

植物は、硫酸イオンを基質として様々な硫黄化合物を合成する。根より吸収された硫酸イオンは還元され硫化水素となり、*O*-アセチルセリンに取り込まれる事により最初の硫黄代謝産物であるシステインを生成する。このシステイン合成の最終ステップを担うのがシステイン合成酵素で、硫黄同化経路が窒素同化経路と炭素同化経路と交わる点に位置している。システイン合成酵素活性やシステイン合成酵素遺伝子アイソフォームの遺伝子発現の栄養源に対する応答や、システイン合成の律速段階を解析することにより、システイン合成の制御機構を解明することが出来ると考えられた。このような目的で、イネを用いて生理実験を行ったところ、硫黄欠乏条件下でシステイン合成酵素活性が地上部、根の両方において上昇する事が示された。この上昇は窒素栄養の存在下のみで見られたことから、硫黄同化経路の窒素源による制御機構の存在を示した。この応答が遺伝子発現のレベルで見られるのかを調べるために、4個のシステイン合成酵素遺伝子 (*rcs1*、*rcs2*、*rcs3*、*rcs4*) を単離した。それぞれの遺伝子発現を解析したところ、酵素活性レベルと同様に、窒素栄養依存的に硫黄欠乏条件下で *rcs1* の mRNA 蓄積量が地上部と根の両方において上昇していた。窒素欠乏条件のもとでは、システイン合成酵素の基質のひとつである *O*-アセチルセリンが欠乏するためにこの応答が起きないと考えられる。これらの事から、細胞内のシステイン合成酵素活性は主に *rcs1* による事が示唆され、*rcs1* の遺伝子発現誘導に伴う酵素活性の上昇が硫黄欠乏条件下での効率的なシステイン合成における律速段階の1つである事が示唆された。実際、センス *rcs1* 過剰発現イネは明条件下において高いシステイン含量を示した。また、イネを Na₂S 処理する事により細胞内のシステイン含量が上昇したことから、硫酸イオンの硫化水素までの還元もまた、システイン合成の律速となっている事が示された。これらの結果により、システイン合成は、硫化水素の生成とシステイン合成酵素の活性レベルの、少なくとも2つのポイントで制御されている事が示された。

イネの生育障害である秋落ちの主な原因は、水田から発生する硫化水素であると考えられている。これまでにコムギ由来のシステイン合成酵素遺伝子を過剰発現させたタバコが、有毒なレベルの硫化水素ガスに対して抵抗性を示すことが報告されている事から、センス *rcs1* 過剰発現イネが秋落ちに耐性を示す可能性が示唆された。しかし、形質転換イネは野生型イネよりも Na₂S 処理に対してより感受性を示した。これは形質転換イネにおいては、毒性を示すレベルのシステインが蓄積している事によると考えられた。

上述のシステイン合成経路で合成されたシステインのほとんどはメチオニン、グルタチオン合成のために代謝されると考えられる。しかし、これら量的に主要な有機硫黄化合物以外にも植物細胞にはシステインを起源とすると考えられる化合物が多く存在し、それらの代謝にかかわる生化学的経路が高等植物において確認されていないものも多い。そのような硫黄化合物の多くは、微生物や動物においても同様に存在しており、関連する遺伝子も数多く単離されている。そこで、そのような経路の存在を高等植物において確認するために、遺伝子の側から生化学的経路の推定を試みた。シロイヌナズナの DNA 配列を検索したところ、これまで植物においてその存在が明らかでなかったシステイン代謝関連酵素である、メルカプトピルビン酸サルファートランスフェラーゼ、亜硫酸オキシダーゼ、 γ -ファミリーに属するビタミン B6 酵素のアミノ酸配列に有意な相同性を示した4個の遺伝子の存在が確認された。これらの遺伝子が実際に機能的な酵素をコードすることを調べるために、cDNA を単離し生化学的手法や逆遺伝学的手法を用いて解析を行った。2個のメルカプトピルビン酸サルファートランスフェラーゼ (MST) 遺伝子 (*AtMST1*、*AtMST2*) をもとに作製した融合タンパク質は、酵素活性を持つ事を確認し、それぞれミトコンドリアと細胞質に局在する事を明らかにした。また、*AtMST1* を欠損している T-DNA 挿入変異株を単離した。この変異株において、鉄硫黄クラスターを持つ酵素である NADH デヒドロゲナーゼとアコニターゼの酵素活性を測定したところ、野生株と同レベルであった。従って、この MST の生理機能としてこれまで提唱されていた仮説である、鉄硫黄クラスターの合成には、*AtMST1* は関わっていない事が示唆された。亜硫酸オキシダーゼホモログ遺伝子 (*AtMCP*) はそのアミノ酸配列から新規のドメイン構造を持つモリブデンタンパク質をコードし、細胞質に局在する事が分かった。しかし、モリブデンコファクターの合成能が低下した変異株における亜硫酸オキシダーゼ活性は、野生型のもものと変わらないことから、MCP が亜硫酸オキシダーゼをコードする可能性は低い事が示され、亜硫酸に類似する化合物の酸化還元反応を行っている可能性が示唆された。 γ -ファミリーに属するビタミン B6 酵素遺伝子群に属すると考えられる *AtPEG* がコードするタンパク質は、実際にビタミン B6 を補酵素とする事を確認した。この酵素は、システインやシスチンと相互作用する事が示され、細胞質においてシステインやシスチン、またはそれに類似する化合物の代謝に関わっている事が示唆された。

