

( 続紙 1 )

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                 |    |       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 博士（農学）                                                                                                          | 氏名 | 張 万 皎 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Studies on Biosynthesis of Sulfur- and Selenium-Containing Molecules in Bacteria<br>(細菌における含硫・含セレン分子の生合成に関する研究) |    |       |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                 |    |       |
| <p>同族元素である硫黄とセレンは、そのユニークな化学特性により、様々な生体分子において重要な役割を果たしている。含硫・含セレン分子の多くは、それぞれシステイン・セレノシステイン (Sec) からの硫黄脱離・セレン脱離を初発反応として生合成される。硫黄・セレンをターゲット分子に転移するタンパク質など種々の因子が生合成に関与することも明らかにされつつある。しかしながら、詳細までその生合成機構が解明された含硫・含セレン分子はごく少数である。また、生体内には未同定の含硫・含セレン分子も数多く存在するものと考えられている。本研究は、<i>Escherichia coli</i> における含硫補因子モリブドプテリン (MPT) の生合成機構と <i>Geobacter sulfurreducens</i> における新規セレンタンパク質の存在を明らかにしたものであり、その成果は以下のように要約される。</p> <p>1. システインデスルフララーゼは、ピリドキサル 5'-リン酸を補酵素として遊離の L-システインから硫黄を脱離し、活性中心システイン残基上にペルスルフィドを生成する。<i>E. coli</i> には CsdA、SufS、IscS と呼ばれる 3 種のシステインデスルフララーゼが存在する。<sup>35</sup>S 標識した L-システインを用いた <i>in vitro</i> 実験では、3 種のシステインデスルフララーゼのいずれも MPT 合成酵素のサブユニット MoaD への硫黄転移反応を触媒できることが示された。次に、MoaD および MoaD のアデニル化を触媒する酵素 MoeB がシステインデスルフララーゼの活性におよぼす影響を調べたところ、IscS の活性が MoaD、MoeB の添加によって、特異的に上昇することが見いだされた。一方、このような活性化は CsdA と SufS においては見られなかった。さらに、表面プラズモン共鳴分析により、IscS と MoaD、IscS と MoeB の特異的な相互作用が検出された。以上の <i>in vitro</i> 実験により、MPT 生合成の硫黄挿入反応に生理的に関わるシステインデスルフララーゼは IscS であることが示唆された。<i>E. coli</i> の 3 種のシステインデスルフララーゼそれぞれを欠損させ、MoaD のチオカルボキシル化への影響を分析した。<i>iscS</i> 欠損株および <i>csdA/sufS</i> 二重変異株で MoaD を発現させ、チオカルボキシル化される MoaD を定量したところ、野生株と <i>csdA/sufS</i> 二重変異株の間では顕著な差は見られなかった。一方、<i>iscS</i> 欠損株においてチオカルボキシル化される MoaD の量は、野生株の約 1% しかなかった。また、各システインデスルフララーゼ欠損株の酸抽出物を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、<i>moaD</i> 欠損株と同様、<i>iscS</i> 欠損株に MPT の前駆体の蓄積が認められた。一方、<i>csdA</i> 欠損株および <i>sufS</i> 欠損株では、このような蓄積は見られなかった。この蓄積は <i>iscS</i> 遺伝子の導入によって見られなくなった。以上の結果より、<i>E. coli</i> の MPT 生合成の硫黄供給経路では、</p> |                                                                                                                 |    |       |

