

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 12 年度博士課程進学
氏名 遠藤隆主
指導教官 大森俊雄

論文題目

Pseudomonas putida DS1 株のジメチルスルフィド代謝系に関する研究

第一章 序論

“磯のにおい”の主成分として知られるジメチルスルフィド (DMS) は、主に海洋の植物プランクトンや藻類が生産するジメチルスルホニオプロピオン酸の微生物分解によって生じ、大気中へ放出される年間の全硫黄量の 50~60% を占めると報告されている。大気中で生じた DMS 酸化物は、雲の形成核の前駆体となるため、DMS は地球の熱放射バランス、天候の変化、そして地球規模での硫黄循環に重大な影響を及ぼしていると考えられている。一方、自然環境中に生息する多様な微生物が、DMS や DMS 酸化物を唯一の炭素源、エネルギー源、または硫黄源として利用することが報告されており、これら微生物による硫黄化合物の変換は、地球規模での硫黄循環に寄与していると考えられる。

我々の研究室では、DMS を唯一の硫黄源として利用する *Rhodococcus* 属細菌 SY1 株、*Acinetobacter* 属細菌 20B 株を単離し、微生物による DMS の代謝メカニズムを解析してきた。しかしながら、SY1 株、20B 株は共に DMS をジメチルスルホキシド (DMSO)、ジメチルスルホン (DMSO₂) へ順次酸化する経路で脱硫すると推定されたが、DMS 資化に直接関与する遺伝子の同定には至らなかった。

そこで本研究では、DMS 資化性細菌による DMS 変換メカニズムを遺伝子レベルで解明するために、新たに *Pseudomonas putida* DS1 株を単離し、DMS 資化能欠損変異株を取得、解析することで DMS 代謝に関与する遺伝子を同定し、その機能を明らかにした。

第二章 DMS 資化菌 *P. putida* DS1 の単離と DMS 資化能欠損株の取得^[1]

東京大学圃場より収集した土壌サンプルから、集積培養によって DMS, DMSO を唯一の硫黄源として生育する DS1 株を単離した。DS1 株は運動性を有する桿菌であり、培地中に黄緑色の蛍光色素を分泌した。DS1 株の 16S rDNA 塩基配列は、*P. putida* のそれと 99~100%一致したことから、DS1 株を *P. putida* と同定した。DS1 株は、DMS を唯一の硫黄源として生育したとき DMSO と DMSO₂ を培地中に蓄積し、DMSO₂ も唯一の硫黄源として生育できるため DMS を酸化的脱硫経路で資化すると推測された。一方、DMS と硫酸イオンを含む培地で DS1 株を培養すると、DMS 酸化物の蓄積は顕著に抑制された。このことから、DS1 株の DMS 代謝能の発現は硫酸飢餓応答 (sulfate starvation response, SSR) と呼ばれるストレス応答であり、DMS の酸化には硫酸飢餓誘導性 (sulfate starvation-induced, SSI) の酵素の関与が示唆された。

次に、トランスポゾン 5 (Tn5) 変異導入法によって、DMS 資化能欠損変異株を 5 株取得した (Table 1)。それぞれの変異株から Tn5 の挿入周辺領域をクローニングし、塩基配列を決定した結果、Dfi175 と Dfi4B の Tn5 周辺領域は、*P. putida* S-313 株においてスルホン酸、硫酸エステルの資化に関与すると報告された SSI *ssuEADCBF* operon の *ssuA* と *ssuC* の一部とそれぞれ相同性を示した。Dfi74J 及び Dfi20D の Tn5 周辺領域は、転写制御因子をコードすると推定される *P. aeruginosa* PAO1 株の *pa2354* の一部と相同性を示した。Dfi71L の Tn5 周辺領域は、cysteine および *S*-sulfocysteine の生合成に関与する *Escherichia coli* の *cysM* の一部と相同性を示した。

第三章 *ssuEADCBF* operon の DMS 代謝における役割^[1]

Dfi175 と Dfi4B はそれぞれ同じ *ssu* operon 上の *ssuA* 及び *ssuC* の変異株である事が予想されたが、DMSO と DMSO₂ に対する資化能は互いに異なっていた (Table 1)。これは、DS1 株の *ssu* 遺伝子群が、DMS 代謝に重要な複数の要因を含んでいるためであると考えられた。そこで DS1 株の *ssu* 遺伝子群をクローニングし DMS 代謝における役割の解明を試みた。

DS1 株ゲノムのコスミドライブラリーから *ssu* 遺伝子群を含む DNA 断片をクローニングし、塩基配列を決定した。DS1 株の *ssuEADCBF* 遺伝子群は、ABC-transporter を構成する periplasmic sulfonates-binding protein (SsuA), ATP-binding component (SsuB), membrane permease component (SsuC), two-component monooxygenase system を構成する NADPH-dependent FMN reductase (SsuE), FMNH₂-dependent

monooxygenase (SsuD), そして機能未知の SsuF をコードすると推測され, これらは S-313 株の *ssu* 遺伝子産物と 92%以上の相同性を示した. 酸化酵素をコードする *ssuD* の機能を明らかにするため, *ssuD* に非極性カナマイシンカセットを挿入し, *ssuD* 破壊株を作成した. *ssuD* 破壊株は, DMS, DMSO, DMSO₂, メタンスルホン酸 (MSA) に対する資化能を欠失した. また, SsuD を *E. coli* で過剰発現させた細胞抽出粗酵素は, MSA の脱スルホン活性を有することが確認された. これらのことから, DS1 株は, DMS を DMSO→DMSO₂→MSA へ順次酸化し, SsuD による MSA の脱スルホン化で生じた亜硫酸を利用して生育することが示唆された. 一方, 先の方法で作成した *ssuC* 破壊株は, DMS と MSA に対する資化能を欠失し, *ssuF* 破壊株は DMS に対する資化能を欠失することも示された. このことは *ssu* 遺伝子群が MSA の資化だけでなく DMS の代謝にも重要な役割を担っていることを示している.

