADPHの節約に繋がる(図19)。

実際にチオ硫酸塩培地で酵母を培養した際に生育が良いこと(図6)、および有機性の硫黄関連化合物が増加すること(図7)は同化に必要なエネルギーの負荷が軽減されることに起因すると考えられる。また、硫黄同化経路から生成されるホモシステインは炭素、窒素、硫黄と言った細胞にとって主要な元素の多くを含んでいる。近年、代謝はネットワークとして考えられていることから、酵母にとって好ましい硫黄源であるチオ硫酸の代謝は硫黄以外の代謝経路へ影

響を与えているのかもしれない。

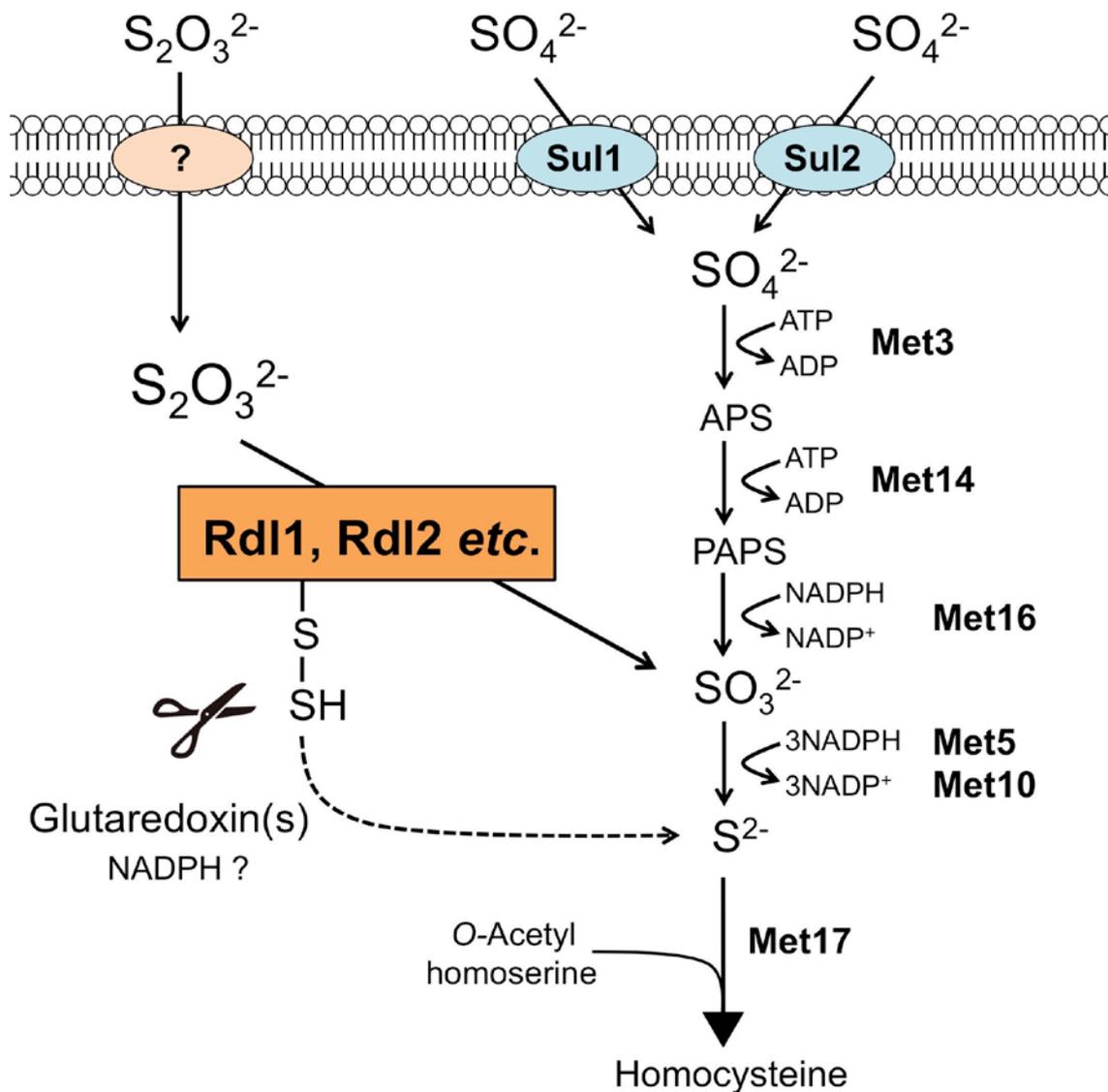


図 19. 酵母におけるロダナーゼを介したチオ硫酸イオン同化経路のモデル図

酵母細胞内に取り込まれたチオ硫酸イオンはRdl1およびRdl2をはじめとするロダナーゼによって亜硫酸イオンへと変換される。この際にロダナーゼにチャージされた硫黄原子はグルタレドキシンの還元を受けて硫化物イオンとなる。この亜硫酸イオンおよび硫化物イオンは硫酸イオンの同化経路に合流することでホモシステインが合成される。

## 第2章

# チオ硫酸イオン同化経路が酵母の細胞機能に 及ぼす影響の解析

### 2-1. 緒言

1章で述べたように、チオ硫酸イオンは酵母にとって好ましい硫黄源であり、チオ硫酸イオンを硫黄源とした際には硫酸イオンを硫黄源とした際に比較して、細胞の増殖速度や細胞内の硫黄関連代謝産物量が上昇した。

この原因としては、チオ硫酸イオンの同化経路では硫酸イオンの同化経路に比べて、ホモシステインを合成するために必要なエネルギーが少量で済むことが挙げられる。具体的には、初発の有機性硫黄化合物であるホモシステインを合成する場合、チオ硫酸イオンから亜硫酸イオンへの変換を行う場合には2分子 ATP と1分子の NADPH、硫化物イオンの変換を行う場合には2分子の ATP と3分子の NADPH の節約が可能である。

前述したように、硫黄同化は多数の ATP および NADPH を消費するエネルギー的に負荷の大きいプロセスである。多くの代謝経路は独立ではなく、ネットワークとしてお互いに影響を与え合うことから、エネルギー的に有利なチオ硫酸イオンを硫黄源とした際には硫黄同化経路だけではなく、他の代謝経路や細胞機能にも影響を与えるものと考えられる。

以上の知見をもとに本章では、チオ硫酸イオンの酵母の生理特性や発酵能に及ぼす影響を解析することを目的とした。

## 2-2. 材料と方法

### 2-2-1. 使用菌株

野生型酵母として BY4741+またはプラスミドを導入し栄養要求性を相補した  $\Delta his3$  株を使用した。詳細は1章に準ずる。

### 2-2-2. プラスミド

$\Delta his3$  株を使用する際には、栄養要求性を相補するため pRS415-CgHIS3-MET17 および pRS416 を用いた。形質転換は酢酸リチウム法 (Gietz and Schiestl, 2007) で行った。

### 2-2-3. 培地組成および生育条件

1章と同様に硫黄源を含まない形に改変を加えた SD 最少培地を用いた。培養に使用する際には硫酸ナトリウムまたはチオ硫酸ナトリウムを単一の硫黄源として加え、使用した。培地組成については1章に準ずる。本章においても1章同様に、硫酸ナトリウムを単一の硫黄源とした培地を硫酸塩培地、チオ硫酸ナトリウムを単一の硫黄源とした培地をチオ硫酸塩培地と表記する。硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウムおよびチオ硫酸ナトリウムの濃度は特に表記がない場合は終濃度 1 mM とした。

酵母の培養は 30°C で行い、生育は 600 nm の吸光度 ( $OD_{600}$ ) により測定した。

### 2-2-4. 細胞内代謝産物の抽出と CE-MS 解析

慶應義塾大学医学部の末松教授の研究室で、キャピラリー電気泳動質量分析法 (CE-MS) を用いて測定して頂いた。測定手法は、既報の方法に従った (Sugiura et al., 2014)。概要を以下に示す。