本研究により、高等植物におけるシステイン合成の制御機構や律速段階に関する新しい知見が得られた。また、これまで不明であったシステイン代謝経路の一部を明らかにするとともに、未知の代謝経路を解明する手がかりを得た。これらの知見は、システイン代謝経路とその制御機構の全体像、さらには窒素や炭素などの代謝経路とのクロストークを理解するために役立つと考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 中村達夫

植物は、硫酸イオンを基質として必要な硫黄化合物を合成する。根より吸収された硫酸イオンは還元され硫化水素となり、*O*-アセチルセリンに取り込まれる事により最初の硫黄代謝産物であるシステインが生成される。システイン合成酵素によって触媒され、硫黄同化経路が窒素および炭素同化経路とクロストークする点に位置している。本研究の第一部は、システイン合成酵素およびその遺伝子発現の栄養源に対する応答や、システイン合成の律速段階を解析した。イネでは、硫黄欠乏条件下でシステイン合成酵素活性が地上部、根の両方で上昇した。この上昇は窒素栄養を要したので、硫黄同化経路は窒素源によって制御されることが明らかになった。この応答を遺伝子発現のレベルで調べるために、4個のシステイン合成酵素遺伝子 (*rcs1*、*rcs2*、*rcs3*、*rcs4*) を単離した。それぞれの遺伝子発現を解析したところ、酵素活性レベルと同様に、窒素栄養依存的に硫黄欠乏条件下で *rcs1* の mRNA 蓄積量が地上部と根の両方において上昇していた。*rcs1* の遺伝子発現誘導に伴う酵素活性の上昇が硫黄欠乏条件下での効率的なシステイン合成における律速段階の1つである事が示唆された。また、イネを Na₂S 処理する事により細胞内のシステイン含量が上昇したことから、硫酸イオンの硫化水素までの還元もまた、システイン合成の律速となっている事が示された。これらの結果により、システイン合成は、硫化水素の生成とシステイン合成酵素の活性レベルの、少なくとも2つのポイントで制御されている事が示された。次に、有毒なレベルの硫化水素ガスに対する抵抗性を期待して、センス *rcs1* 過剰発現イネを作成した。しかし、形質転換イネは野生型イネよりも Na₂S 処理に対してより感受性を示した。これは形質転換イネが過剰のシステインを蓄積し、自家中毒を起こしたと考えられた。そこで本研究の第二部では効率良いシステインの代謝を目指して、その分解系を解析した。システインの多くはメチオニン、グルタチオン合成のために代謝されると考えられる。しかし、それ以外にも植物細胞はシステインを起源とする多くの化合物を持ち、それらの代謝にかかわる生化学的経路は殆ど知られていない。そこで、微生物や動物の系を参考に、遺伝子の側からその解明に取り組んだ。データベースを検索したところ、これまで植物においてその存在が明らかでなかったシステイン代謝関連酵素である、メルカプトピルビン酸サルファートランスフェラーゼ、亜硫酸オキシダーゼ、 γ -ファミリーに属するビタミン B6 酵素のアミノ酸配列に有意な相同性を示した4個の遺伝子の存在が確認された。これらの遺伝子が実際に機能的な酵素をコードすることを調べるために、cDNA を単離し生化学的手法や逆遺伝学的手法を用いて解析を行った。2個のメルカプトピルビン酸サルファートランスフェラーゼ (*MST*) 遺伝子 (*AtMST1*、*AtMST2*) は、酵素活性を持つ事、それぞれミトコンドリアと細胞質に局在する事を明らかにした。また、亜硫酸オキシダーゼホモログ遺伝子 (*AtMCP*) はそのアミノ酸配列から新規のドメイン構造を持つモリブデンタンパク質をコードし、細胞質に局在する事、さらに亜硫酸に類似する化合物の酸化還元反応を行っている可能性が示唆された。 γ -ファミリーに属するビタミン B6 酵素遺伝子群に属する *AtPEG* がコードするタンパク質は、実際にビタミン B6 を補酵素とし、システインやシスチンと相互作用する事が分かった。本研究により、高等植物におけるシステイン合成の制御機構や律速段階に関する新しい知見が得られた。また、これまで不明であったシステイン代謝経路の一部を明らかにするとともに、未知の代謝経路を解明する手がかりを得た。これらの知見は、システイン代謝経路とその制御機構の全体像、さらには窒素や炭素などの代謝経路とのクロストークを理解するために役立つと考えられる。

以上のように、本論文はシステイン代謝機構の本質に迫るもので、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。