Table 1. Growth phenotype of DMS-utilization-defective mutants.

Sulfur source	Wild type	Mutant strains				
	DS1	Dfi175	Dfi4B	Dfi74J	Dfi20D	Dfi71L
DMS	+++	-	-	-	-	-
DMSO	+++	-	+++	-	+++	+++
DMSO ₂	+++	-	+++	-	+++	+++
MSA	+++	-	±	+++	+++	++
Sulfate	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Each strain was grown with sulfur-free medium containing 1 mM or 0.5% (68 mM DMS) of sulfur source at 30 °C for 48 hours. Growth characteristics of the strains is defined as follows; -, OD₅₅₀<0.2; ±, 0.2≤OD₅₅₀<0.5; +, 0.5≤OD₅₅₀<1.0; ++, 1.0≤OD₅₅₀<1.5; +++, 1.5≤OD₅₅₀.

第四章 *sfnECR* operon にコードされる新規転写制御因子 SfnR の解析とその標的遺伝子の取得^[2]

Dfi74J は, DMS, DMSO, DMSO₂ を硫黄源として利用できないが, 硫酸飢餓条件下で DMS を DMSO₂ へ酸化したことから, Dfi74J は DMSO₂ →MSA の変換経路の欠損株であると考えられた. DS1 株ゲノムのコスミドライブラリーから Dfi74J の Tn5 挿入周辺領域を含む DNA 断片クローニングし塩基配列を決定した. この領域には 3 つの遺伝子で構成される operon (*sfnECR* と命名)が存在し, Dfi74J は *sfnR* の欠損株であることが明らかになった. *sfnECR* はそれぞれ, NADH-dependent FMN reductase

(SfnE), FMNH₂-dependent monooxygenase (SfnC), σ^{54} -association domain と DNA-binding domain を有する転写制御因子 (SfnR)をコードすると推測された. *sfnR* を発現するプラスミドで Dfi74J を相補すると, DMS, DMSO, DMSO₂ の資化能が回復したことから, *sfnR* が DMSO₂ の代謝に必須の因子であることが明らかになった. σ^{54} 因子欠損株を作成したところ, この欠損株は MSA を資化したが DMS, DMSO, DMSO₂ を硫黄源として利用できなかった. このことから SfnR は σ^{54} -RNA polymerase と協調して DMSO₂ の代謝に関与する遺伝子の発現を正に調節することが示唆された. 一方, Northern hybridization および reporter gene assay の結果から, *sfnECR* operon は SSI 遺伝子群であることが示され, またその転写は cysteine 生合成遺伝子の発現を統率する LysR ファミリー転写調節因子 CysB に依存することも明らかになった.

一方, SfnR の標的遺伝子を同定するために, Tn5 内部に *Pseudomonas* 属細菌で構成的に発現する P_{BAD} プロモーターを外向きに繋いだプラスミドを構築し, *sfnR* 破壊株に導入することで DMSO₂ の資化能を獲得した変異株を取得した. この株の Tn5 は FMNH₂-dependent monooxygenase をコードすると推測される遺伝子の直上流に位置し, この遺伝子の直上流に, σ^{54} 依存性のプロモーター配列が確認された. 現在, この遺伝子の機能について解析中である.

まとめ

以上, 本研究により, *P. putida* DS1 株の DMS 代謝に関与する遺伝子を同定することに成功した. DS1 株は DMS を MSA へと酸化し SSI *ssuEADCBF* operon にコードされる酸化酵素 SsuD によって MSA を脱スルホン化することを明らかにした. また, SSI *sfnECR* operon にコードされる σ^{54} 依存性の転写制御因子 SfnR が DMSO₂ の代謝に関与する遺伝子の発現を制御することを明らかにした. また, これまで窒素代謝に関わる遺伝子の発現制御に重要であると考えられていた σ^{54} 因子が, 硫黄代謝にも関与することを発見した初めての知見であり, 細菌が有する有機硫黄代謝メカニズムの解明に寄与するものと期待される.

- [1] Endoh, T., Kasuga, K., Horinouchi, M., Yoshida, T., Habe, H., Nojiri, H., & Omori, T. Characterization and identification of genes essential for dimethyl sulfide utilization in *Pseudomonas putida* strain DS1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press).
- [2] Endoh, T., Habe, H., Yoshida, T., Nojiri, H., & Omori, T. A CysB-regulated and σ^{54} -dependent transcriptional regulator, SfnR, is essential for dimethyl sulfone metabolism of *Pseudomonas putida* strain DS1. (submitted).