フィルター回収した菌体に2-メルホリノエタンスルホン酸 (MES、MS定量時の内部標準) を含むメタノールを加え、4°C でガラスビーズ破碎を行うことで細胞内代謝産物の抽出を行った。さらに抽出液を遠心分離し、上清を乾固および濃縮を行い、これをサンプルとして CE-MS 解析に供した。これによって得られたシグナル値をサンプル中のタンパク質量によって標準化した。目的ごとのサンプル回収法については以下に示す。

#### 2-2-4-1. 細胞内の NADPH 含量の測定

硫酸塩培地で定常期になるまで前培養を行った酵母菌体をよく洗浄し、 $OD_{660} = 0.1$ となるように硫酸塩培地またはチオ硫酸培地に植菌、 $30^{\circ}\text{C}$ で培養を行った。各時点において $OD_{660} = 20$ の菌体をフィルターろ過で集菌し、5% (w/v) マンニトールによる2回の洗浄を行った。フィルターは液体窒素で凍結させ、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### 2-2-4-2. $^{13}\text{C}$ グルコースを用いた炭素代謝フラックス解析

$^{13}\text{C}$ 標識されたグルコース (D-Glucose- $^{13}\text{C}_6$ , SIGMA-Aldrich) を使用することで代謝フラックス解析を行った。硫酸塩培地で定常期になるまで前培養を行った酵母菌体をよく洗浄し、硫酸塩培地またはチオ硫酸塩培地に $OD_{660} = 0.1$ で植菌し、対数増殖期後期まで $30^{\circ}\text{C}$ で培養を行った。その後、遠心分離によって集菌し、それぞれ $^{13}\text{C}$ 標識グルコースを含む硫酸塩培地またはチオ硫酸塩培地に交換し、 $30^{\circ}\text{C}$ で振とう培養を行った。30分後に、 $OD_{660} = 10$ の細胞をフィルターろ過で集菌し、5% (w/v) マンニトールによる2回の洗浄を行った。フィルターは液体窒素で凍結させ、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### 2-2-5. エタノール生産能の評価

エタノール発酵能の検討を行うために、培地中のグルコース濃度とエタノール濃度の測定を行った。酵母菌株を硫酸塩培地において、定常期になるまで前培養を行った。硫酸塩培地で定常期になるまで前培養を行った酵母をよく洗浄し、硫酸塩培地またはチオ硫酸塩培地に $OD_{660} = 0.1$ となるよう植菌、 $30^{\circ}\text{C}$ で振とう培養を行った。培養開始から、経時的に培養液を回収し、遠心分離によって菌体を取り除いた上清をサンプルとした。サンプルは $-20^{\circ}\text{C}$ で保存し、グルコース濃度およびエタノール濃度の測定に用いた。

#### 2-2-5-1. 培地中グルコース濃度の測定

グルコースキット グルコース CII-テスト (Wako) を使用した。適当に希釈したサンプルと発色試薬をマイクロチューブ中で混ぜ、 $37^{\circ}\text{C}$ の恒温槽で5分間加温した。加温後、分光光度計において波長 505 nm で測定を行った。グルコース標準溶液から検量線を作成し、吸光度からグルコース濃度を算出した。

#### 2-2-5-2 .培地中エタノール濃度の測定

ガスクロマトグラフィーによって培養液中のエタノール濃度を測定した。硫酸塩培地またはチオ硫酸塩培地において培養を行った酵母培養液から遠心分離で菌体を除いたものをサンプルとして使用し、内部標準には 1-プロパノールを用いた。1%、2%、3%のエタノールを標準溶液として検量線を作成し、クロマトグラムからエタノール濃度を求めた。

バイアル瓶で 0.6% 1-プロパノールとサンプルを混ぜ、これを 50°C のウォーターバスで 30 分加温した。加温後、バイアル瓶にシリンジを刺し、気化したガスを採取し、ガスクロマトグラフィーのインジェクターに素早く注入して、測定を開始した。

ガスクロマトグラフィーは、GC-14B（島津製作所）、カラムは DB-WAX; 30 m × 0.25 mm（Agilent）を使用し、以下の設定で測定を行った。

各ガスの二次圧 水素ガス: 0.3 MPa, ヘリウムガス: 0.45 MPa

設定温度 カラム: 80°C, インジェクター: 200°C, 検出器: 250°C

#### 2-2-6. ファーモグラフ

硫酸塩培地前培養を行った酵母菌体をよく洗浄し、硫酸塩培地またはチオ硫酸塩培地に  $OD_{600} = 0.05$  となるよう加えて 30°C で振とう培養し、ファーモグラフ (ATTO) を用いて発酵に伴い発生する二酸化炭素量を測定した。

#### 2-2-7. ストレス感受性の試験

酵母菌株を硫酸塩培地において定常期になるまで前培養を行った。前培養液を  $OD_{600} = 0.05$  となるように硫酸塩培地へ酵母を植菌し、対数増殖期 ( $OD_{600} = 0.4$ ) まで生育させた。その後、滅菌水で酵母をよく洗浄し、 $OD_{600} = 0.4$  から 10 倍ずつ段階希釈をした細胞懸濁液を 4 $\mu$ l ずつ任意の培地へとスポットした。

#### 2-2-8. 硫化水素の検出

酵母の液体培養時に気相に産生される硫化水素 ( $H_2S$ ) の測定法として、 $H_2S$  を 5 ppm で検出可能な酢酸鉛試験紙法を用いた。前培養を行った酵母を硫黄源を含まない SD 培地でよく洗浄し、硫酸塩培地またはチオ硫酸塩培地に  $OD_{600} = 0.05$  となるよう植菌した。このとき、約 3 cm の酢酸鉛試験紙 (Whatman, indicator lead acetate, Sigma-Aldrich) を試験管の内部に設置した。試験紙は  $H_2S$  が発生す

ると、以下の反応により硫化鉛 (**PbS**) が生成し、呈色する。培養開始後、各点において試験紙を回収し、硫化水素が発生する時間と程度を調べた。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. チオ硫酸イオン同化時には細胞内の NADPH 量が上昇する

最初に、チオ硫酸イオンを硫黄源とした際には細胞内の還元力を節約できるという考えに基づいて、CE-MS を用いて細胞内の還元力を測定した。硫酸塩培地またはチオ硫酸塩培地で生育させた酵母を対数増殖期から経時的に回収し、細胞内の代謝産物の解析を行った (図 20) (Funahashi et al., 2015)。その結果、チオ硫酸塩培地においては対数増殖期中期である培養 16.5 時間後および 18.5 時間後での NADPH 量の上昇が見られた。このことから、チオ硫酸塩培地で生育させた酵母は硫酸塩培地で生育させた酵母と比較して、代謝フローに変化が起きていると考えられた。

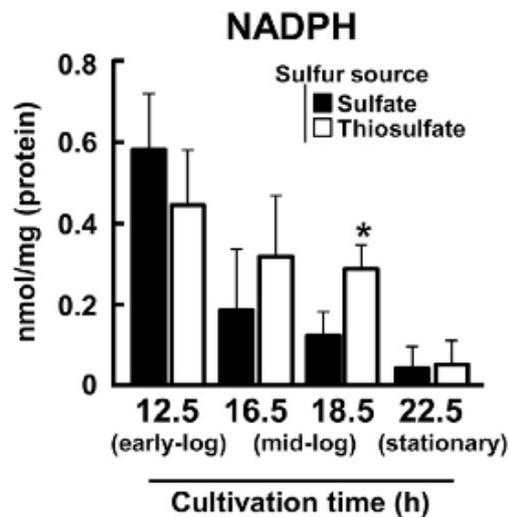


図 20. 硫酸イオンまたはチオ硫酸イオン単一硫黄源下における酵母の NADPH 量の変化

野生型株 ( $\Delta his3$ ) を硫酸塩培地で前培養を行った後によく洗浄し、硫酸塩培地またはチオ硫酸塩培地に  $OD_{600} = 0.1$  で植菌し、 $30^{\circ}\text{C}$  で振とう培養を行った。経時的にフィルター回収した菌体を CE-MS による解析に供した。NADPH 量は細胞抽出物のタンパク質濃度をもとに標準化を行った。n=3, \*:  $p < 0.05$

