

硫黄はすべての生物の必須元素であり、タンパク質の折りたたみや酵素の触媒や細胞の酸化還元状態の維持に重要な役割を果たしている。植物と微生物は硫酸などの無機硫黄化合物を同化して、システインやメチオニンやグルタチオンといった有機硫黄化合物を合成することができる。一方、動物は主に植物が合成した有機硫黄化合物を利用している。植物では、硫酸トランスポーターによって細胞内に取り込まれた硫酸は、主にプラスチドに運ばれて、活性化と還元的作用を受け、硫化水素となる。生じた硫化水素はシステイン合成酵素によって、アセチルセリンに付加されてシステインとなる。近年、植物から硫黄同化経路に関わる遺伝子が、数多く単離されてきた。その結果、硫黄同化のほとんどのステップには3つ以上のアイソザイムが存在することが分かってきた。特に、システイン合成酵素はESTクローンを含めると7種以上存在することが示唆された。システインとシステイン合成の前駆体であるアセチルセリンが、転写レベルあるいは活性レベルで硫黄同化経路に関わる酵素を制御していることが分かっており、システイン合成酵素は硫黄同化経路の鍵酵素の一つであると考えられている。しかし、複数のアイソザイムの必要性については、ほとんど何も分かっていない。そこで、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、システイン合成酵素遺伝子のアイソザイムの役割の違いを明らかにすることを目的として、以下の研究を行った。

7種類すべての酵素の性質を調べるために、GSTとの融合タンパク質を大腸菌で発現させて、精製した。精製タンパク質のシステイン合成酵素活性を測定したところ、cs26を除くすべてのタンパク質がシステイン合成酵素活性を示したが、AtcysD2、AtcysC1のアセチルセリンへの親和性が低く、システイン合成能力が低いことが分かった。これらのタンパク質はすべてピリドキサルリン酸を補酵素として持っており、その吸光特性からいくつかのアミノ酸との親和性を調べた結果、AtcysC1がシステインに親和性が高いことが示された。そこで、システイン合成酵素と同じピリドキサルリン酸依存性酵素のβファミリーに属するシアノアラニン合成酵素活性を測定したところ、AtcysC1が高いシアノアラニン合成酵素活性を持つことが分かった。シアノアラニン合成酵素は、エチレン合成の際に生成される青酸イオンをシステインのスルフヒドリル基と置換することによって、解毒すると考えられている。

それぞれのタンパク質の植物における役割を調べるために、PCRを用いたT-DNA挿入株の単離を試みた結果、AtcysC1にT-DNAが挿入された株を単離することができた。T-DNA挿入株では、シアノアラニン合成酵素活性が野生型とくらべて約20%にまで減少しており、AtcysC1が最も主要なシアノアラニン合成酵素であることが分かった。この結果は、シアノアラニン合成酵素活性がミトコンドリアでもっとも高いという報告と一致している。しかし、青酸カリウムやエチレンの前駆体処理では、T-DNA株の生育に影響を与えなかったことから、AtcysC1が、エチレンの合成によって生成される青酸イオンの解毒には関わっていないことが示唆された。

以上の研究結果と、ゲノムデータベース上に存在する新たな2つのシステイン合成酵素ホモログを使った系統解析の結果を総合すると、これまでシステイン合成酵素ファミリーとして報告されてきた高等植物のタンパク質は、6つのグループに分類することができる。グループ1は細胞質型の、グループ2はオルガネラ型のシステイン合成酵素であり、グループ3はミトコンドリアのシアノアラニン合成酵素である。グループ4にはシステイン合成酵素活性を持つものと持たないものがあり、実際の機能については予測できていない。また、グループ5と6に属するタンパク質は機能未知であるが、アミノ酸配列の相同性とピリドキサルリン酸への結合能から考えると、同様のβ置換アラニン合成反応を行う可能性が高い。現在、これら6つのグループに属する酵素はβ置換アラニン合成酵素ファミリー(β-substituted alanine synthase, BSAS)として分類されている。しかし、シロイヌナズナのAtcysD1、AtcysD2、cs26タンパク質もシステインあるいは硫化水素を基質にする可能性は残されており、これらの酵素の硫黄代謝経路に及ぼす影響は今後の検討課題である。