IscS が Moad、MoeB と特異的に相互作用し、主要な硫黄供給体として機能することが示された。

2. セレンタンパク質の生合成では、通常、終止コドンとして機能する mRNA 上の UGA が Sec コドンとして解読され、リードスルーされる。Sec をコードする UGA の下流にはセレノシステイン挿入配列 (SECIS) と呼ばれるステムループ構造が存在し、終止コドンとして機能する UGA と区別される。*G. sulfurreducens* の新規セレンタンパク質を探索するため、まず、本菌の全ゲノム配列情報に基づいて、UGA コドンを含む全遺伝子を抽出し、そのホモログが他の生物種に存在するか、相同性検索 (TBLASTN) を行った。進化的保存性の低い偽遺伝子は排除した。次に、*G. sulfurreducens* のゲノムで UGA を挟んで同じ読み枠で隣接する遺伝子について、他生物種のゲノムでは別の読み枠となっているものや、遺伝子間の距離が異なっているものを排除した。このようにして、少なくとも 2 つの生物種において保存されているリードスルー遺伝子候補をリストアップした。その結果、10 種類の既知セレンタンパク質をコードする遺伝子以外に、従来、別々の遺伝子とみなされていた *gsu2937* と *gsu2936* から成る新規なリードスルー遺伝子候補が見いだされた。上流側の *gsu2937* にコードされるタンパク質は 5 つのヘム結合モチーフを有していた。また、N 末端にはシグナルペプチドと考えられる 25 アミノ酸残基の配列が認められた。UGA の下流に存在する SECIS を一般的な SECIS 予測プログラムである bSECISearch で分析した結果、既知の SECIS とは異なる特徴をもつことが示された。*gsu2937* の下流に存在する *gsu2936* がコードするタンパク質と特異的に反応する抗体を用いて、*G. sulfurreducens* 細胞抽出液のウェスタンブロット解析を行った結果、*gsu2937* と *gsu2936* がリードスルーされて生成したと考えられるタンパク質のバンドが検出された。本タンパク質を *G. sulfurreducens* から精製し、紫外可視吸収スペクトル分析と鉄定量を行った結果、タンパク質 1 分子あたり 5 分子のヘムの存在が確認され、また、質量分析とセレン定量によって Sec 残基の存在が確認された。以上の結果、*gsu2937* と *gsu2936* が新規なヘム含有セレンタンパク質をコードすることが明らかとなった。本タンパク質をその構成要素に基づいて、MHSEP (Multi~~h~~eme-containing selenoprotein) と命名した。種々の電子受容体を含む培地で本菌を培養し、MHSEP の発現量をウェスタンブロット法で調べたところ、MHSEP が不溶性の酸化鉄や硫黄を含む培地で誘導生産されることが明らかになった。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を35字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、2,000～5,000 charactersで作成し審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

硫黄は鉄硫黄クラスターやチアミンなど種々の含硫補因子において重要な機能を発揮する。一方、硫黄の同族元素であるセレンは 21 番目のアミノ酸とも呼ばれる Sec 残基の形でタンパク質中に存在し、酸化還元反応に関与するものが多い。本研究では、硝酸還元酵素、亜硫酸オキシダーゼ、キサンチンデヒドロゲナーゼなどのモリブデン酵素の活性に必須の含硫補因子である MPT について *E. coli* における生合成機構を解析し、また、特異な金属還元能を有する細菌として注目される *G. sulfurreducens* が生産する新規セレンタンパク質を新しい生物情報学的手法によって同定したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. *E. coli* の 3 種のシステインデスルフラゼ CsdA、SufS、IscS のうち IscS を欠損させた変異株において、MPT 生合成前駆体 precursor Z が蓄積すること、また、precursor Z 生合成反応における硫黄供与体 MoaD のチオカルボキシル化レベルが著しく低下することを見いだした。一方、CsdA および SufS の欠損株ではこのような異常が生じないことを示した。MPT 生合成の初発反応を担う酵素が IscS であることを明確に示した研究成果であり、特筆に値する。

2. IscS が、MPT 生合成に関与する MoaD および MoeB と直接的に相互作用し、これらのタンパク質で活性化されることを、精製酵素を用いた *in vitro* 実験で示した。MPT 生合成における IscS の作用機序解明に重要な手がかりをあたえる知見であり、意義深い研究成果といえる。

3. *G. sulfurreducens* に新規なヘム含有セレンタンパク質 MHSEP を見いだすとともに、本タンパク質をコードする遺伝子中の SECIS が、既知の SECIS とは異なる特徴をもつことを示した。また、MHSEP が不溶性の酸化鉄や硫黄を含む培地で誘導生産されることを見いだした。生物情報学的手法と生化学的手法を組み合わせたアプローチによって、前例のないヘム含有セレンタンパク質の存在と新規 SECIS の存在を明らかにしたもので高く評価できる。

以上のように本論文は *E. coli* における含硫補因子 MPT の生合成機構と *G. sulfurreducens* における新規セレンタンパク質の存在を明らかにしたものであり、微生物科学、生化学、分子生物学、生物情報学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 22 年 2 月 12 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注)Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。  
要旨公開可能日： 年 月 日以降