### 2-3-2. チオ硫酸イオン同化時にはペントースリン酸経路のフローが低下し、解糖系のフローが亢進する

代謝フローの変化が起こるかどうかを検討するため、安定同位体の  $^{13}\text{C}$  で標識されたグルコースを用いて代謝フラックス解析を行った。酵母を硫酸塩培地またはチオ硫酸塩培地で対数増殖期まで生育させた後、 $^{13}\text{C}$  でラベルされたグルコースを含む硫酸塩培地およびチオ硫酸培地にそれぞれ交換した。30 分間の培養を行った後に、細胞を回収し、解析を行った (図 21) (Funahashi et al., 2015)。

興味深いことに、チオ硫酸塩培地で生育させた酵母ではペントースリン酸経路の代謝産物であるリブローズ-5-リン酸 (Ru5P)、セドヘプツロース-7-リン酸 (S7P) に低下傾向が見られた。NADPH の主要な供給源であるペントースリン酸経路のフローが低下することは、予想と逆の結果であった。一方、解糖系の代謝産物であるフルクトース-6-リン酸 (F6P)、3-ホスホグリセリン酸 (3PG) はやや増加傾向にあった。また、TCA 回路の代謝産物であるクエン酸は減少傾向であった。

これらの結果から、チオ硫酸塩培地で生育している酵母ではペントースリン酸経路へのフローが減少することで解糖系のフローが亢進するという代謝変化が起こっている可能性が考えられた。また、酵母において解糖系の最終産物であるピルビン酸はエタノールに変換されることから、エタノール発酵能の向上が予想された。

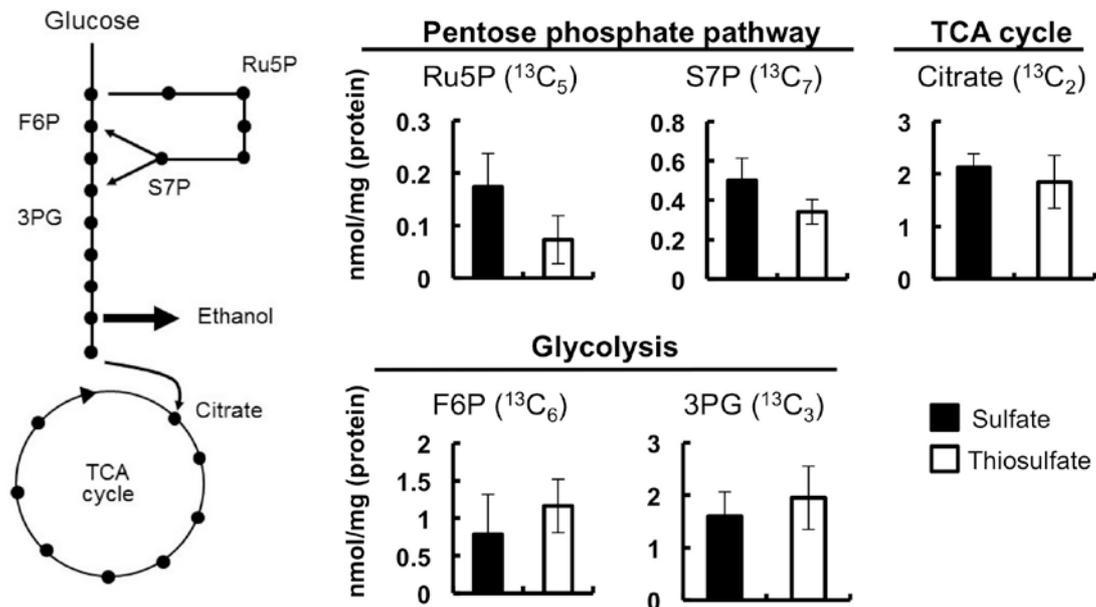


図 21. 硫酸イオンまたはチオ硫酸イオン単一硫黄源下における酵母の代謝フローの変化

野生型株 ( $\Delta his3$ ) を硫酸塩培地で前培養を行った後によく洗浄し、硫酸塩培地またはチオ硫酸塩培地に  $OD_{600} = 0.1$  で植菌し、 $30^\circ\text{C}$  で振とう培養を行った。経時的に次にフィルター回収した菌体を CE-MS による解析に供した。各代謝産物量は細胞抽出物のタンパク質濃度をもとに標準化を行った。n=3。

### 2-3-3. チオ硫酸イオン同化時にはエタノール発酵速度が向上する

チオ硫酸イオン同化時の代謝フローの変化がエタノール発酵能に影響するかどうかを検討するため、培地中のエタノール濃度を測定した。酵母を硫酸塩培地またはチオ硫酸塩培地で生育させながら、経時的に培地を回収し、培地中のグルコースおよびエタノール量の解析を行った（図 22）。その結果、チオ硫酸塩培地においてはグルコースの消費量およびエタノール生産量がともに上昇していた。また、細胞あたりでのエタノール生産量を検討するために、エタノール生産量を OD<sub>600</sub> で標準化を行ってもチオ硫酸塩培地におけるエタノール生産量は上昇していた。これらのことからチオ硫酸培地発では酵速度が向上することが示唆された。

エタノール発酵においては 1 分子のグルコースから 2 分子のエタノールと 2 分子の二酸化炭素が発生する。より詳細な解析を行うため、時間ごとの二酸化炭素排出量から発酵速度を測定可能な測定可能なファーモグラフを用いて、解析を行った（図 23）。その結果、チオ硫酸塩培地においては硫酸塩培地に比べて培養 9 時間から 15 時間までは単位時間あたりの二酸化炭素排出量が有意に増加していた。一方で、発酵速度は上昇するものの、最終的に生成する二酸化炭素量では硫酸塩培地、チオ硫酸塩培地ともに差は見られなかった。以上の結果から、チオ硫酸イオンを硫黄源とした際にはエタノールの発酵速度が向上することが明らかになった。

