

論文内容の要旨

申請者氏名 Natthawut Wiriyathanawudhiwong

システイン (Cys) を含むアミノ酸の排出促進には、内膜の排出トランスポーターの強化が一般的であった。これまでに内膜の Cys トランスポーターは、YdeD、YfiK、CydDC および、Bcr の 4 つが報告されている。外膜透過に関与する因子 (チャンネル) の必要性についての研究は行われていない。そこで、本研究ではペリプラズム・外膜透過に関与する新規 Cys トランスポーターの探索を行い、Cys 発酵生産への有用性を評価するとともに、Cys トランスポーターの生理的役割に関する解析を行った。

まず、大腸菌非必須遺伝子ライブラリー (Keio collection; 約 3,985×2 クローン) を用い、外膜透過に関与する因子の探索を試みた。その結果、外膜のポーリンである TolC 遺伝子欠損株が、特に明確で強い Cys 感受性を示した。プラスミド相補実験より野生株並みに Cys 感受性を回復できることから、TolC タンパク質が Cys 耐性に関与していることを明らかにした。さらに、単独での Cys 排出能が知られている内膜因子 YdeD を過剰発現させた場合に比べ、TolC と YdeD の両方を過剰発現させると、より短時間で多くの Cys (20%向上) を細胞外に分泌生産することから、外膜タンパク質 TolC は菌体外へ Cys を排出する新規トランスポーターである可能性を示した。これまで TolC は外膜の物質透過のチャンネルとして様々な物質 (トキシンや抗生物質などの低分子) の排出に関与していることが知られている。TolC は排出システムの外膜の共通因子であり、内膜・ペリプラズムの排出因子との相互作用により、目的物質を細胞質から菌体外へ排出するポンプを構成している。しかしながら、TolC と相互作用する内膜・ペリプラズムの既知排出因子の多重欠損株でも Cys 感受性を示さないことから、大腸菌における Cys 排出は、内膜 Cys トランスポーターにより一端ペリプラズムに排出された後、TolC によるポア拡散により外膜を透過する可能性を示すものであり、従来から知られている基質の排出機構とは異なるメカニズムの存在が示唆された。

次に、大腸菌の細胞質には遊離の Cys がほとんど検出されないにも関わらず、細胞質からペリプラズムへ Cys を輸送する YdeD など複数の内膜 Cys トランスポーターが存在しており、その生理的意義に興味を持っていた。*In vitro* の実験で Cys は過酸化水素を直接還元し、水に変換できることから、YdeD が大腸菌のペリプラズムに生じる過酸化水素を消去する可能性に着目し、遺伝子破壊株が過酸化水素に感受性を示すと同時に、過剰発現株では耐性を示すことを見出した。また、過酸化水素を消去後、Cys はシスチンに酸化されることを明らかにした。さらに、シスチン結合タンパク質 FliY 依存的にシスチンが細胞質へ取り込まれること、及び *fliY* 遺伝子欠損株も過酸化水素に感受性を示すことを見出した。最後に、*ydeD* と *fliY* の両遺伝子の転写が過酸化水素により誘導されることから、Cys/シスチンのトランスポーターがペリプラズムで生じる過酸化水素の除去に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Natthawut Wiriyanawudhiwong

システイン (Cys) は、タンパク質の構成成分など生理的に重要なアミノ酸であり、また食品、化粧品、医薬品などの工業原料に広く用いられてきた。現在、Cys は主に毛髪や羽毛からの酸加水分解抽出法により製造されており、加水分解に用いる濃塩酸による環境負荷が問題となっている。申請者が所属する研究室では、この問題を解決する製造方法として微生物によるグルコースからの直接発酵法を考案し、Cys 高生産株の育種が鋭意続けられてきた。これまで Cys を含むアミノ酸の排出促進には、内膜の排出トランスポーターの強化が一般的であり、外膜透過に関与する因子の必要性に関しては重要視されてこなかった。本研究は Cys トランスポーターに着目し、Cys 発酵生産の過程で見出された Cys トランスポーターの生理的役割を解明するものである。

申請者はまず、大腸菌非必須一遺伝子欠損ライブラリーを用い、外膜透過に関与するトランスポーターの探索を試みた。その結果、野生株と比べて Cys 感受性を示す 24 の候補株を取得した。中でも外膜ポーリンをコードする *tolC* 欠損株は、特に明確で強い Cys 感受性を示した。単独での Cys 排出能が知られる内膜トランスポーター YdeD を過剰発現させた場合に比べ、TolC と YdeD の両方を過剰発現させると、より短時間で多くの Cys を培地に分泌生産することから、有用性が実証できた。さらに、大腸菌における Cys 排出機構は内膜 Cys トランスポーターにより、一端ペリプラズムに排出され、その後 TolC により Cys が外膜を透過し、培地中に排出されると結論した。

次に、Cys 及びそのトランスポーターの生理的役割について研究を進めた。大腸菌の細胞質には Cys がほとんど検出されないにも関わらず、細胞質からペリプラズムへ Cys を輸送する YdeD など複数の Cys トランスポーターが存在する事実は一見矛盾し、その生理的意義に興味を持たれていた。*In vitro* の実験で Cys は過酸化水素を直接還元し、水に変換できることから、YdeD がペリプラズムに生じる過酸化水素を消去する可能性に着目し、遺伝子破壊株が過酸化水素に感受性を示すと同時に、過剰発現株では耐性を示すことを見出した。また、過酸化水素を消去後、酸化されたシスチンはシスチン結合タンパク質 FliY 依存的に細胞質へ取り込まれること、及び *fliY* 遺伝子欠損株もまた過酸化水素に感受性を示すことを見出した。これらの結果から、Cys/シスチンのトランスポーターが細胞外の過酸化水素の除去に重要な役割を果たしており、新たな酸化ストレス防御機構として Cys/シスチンシャトルシステムを提唱するに至った。

以上のように、本論文は大腸菌のゲノム情報に基づき新規の外膜 Cys トランスポーター TolC を同定し、発酵生産への有用性を示すと同時に、Cys 排出機構に着目し、ユニークな酸化ストレス防御機構の提唱を行ったものであり、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。