現在、シロイヌナズナのゲノム解析が完了し、遺伝子産物の機能解析が主流となるが、アミノ酸配列の相同性のみでは実際の生理機能を解明できない場合が多数予想される。従って、本研究で行ったシステイン合成酵素アイソザイムの解析のように、酵素化学的性質の比較の重要性が増すものと考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 山口 夕

植物と微生物は無機硫黄化合物を同化して、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ことができる。硫酸トランスポーターによって細胞内に取り込まれた硫酸は、主にプラスチドに運ばれて、活性化と還元的作用を受け、硫化水素となる。生じた硫化水素はシステイン合成酵素によって、アセチルセリンに付加されてシステインとなる。この経路は8種類の酵素によって触媒され、そのほとんどには3つ以上のアイソザイムが存在することが分かってきた。特に、システイン合成酵素は7種存在することが示唆された。しかし、複数のアイソザイムの必要性については、ほとんど何も分かっていない。本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、システイン合成酵素遺伝子のアイソザイムの役割を詳細に検討した。

7種類のシステイン合成酵素を全て大腸菌で発現させ、酵素活性を測定したところ、1種類 (cs26) を除くすべてのタンパク質がシステイン合成酵素活性を示した。しかし、それぞれののアセチルセリンへの親和性にはおおきな差があり、3種類は高い酵素活性を示し、システイン合成酵素と判断されたが、残りの3種類 (AtcysD1、AtcysD2、AtcysC1) の活性は低く、その機能については疑問が残った。これらのタンパク質はすべてピリドキサルリン酸を補酵素として持っており、その吸光特性からいくつかのアミノ酸との親和性を調べた結果、1種 (AtcysC1) がシステインに親和性が高いことが示された。そこで、システイン合成酵素と同じピリドキサルリン酸依存性酵素のβファミリーに属するシアノアラニン合成酵素活性を測定したところ、AtcysC1が高いシアノアラニン合成酵素活性を持つことが分かった。

その役割を調べるために、T-DNA挿入株を単離した。T-DNA挿入株では、シアノアラニン合成酵素活性が野生型とくらべて約20%にまで減少しており、AtcysC1が最も主要なシアノアラニン合成酵素であることが分かった。しかし、青酸カリウムやエチレンの前駆体処理では、T-DNA株の生育に影響を与えなかったことから、AtcysC1が、エチレンの合成によって生成される青酸イオンの解毒には関わっていないことが示唆された。

以上の研究結果と、ゲノムデータベース上に存在する新たな2つのシステイン合成酵素ホモログを使った系統解析の結果を総合すると、これまでシステイン合成酵素ファミリーとして報告されてきた高等植物のタンパク質は、6つのグループに分類することができる。グループ1は細胞質型の、グループ2はオルガネラ型のシステイン合成酵素であり、グループ3はミトコンドリアのシアノアラニン合成酵素である。グループ4にはシステイン合成酵素活性を持つものと持たないものがあり、実際の機能については予測できていない。また、グループ5と6に属するタンパク質は機能未知であるが、アミノ酸配列の相同性とピリドキサルリン酸への結合能から考えると、同様のβ置換アラニン合成反応を行う可能性が高い。現在、これら6つのグループに属する酵素はβ置換アラニン合成酵素ファミリー (β-substituted alanine synthase, BSAS) として分類されている。しかし、シロイヌナズナのAtcysD1、AtcysD2、cs26タンパク質もシステインあるいは硫化水素を基質にする可能性は残されており、これらの酵素の硫黄代謝経路に及ぼす影響は今後の検討課題である。

現在、シロイヌナズナのゲノム解析が完了し、遺伝子産物の機能解析が主流となるが、アミノ酸配列の相同性のみでは実際の生理機能を解明できない場合が多数予想される。従って、本研究で行ったシステイン合成酵素アイソザイムの解析のように、酵素化学的性質の比較による機能決定が今後、ますます重要になり、ファンクショナルゲノミックスの中心課題になると思われる。