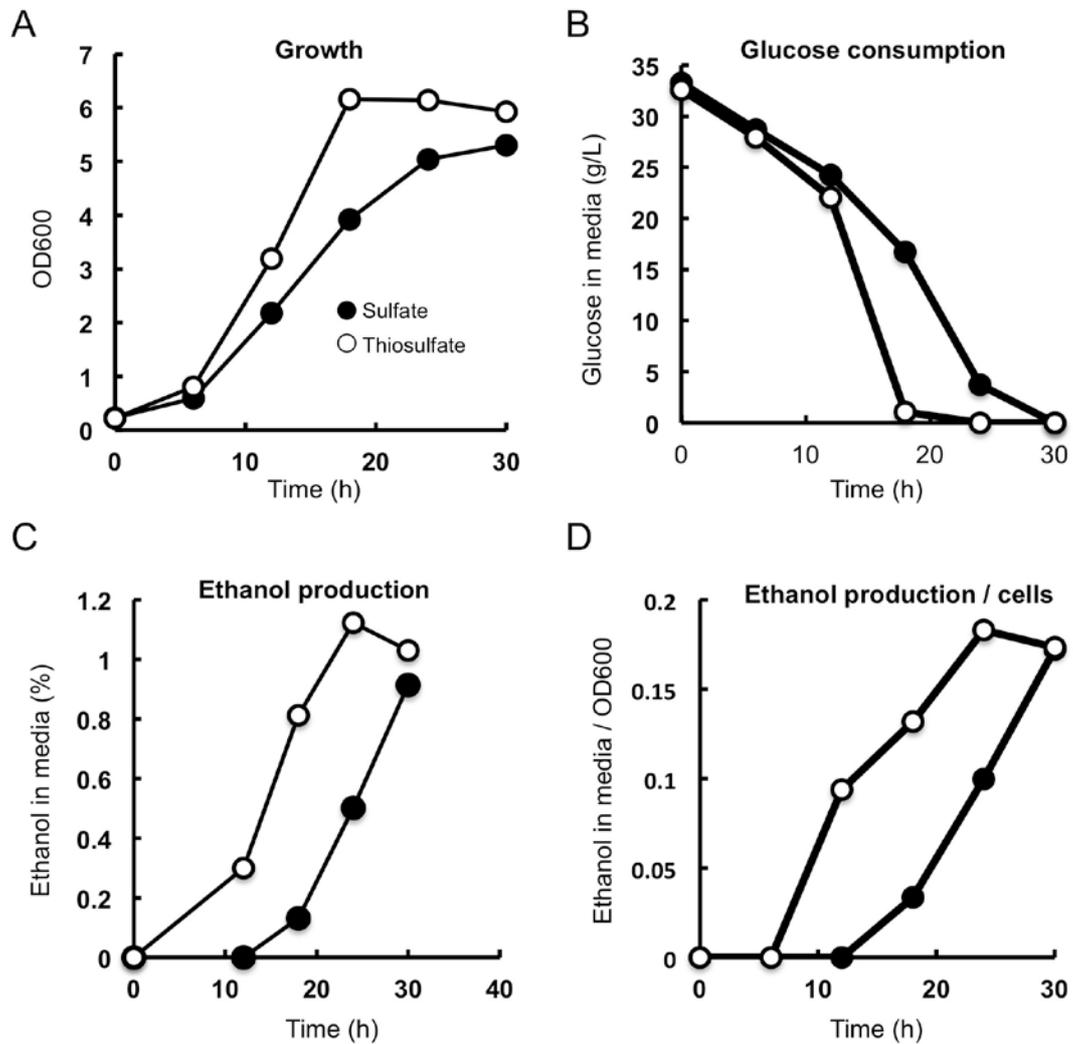


図 22. 硫酸イオンまたはチオ硫酸イオン単一硫黄源下における酵母のエタノール生産能の評価 (当研究室、舟橋未発表データを再解析)。

野生型株 (BY4741+) を硫酸塩培地で前培養を行った後によく洗浄し、硫酸塩培地およびチオ硫酸塩培地に  $OD_{600} = 0.1$  で植菌し、 $30^{\circ}\text{C}$ 、振とう条件で以下の解析を行った。A: 生育, B: 培地中グルコース量の変化, C: 培地中のエタノールの変化, D:  $OD_{600}$  あたりのエタノール生産量

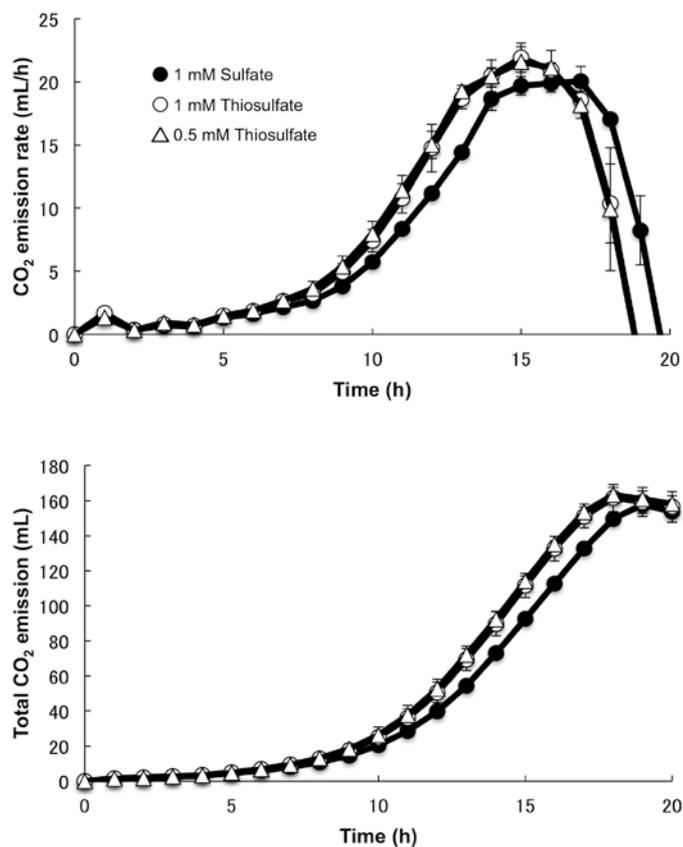


図 23. 硫酸イオンまたはチオ硫酸イオン単一硫黄源下における酵母の発酵試験

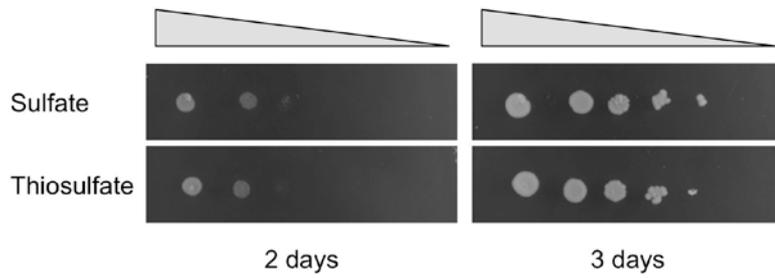
野生型株 (BY4741+) を硫酸塩培地で前培養を行った後によく洗浄し、硫酸塩培地およびチオ硫酸塩培地に  $OD_{600} = 0.05$  で植菌し、 $30^{\circ}\text{C}$ 、振とう条件での二酸化炭素の発生量をファーマグラフにて測定した。

#### 2-3-4. チオ硫酸イオンを硫黄源とした際にはストレス耐性が向上する

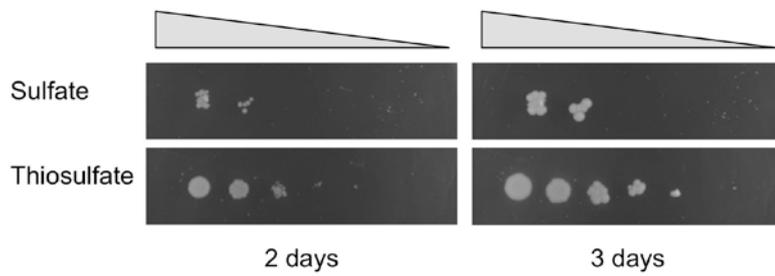
NADPH は酸化型グルタチオンを還元型グルタチオンに再生させるために必要であることから、細胞のストレス耐性にも重要な役割を果たしている。したがって、細胞中の NADPH が増加するチオ硫酸イオンを硫黄源とした際には硫酸イオンを硫黄源とした際に比べて細胞のストレス耐性が向上する可能性が考えられる。

そこで、硫酸塩培地およびチオ硫酸培地上で生育している酵母について高温、浸透圧、エタノール、過酸化水素など様々なストレス処理を行い、生育を観察した。その結果、興味深いことにチオ硫酸培地では硫酸培地に比べて過酸化水素に対しては明確に (図 24)、エタノールストレスに関しては若干の耐性の向上が見られた (図 25)。

### Minimal medium



### +0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



### +1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

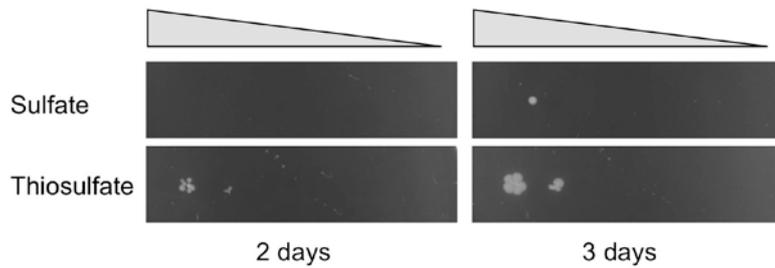
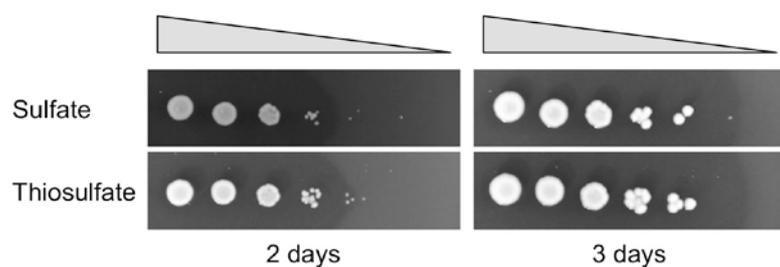


