

氏 名	赵 春晖
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	学 術
学位授与番号	博甲第3029号
学位授与の日付	平成17年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科生体機能科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Analysis of a Complex Formation of Cysteine Synthase from <i>Escherichia coli</i> and Its Application to Production of Nonproteinaceous Amino Acids (大腸菌由来のシステイン合成酵素の複合体形成機構の解明と 非タンパク性アミノ酸生産への応用)
論文審査委員	教授 中西 一弘 教授 酒井 裕 教授 山田 秀徳

学位論文内容の要旨

In this study, the author intended to make clear the mechanism for protein-protein interaction in cysteine synthase composed of serine acetyltransferase (SAT) and *O*-acetylserine sulfhydrylase (OASS) from *Escherichia coli*. The author also developed effective production methods of nonproteinaceous amino acids *in vivo* and *in vitro* using the cysteine synthase and related enzymes. The thesis includes the following four chapters.

In Chapter 1, OASS-B was cloned, expressed in *E. coli*, and characterized. In Chapter 2, the protein-protein interaction in the cysteine synthase was analyzed by gel chromatography and surface plasmon resonance technology to identify the amino acid residues that are responsible for the complex formation. In Chapter 3, β -pyrazole-1-yl-L-alanine (β -PA) and β -triazole-1-yl-L-alanine (β -TA) were synthesized by two methods using recombinant *E. coli* cells. In the first method, β -PA was synthesized from L-serine and pyrazole, using the cells that express cysteine synthase, acetate kinase, and phosphotransacetylase (PTA). In the second method, OAS secreted was used for the synthesis. In Chapter 4, β -PA and β -TA were synthesized enzymatically with a regeneration system of acetyl CoA using PTA and acetyl phosphate as the substrate.

論文審査結果の要旨

細菌および高等植物細胞内での硫黄代謝の最終段階に位置するシステイン合成酵素は、serine acetyltransferase (SAT) と *O*-acetylserine sulfhydrylase (OASS) からなる。SAT は L-Ser と acetyl CoA から *O*-acetyl-L-Ser (OAS) と CoA を生成する反応を、OASS は OAS と sulfide から L-Cys と酢酸を生成する反応を触媒する。また、OASS には OASS-A と OASS-B の2種類の酵素が存在する。本論文では、第1章で OASS-B の特性解析を行った後に、第2章でシステイン合成反応調節の鍵となる OASS-A と SAT の複合体形成機構を解明するために、種々の変異型 SAT と OASS-A との間の分子間相互作用を表面プラズモン共鳴 (SPR) シグナル分析法などを用いて解析した。その結果、SAT の C 末端の Ile273 の存在と Glu268, Asp271 が複合体形成に必須であることを明らかにした。さらに、細胞内でのシステイン合成酵素の硫黄分子センサーとしての役割を指摘した。第3章と4章では、OASS-A の広い基質特異性を利用した効率的な非タンパク性アミノ酸 (β -置換アラニン) 合成方法を提案した。第3章では、SAT と OASS-A の他に2つの酵素を発現した遺伝子組換え大腸菌を用いて、200 mM L-Ser から β -pyrazole-L-Ala (β -PA) が70%以上の高収率で生産できることを示した。この際、C 末端20アミノ酸残基を欠失した変異型 SAT を発現した遺伝子組換え菌を用いると、反応中間物質の OAS が細胞外に大量に分泌されることを見出した。第4章では、SAT, OASS-A 及び acetyl CoA 再生系を組み込んだ複合酵素反応系を構築した。各素反応の反応速度論解析を行い、最適な反応条件を推定した。最適な反応条件では、250 mM の基質から80%以上の高い収率で、 β -PA 及び β -triazole-L-Ala (β -TA) が合成された。以上のように本研究は、システイン合成酵素の複合体形成機構の解明とその役割を明らかにするとともに、システイン合成酵素系を用いた *in vivo* 及び *in vitro* 非タンパク性アミノ酸合成方法を確立したものであり、生化学的ならびに生物工学的見地から高く評価される。よって、本論文は博士(学術)の学位に値するものと判定される。