助成番号　210170	５－２

研 究 成 果 報 告 書

研究テーマ（和文）	硫黄資化に関わる硫黄転移酵素の機能連携の解明		
研究テーマ（英文）	Elucidation of Functional Cooperation in Sulfur Transfer Enzymes Involved in Sulfur Assimilation		
研究期間	2021年 ～ 2024 年	研究機関名　奈良先端科学技術大学院大学	
研究代表者	氏名	（漢字）	塚崎 智也
		（カタカナ）	ツカザキ トモヤ
		（英文）	TSUKAZAKI Tomoya
	所属機関・職名		奈良先端科学技術大学院大学・教授
共同研究者（計＿＿＿名）＊２名をこえる場合は、【別紙追加用紙】（P3）に３人目以降を追記してください。	氏名	（漢字）	
		（カタカナ）	
		（英文）	
	所属機関・職名		
	氏名	（漢字）	
		（カタカナ）	
		（英文）	
	所属機関・職名		

概要 （600 字～800 字程度にまとめてください。）

人は無機硫黄からシステインを合成できませんが、細菌は可能であり、地球の硫黄循環に関与しています。我々は以前、細菌のチオ硫酸イオン（$S_2O_3^{2-}$）を取り込む膜タンパク質 YeeE を同定し、その機能解析を行いました。本研究では、固定化膜標本（SSM）解析により YeeE がチオ硫酸イオンを選択的に通すことを示し、YeeE が酵素 YeeD と協力して機能することを明らかにしました。

YeeE/YeeD 複合体の構造を X 線結晶構造解析（2.6Å 分解能）で決定し、その相互作用を大腸菌生育補完試験およびバイオレイヤー干渉（BLI）法で解析しました。構造から、YeeE の3つのシステイン残基が輸送に必須であり、細胞質側の YeeD のシステイン残基と連携することが示唆されました。さらに、YeeD のシステインがチオ硫酸イオンと反応し、$-S-S_2O_3^-$ に修飾されることを確認しました。質量分析により $-S-S^-$ の状態も存在すると予測され、YeeD がチオ硫酸イオンと反応後に S^{2-}を生成することを、蛍光指示薬 HSip-1 を用いて示しました。

分子動力学計算により、YeeD の-SH 基が$-S-S_2O_3^-$ となると YeeE/YeeD の相互作用が弱まり、YeeD が乖離することが示されました。チオ硫酸修飾後に YeeD が離れ、分解後に再結合することで酵素サイクルが回ると考えられます。本研究により、ATP 駆動型 ABC 輸送体とは異なる新たなチオ硫酸取り込み経路が明らかになりました。

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）						
雑誌	論文課題	YeeD is an essential partner for YeeE-mediated thiosulfate uptake in bacteria and regulates thiosulfate ion decomposition				
	著者名	Ikei M *et al.*	雑誌名	PLoS Biology		
	ページ	e3002601	発行年	２　０　２　４	巻号	22
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	

英文抄録（100 語～200 語程度にまとめてください。）

Uptake of thiosulfate ions as an inorganic sulfur source from the environment is important for bacterial sulfur assimilation. Recently, a selective thiosulfate uptake pathway involving a membrane protein YeeE (TsuA) in Escherichia coli was characterized. YeeE-like proteins are conserved in some bacteria, archaea, and eukaryotes. However, the precise function of YeeE, along with its potential partner protein in the thiosulfate ion uptake pathway, remained unclear. Here, we assessed selective thiosulfate transport via Spirochaeta thermophila YeeE in vitro and characterized E. coli YeeD (TsuB) as an adjacent and essential protein for YeeE- mediated thiosulfate uptake in vivo. We further showed that S. thermophila YeeD possesses thiosulfate decomposition activity and that a conserved cysteine in YeeD was modified to several forms in the presence of thiosulfate. Finally, the crystal structures of S. thermophila YeeE-YeeD fusion proteins at 3.34-Å and 2.60-Å resolutions revealed their interactions. The association was evaluated by a binding assay using purified S. thermophila YeeE and YeeD. Based on these results, a model of the sophisticated uptake of thiosulfate ions by YeeE and YeeD is proposed.