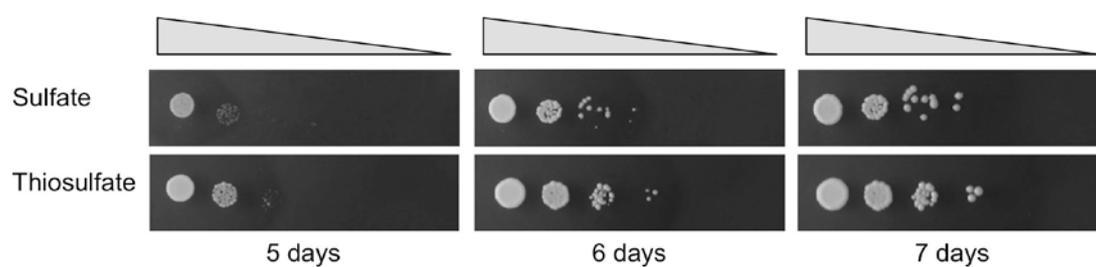
図 24. 硫酸イオンまたはチオ硫酸イオン単一硫黄源下における過酸化水素ストレス感受性試験

野生型株 (BY4741+) を硫酸塩培地で前培養を行った後に、硫酸塩培地 OD<sub>600</sub> = 0.05 で植菌し対数増殖期まで生育させた。これをよく洗浄し、段階希釈した後に、過酸化水素を含む硫酸塩培地およびチオ硫酸塩培地にスポットし、30°Cで培養を行った。

### Minimal medium



### +10% Ethanol



### +12% Ethanol

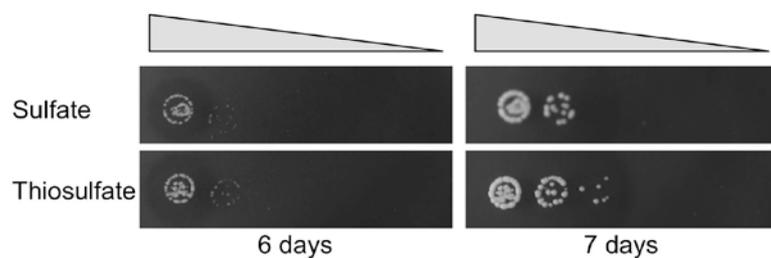


図 25. 硫酸イオンまたはチオ硫酸イオン単一硫黄源下におけるエタノールストレス感受性試験

野生型株 (BY4741+) を硫酸塩培地で前培養を行った後に、硫酸塩培地  $OD_{600} = 0.05$  で植菌し対数増殖期まで生育させた。これをよく洗浄し、段階希釈した後に、エタノールを含む硫酸塩培地およびチオ硫酸塩培地にスポットし、 $30^{\circ}\text{C}$  で培養を行った。

### 2-3-5. チオ硫酸イオンを硫黄源とした際にグルコースが枯渇すると硫化水素が生成する

これまでの実験の中で、チオ硫酸培地で酵母を培養すると培養後期に卵の腐った様な匂いが発生することを経験しており、この際に硫化水素が生成しているのではないかと考えた。そこで、硫化水素を検出するために、酢酸鉛試験を用いた解析を行った。酢酸鉛は、硫化水素と反応すると黒色沈殿を生じる。硫化水素の検出を試みるために試験管に酢酸鉛試験紙を取り付け、硫酸塩培地およびチオ硫酸塩培地で酵母を生育させた。その結果、硫酸塩培地では硫化水素はほとんど検出されないのに対し、チオ硫酸塩培地では培養 21 時間後から硫化水素が検出された (図 26)。

生育曲線から判断すると、硫化水素の生成は、細胞が定常期へ移行し始める時期であった。このことから、定常期への移行に重要な要素として、グルコースの枯渇が硫化水素の発生と関連している可能性を考えた。これを検証するために比色法を用いて培地中のグルコース濃度を測定した。その結果、培地中のグルコースが枯渇するタイミングで硫化水素が生成していることが明らかになった。したがって、酵母の硫黄代謝はグルコースの枯渇、すなわち炭素代謝の変化に影響を受けていることが示唆された。

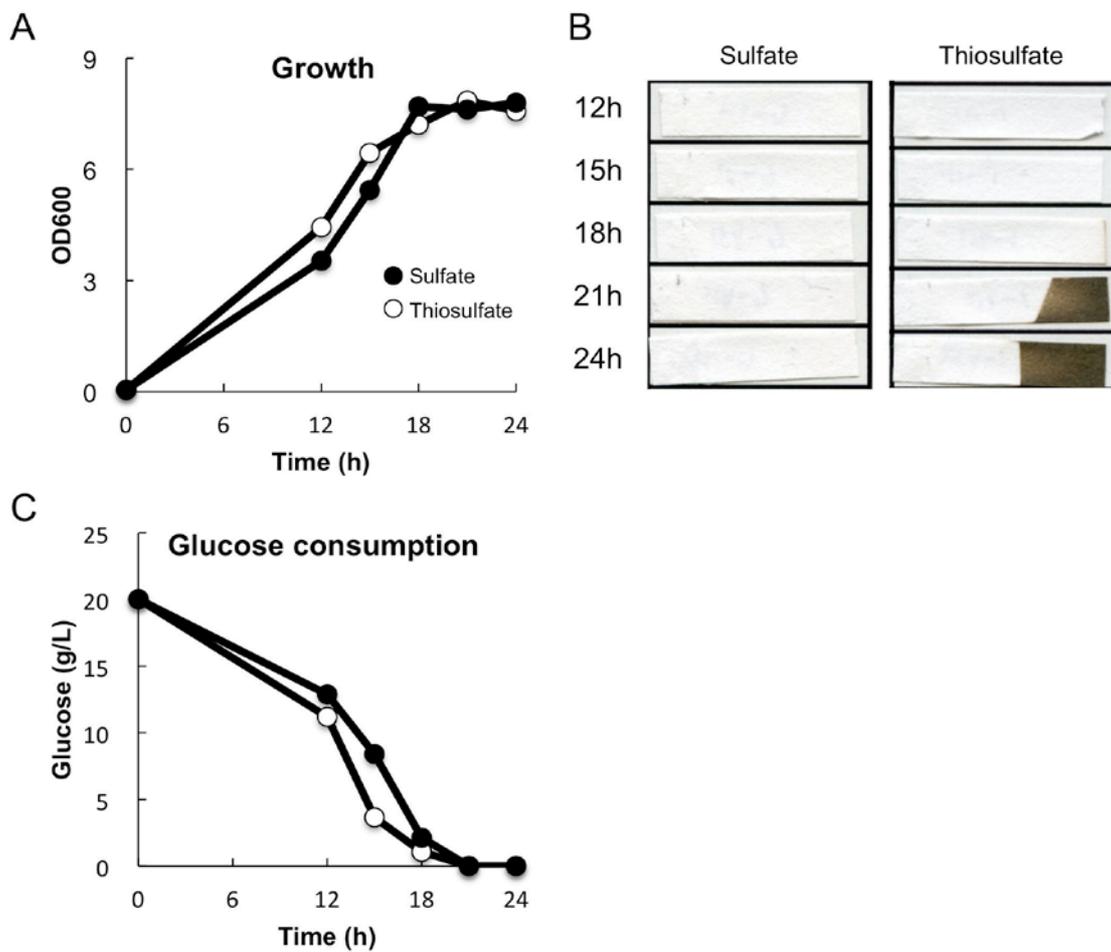


図 26. 硫酸イオンまたはチオ硫酸イオン単一硫黄源下で生育させた酵母からの硫化水素の検出

野生型株 (BY4741+) を硫酸塩培地で前培養を行った後によく洗浄し、硫酸塩培地またはチオ硫酸塩培地に  $OD_{600} = 0.05$  で植菌し、 $30^{\circ}\text{C}$ 、振とう条件で以下の解析を行った。A: 生育 B: 酢酸鉛試験紙による硫化水素の検出 C: 培地中グルコース量の変化

## 2-4. 考察

本章では、チオ硫酸イオンを硫黄源に用いて、酵母細胞内で起こる生理的変化について解析を行った。チオ硫酸塩培地では硫酸塩培地に比べて代謝フローの変化が起こること、エタノールの生産とエタノールに対する耐性が向上すること、さらにグルコース枯渇時に硫化水素が生成することを見出した(図 27)。

### 2-4-1. 代謝フローの変化

今回の解析結果から、チオ硫酸イオンを硫黄源とした際には、細胞内の NADPH 量が上昇する傾向にあり、ペントースリン酸経路のフローが低下していた(図 20, 21)。これは、チオ硫酸イオンの同化経路では必要な NADPH が少ないことを裏付けていると考えられた。

加えて、ペントースリン酸経路の初発酵素であるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする *ZWF1* はその遺伝子破壊株が生育に有機性の硫黄源を必要とすることが知られている(Thomas et al., 1991)。一方で、Slekar らの研究から、硫黄源をチオ硫酸イオンにした際には、メチオニンを添加せずとも生育できるという結果も示されている(Slekar et al., 1996)。Slekar らはこれを細胞内 NADPH レベルの低下によるものであると考察している。このことは、1 章で明らかにしたチオ硫酸イオンの同化経路のモデルおよび本章で明らかにした代謝変化の結果とよく一致する。

### 2-4-2. ストレス耐性のメカニズム

チオ硫酸イオンを硫黄源とした際には、細胞の過酸化水素およびエタノールに対する耐性が向上することが明らかになった(図 24, 25)。

注意すべき点として、過酸化水素に対してはチオ硫酸イオンが還元剤として働き、過酸化水素を消去する可能性が考えられる。一方で、エタノールに対してチオ硫酸イオンが直接作用することは考えづらい。

また、高濃度のエタノールストレスは活性酸素種(ROS)による酸化ストレスを引き起こすことが知られている(Pérez-Gallardo et al., 2013 ; Takagi et al., 2016)。このことを過酸化水素処理の知見と合わせて考えるのであれば、チオ硫酸イオンを硫黄源にした際には、代謝変化によって増加した NADPH およびグ

グルタチオンによって (図 7, 20)、エタノールストレスに由来する ROS を消去しているのではないかと考えられた。

一方で、これが代謝の変化によるものなのか、培地中にチオ硫酸イオン自身によるものか、現時点で結論を下すのは難しい。これを明らかにするためには、チオ硫酸イオンのトランスポーターを同定し、チオ硫酸イオンを細胞内に取り込めない変異株を用いた解析が望ましい。

### 2-4-3. エタノール発酵生産速度の向上とその発酵産業への応用性

チオ硫酸塩培地で生育させた場合、エタノール生産速度および二酸化炭素排出速度の向上がみられた (図 22, 図 23)。この要因としては、主に、以下の2つが考えられた。1) 細胞の増殖速度、2) 細胞内の代謝フローの変化。これを検討するために、OD<sub>600</sub>あたり (細胞あたり) のエタノール生産量を計算した場合 (図 22) でも違いが見られることから、細胞の増殖速度が原因ではなく、代謝フローの変化が発酵速度の上昇に寄与していると考えられる。加えて、硫酸イオンと硫黄原子の量を揃える目的で培地中のチオ硫酸イオンの濃度を半分にしたところ、チオ硫酸培地における二酸化炭素排出速度の向上が認められた (図 23)。よって、発酵速度の上昇は硫黄原子の量に起因するのではなく、チオ硫酸イオンを硫黄源として利用することに起因するものと考えられた。

これらについて発酵産業の観点から考察する。酒類をはじめ、産業的にエタノールの発酵生産を行う場合の多くでは、有機性の化合物を多く含んだ環境で生産を行う。このことから、無機性の硫黄源であるチオ硫酸イオンを用いてエタノールの発酵速度を向上させることを産業へ直接応用することは難しいかもしれない。

一方で、含硫黄化合物の発酵生産については応用できる可能性がある。酵母を用いて産業的に生産されている含硫黄化合物としてはグルタチオンが挙げられる。グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチドであり、産業的には医薬品原料やサプリメントとして利用される。

発酵生産環境下では、目的物の生産性を向上させるために前駆体を添加することがあるが、グルタチオンの前駆体であり、含硫アミノ酸であるシステインの添加は、そのコストおよび細胞毒性から敬遠されている。これを解決する手法として硫酸イオンの同化経路およびグルタチオン生合成系の強化を行う方法が提唱され、グルタチオンの高生産につながる事が報告されている(Hara et al.,

2012)。本研究においても、硫黄源をチオ硫酸イオンとすることで、細胞内のグルタチオンが約 40% 増加することを示した (図 7)。これらのことから、グルタチオンをはじめとした含硫化合物の発酵生産においてチオ硫酸イオンの利用やその同化経路の強化はとても興味深いと言える。

#### 2-4-4. 硫化水素の生成

硫化水素は有毒なガスであり、呼吸鎖を阻害することで細胞機能に傷害を与える。酵母における硫化水素の発生はワインやビールといった酒類醸造の分野で進んでいる。これは硫化水素が微量であってもオフフレーバーの原因となることに起因しており、これまでの研究から窒素飢餓時に生成することが明らかになっている (Jiranek et al., 1995)。

一方、本研究ではグルコース枯渇、すなわち炭素飢餓条件下かつチオ硫酸イオンを硫黄源とした場合にのみ硫化水素生成が見られた。これが、窒素飢餓時の硫化水素生成と同一のメカニズムであるかどうかは興味深い。特に栄養シグナルのマスターレギュレーターと言われる Target of Rapamycin (TOR) 経路との関連性については非常に興味を持たれる。

また、硫化水素はチオ硫酸イオンを硫黄源とした際にのみ生成する。チオ硫酸イオンには硫酸イオンに比べて硫黄原子が 1 つ多く存在することに起因する可能性が考えられ、環境中にチオ硫酸イオンが存在することのシグナル分子として機能する可能性がある。

1 章で示したモデル (図 20) では、ロダネーゼにチャージされた硫黄原子が硫化物イオンに変換されると考えていたが、硫化物イオンと硫化水素は化学的に等価であることから、この硫黄原子が硫化水素へと変換されているのかも知れない。この可能性については、ロダネーゼとグルタレドキシンの関係により詳細に解析することで検証できると考えられる。

また、酵母においては前述の TOR 経路や Protein kinase A を介したシグナル経路など、グルコースを感知する様々な機構が知られており (Conrad et al., 2014)、これらと硫化水素に注目する事で炭素代謝と硫黄代謝の関連性を追及することができると考えられる。

他の結果が示すように、チオ硫酸イオンを硫黄源とすることは発酵能の向上 (図 23, 24) やストレス耐性 (図 25, 26) などの有用な効果を生む一方で、有毒かつオフフレーバーの原因となる硫化水素の生成につながる。酵母においてチ

オ硫酸イオンの産業応用を検討するのであれば、十分な対策が必要である。このためにも詳細な硫化水素の生成メカニズムの解析が望まれる。

一方、硫化水素は一酸化窒素や一酸化炭素と同様のガス状シグナル分子であることが近年報告されており、標的タンパク質のシステイン残基を *S*-スルフヒドリル化することが知られている。*S*-スルフヒドリル化は一酸化窒素による翻訳後修飾である *S*-ニトロソ化と競合的であると考えられており、これによってタンパク質の機能、例えば酵素活性や転写活性など制御されていると考えられている (Mustafa et al., 2009 ; Sen et al., 2012 ; Paul and Snyder, 2012)。

興味深いことに、チオ硫酸イオンの同化経路で主要な役割を担うロダネーゼである Rdl1 および Rdl2 はともに *S*-ニトロソ化を受け、酵素が低下する事が明らかになっている (Foster et al., 2009)。このことから、酵母においてグルコース枯渇時に発生する硫化水素は、炭素と硫黄、そして窒素という細胞における主要な 3 元素のクロストークを明らかにする重要な分子であるかも知れない。

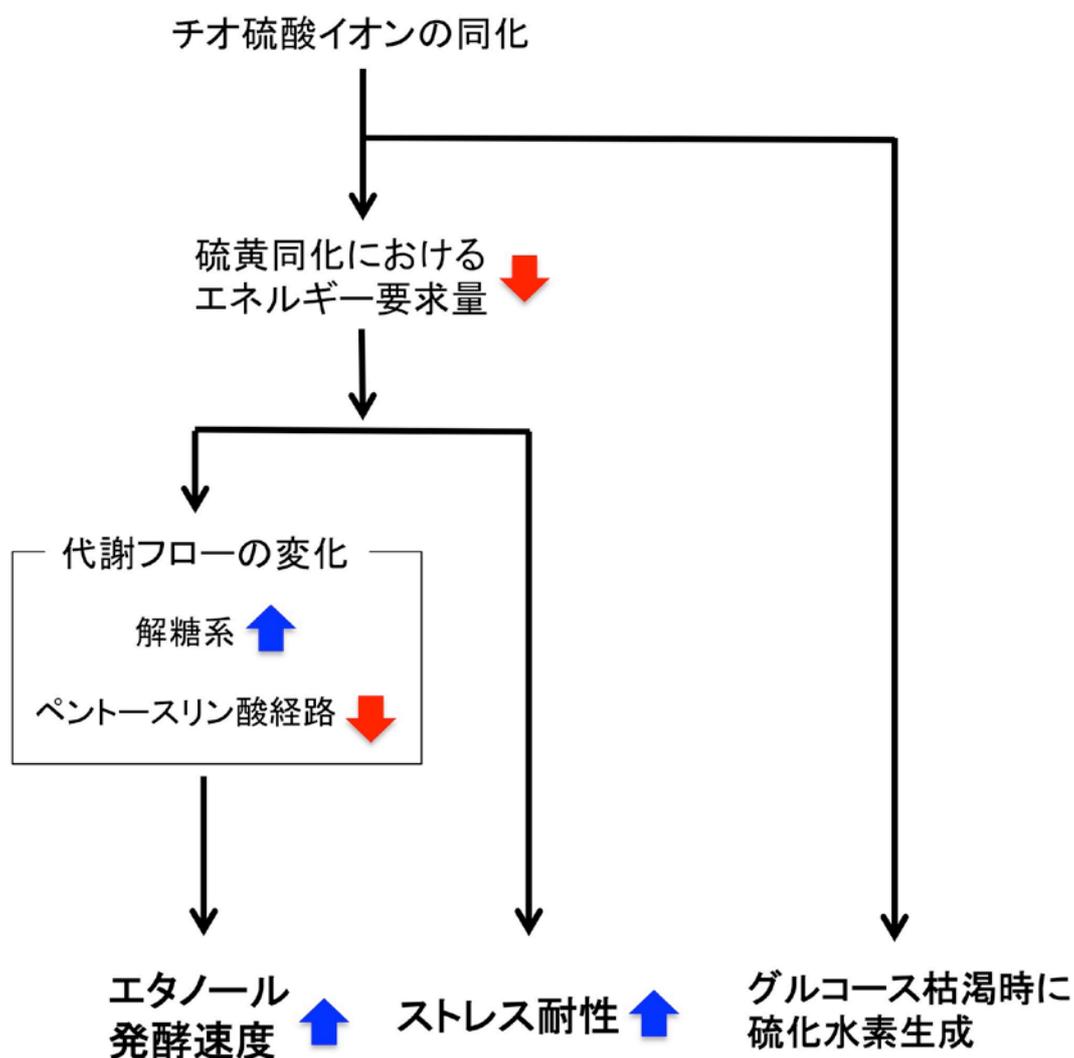


図 27. チオ硫酸イオンを硫黄源として利用した際の細胞機能への影響モデル

硫黄源としてチオ硫酸イオンを利用することで、硫黄同化に必要なエネルギーが節約される。これが、代謝フローの変化を誘導する。また、細胞にとって必要なエネルギー量が少ないことはストレス応答により多くのエネルギーを供給できることからストレス耐性が向上する。加えて、チオ硫酸イオンが環境中に存在する際にグルコースが枯渇するとシグナル分子として働く可能性のある硫化水素が生成する。

## 総括

- 酵母においてチオ硫酸イオンは好ましい硫黄源であり、硫黄源を硫酸イオンとした際と比較して生育の促進や硫黄関連代謝産物の増加が起こることを明らかにした。
- 酵母におけるチオ硫酸イオン同化経路として、ロダナーゼを介した経路を見出し、ロダナーゼ **Rdl1** および **Rdl2** が中心的な役割を担う事を明らかにした
- チオ硫酸イオン同化経路においてロダナーゼとグルタレドキシシンが相互作用している可能性を示した。
- チオ硫酸イオン同化経路では、硫酸イオン同化経路と比較して硫黄同化に必要なATPおよびNADPHが少なく、このことが炭素代謝のフローに影響を与えることが示唆された。
- チオ硫酸イオンを硫黄源とした際の代謝フローの変化は、細胞のストレス耐性やエタノール生産速度を向上させることが示唆された。
- チオ硫酸イオンを硫黄源とした際には、グルコース枯渇時に硫化水素が発生することが明らかになり、硫黄と炭素のクロストークの存在が示唆された。

## 謝辞

本研究の遂行ならびに論文の作製においてご指導下さいまし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 ストレス微生物科学研究室の高木博史教授に厚くお礼申し上げます。高木教授には多くのチャンスをいただき、心より御礼申し上げます。

また、実験面で直接ご指導頂いた同研究室の大津厳生助教（現・筑波大学国際産学連携本部 准教授）からは多くの事を学ばせていただきました。厚く御礼申し上げます。

そして、同研究室で様々なご協力を頂いた渡辺大輔助教に厚く御礼申し上げます。

さらに、LC-MS/MSによるサルファーインデックス構築にあたり、ご協力いただいた慶應義塾大学医学部の末松誠教授、杉浦悠毅講師、島津製作所の中西豪博士にも厚く御礼申し上げます。杉浦講師には細胞内還元力の測定および代謝フラックス解析でもお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

また、大腸菌での異種発現系に関しては北海道大学工学部の大利徹教授、佐藤康治助教にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

そして、学位審査において様々なご指摘、ご助言を頂いた本学のシステム微生物学研究室の森浩禎教授、原核生物分子遺伝学研究室の真木寿治教授に厚く御礼申し上げます。森浩禎教授には大腸菌の菌株の提供に関してもお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

さらに、同研究室で様々なご助言やご協力を頂いた河野祐介博士（現・筑波大学国際産学連携本部 博士研究員）、秦野智行博士（現・ウォーリック大学 博士研究員）、立橋祐樹博士（現・東京工業大学 博士研究員）、沼本穂博士に御礼申し上げます。特に秦野博士、沼本博士とは毎日の様にディスカッションさせていただき、大変感謝しています。

そしてOB, OGを始め、同研究室の皆様に御礼申し上げます。

最後に、これまで心身ともに支え続けてくれた友人達に心から感謝の意を表します。本当にありがとうございました。

## 参考文献

仲谷豪（平成 25 年度）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. 本学博士論文（1181027）

城山真恵加（平成 26 年度）大腸菌における新規チオ硫酸イオン輸送体 YeeED の機能解析. 本学修士論文（1371041）

舟橋依里（平成 26 年度）酵母における新規チオ硫酸同化経路の発見とエタノール生産への応用. 本学修士論文（1371071）

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2, 2006.0008.

Boer, V.M., De Winde, J.H., Pronk, J.T., and Piper, M.D.W. (2003). The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur. *J. Biol. Chem.* 278, 3265–3274.

Bordo, D., and Bork, P. (2002). The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Rep.* 3, 741–746.

Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115–132.

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.

Cherest, H., Davidian, J.C., Thomas, D., Benes, V., Ansorge, W., and Surdin-Kerjan, Y. (1997). Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *145*, 627–635.

Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H.N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M., and Thevelein, J.M. (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* *38*, 254–299.

Denk, D., and Böck, A. (1987). L-cysteine biosynthesis in *Escherichia coli*: nucleotide sequence and expression of the serine acetyltransferase (cysE) gene from the wild-type and a cysteine-excreting mutant. *J. Gen. Microbiol.* *133*, 515–525.

Donadio, S., Shafiee, A., and Hutchinson, C.R. (1990). Disruption of a rhodaneselike gene results in cysteine auxotrophy in *Saccharopolyspora erythraea*. *J. Bacteriol.* *172*, 350–360.

Foster, M.W., Forrester, M.T., and Stamler, J.S. (2009). A protein microarray-based analysis of S-nitrosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 18948–18953.

Funahashi, E., Saiki, K., Honda, K., Sugiura, Y., Kawano, Y., Ohtsu, I., Watanabe, D., Wakabayashi, Y., Abe, T., Nakanishi, T., et al. (2015). Finding of thiosulfate pathway for synthesis of organic sulfur compounds in *Saccharomyces cerevisiae* and improvement of ethanol production. *J. Biosci. Bioeng.* *120*, 666–669.

Furukawa, K., Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). A protein conjugation system in yeast with homology to biosynthetic enzyme reaction of prokaryotes. *J. Biol. Chem.* *275*, 7462–7465.

Gietz, R.D., and Schiestl, R.H. (2007). Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* *2*, 35–37.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., et al. (1996). Life with 6000 genes. *Science*

(80-). 274, 546, 563–567.

Grabowska, D., and Chelstowska, A. (2003). The ALD6 gene product is indispensable for providing NADPH in yeast cells lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *J. Biol. Chem.* 278, 13984–13988.

Hara, K.Y., Kiriya, K., Inagaki, A., Nakayama, H., and Kondo, A. (2012). Improvement of glutathione production by metabolic engineering the sulfate assimilation pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 1313–1319.

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., and Kredich, N.M. (1994). Stoichiometry of binding of CysB to the *cysJH*, *cysK*, and *cysP* promoter regions of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 176, 3673–3682.

Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., et al. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, 947–962.

Jiranek, V., Langridge, P., and Henschke, P.A. (1995). Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 461–467.

Kai, Y., Kashiwagi, T., Ishikawa, K., Ziyatdinov, M.K., Redkina, E.I., Kiriukhin, M.Y., Gusyatin, M.M., Kobayashi, S., Takagi, H., and Suzuki, E. (2006). Engineering of *Escherichia coli* L-serine O-acetyltransferase on the basis of crystal structure: desensitization to feedback inhibition by L-cysteine. *Protein Eng. Des. Sel.* 19, 163–

167.

Kawano, Y., Ohtsu, I., Tamakoshi, A., Shiroyama, M., Tsuruoka, A., Saiki, K., Takumi, K., Nonaka, G., Nakanishi, T., Hishiki, T., et al. (2015). Involvement of the *yciW* gene in l-cysteine and l-methionine metabolism in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* *119*, 310–313.

Kredich, N.M. (1992). The molecular basis for positive regulation of *cys* promoters in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *6*, 2747–2753.

Laxman, S., Sutter, B.M., Wu, X., Kumar, S., Guo, X., Trudgian, D.C., Mirzaei, H., and Tu, B.P. (2013). Sulfur amino acids regulate translational capacity and metabolic homeostasis through modulation of tRNA thiolation. *Cell* *154*, 416–429.

Ljungdahl, P.O., and Daignan-Fornier, B. (2012). Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *190*, 885–929.

Masselot, M., and De Robichon-Szulmajster, H. (1975). Methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* *139*, 121–132.

Menant, A., Baudouin-Cornu, P., Peyraud, C., Tyers, M., and Thomas, D. (2006). Determinants of the ubiquitin-mediated degradation of the Met4 transcription factor. *J. Biol. Chem.* *281*, 11744–11754.

Model, P., Jovanovic, G., and Dworkin, J. (1997). The *Escherichia coli* phage-shock-protein (*psp*) operon. *Mol. Microbiol.* *24*, 255–261.

Mülleder, M., Capuano, F., Pir, P., Christen, S., Sauer, U., Oliver, S.G., and Ralser, M. (2012). A prototrophic deletion mutant collection for yeast metabolomics and systems biology. *Nat. Biotechnol.* *30*, 1176–1178.

Mustafa, A.K., Gadalla, M.M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S.K., Barrow, R.K., Yang, G., Wang, R., and Snyder, S.H. (2009). H<sub>2</sub>S signals through protein

S-sulfhydration. *Sci. Signal.* 2, ra72.

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

Nakatani, T., Ohtsu, I., Nonaka, G., Wiriyathanawudhiwong, N., and Morigasaki, S. (2012). Enhancement of thioredoxin / glutaredoxin- mediated L -cysteine synthesis from S -sulfocysteine increases L -cysteine production in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 11, 1–9.

Paul, B.D., and Snyder, S.H. (2012). H<sub>2</sub>S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 499–507.

Pérez-Gallardo, R. V., Briones, L.S., Díaz-Pérez, A.L., Gutiérrez, S., Rodríguez-Zavala, J.S., and Campos-García, J. (2013). Reactive oxygen species production induced by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a dysfunctional mitochondrial iron-sulfur cluster assembly system. *FEMS Yeast Res.* 13, 804–819.

Pronk, J.T. (2002). Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2095–2100.

Ray, W.K., Zeng, G., Potters, M.B., Mansuri, A.M., and Larson, T.J. (2000). Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *J. Bacteriol.* 182, 2277–2284.

Reinders, J., Zahedi, R.P., Pfanner, N., Meisinger, C., and Sickmann, A. (2006). Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J. Proteome Res.* 5, 1543–1554.

Sirko, a E., Zatyka, M., and Hulanicka, M.D. (1987). Identification of the *Escherichia coli* *cysM* gene encoding O-acetylserine sulphydrylase B by cloning with mini-Mu-lac containing a plasmid replicon. *J. Gen. Microbiol.* 133, 2719–2725.

Slekar, K.H., Kosman, D.J., and Culotta, V.C. (1996). The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *J. Biol. Chem.* *271*, 28831–28836.

Sugiura, Y., Honda, K., Kajimura, M., and Suematsu, M. (2014). Visualization and quantification of cerebral metabolic fluxes of glucose in awake mice. *Proteomics* *14*, 829–838.

Takagi, H., Taguchi, J., and Kaino, T. (2016). Proline accumulation protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase from ethanol stress by reducing reactive oxygen species levels. *Yeast* *33*, 355–363.

Thomas, D., and Surdin-Kerjan, Y. (1997). Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *61*, 503–532.

Thomas, D., Cherest, H., and Surdin-Kerjan, Y. (1991). Identification of the structural gene for glucose-6-phosphate dehydrogenase in yeast. Inactivation leads to a nutritional requirement for organic sulfur. *EMBO J.* *10*, 547–553.

Thomas, D., Barbey, R., Henry, D., and Surdin-kerjan, Y. (1992). Physiological analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in sulphate assimilation. *J. Gen. Microbiol.* *138*, 2021–2028.

VanderSluis, B., Hess, D.C., Pesyna, C., Krumholz, E.W., Syed, T., Szappanos, B., Nislow, C., Papp, B., Troyanskaya, O.G., Myers, C.L., et al. (2014). Broad metabolic sensitivity profiling of a prototrophic yeast deletion collection. *Genome Biol.* *15*, R64.