

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成17年度博士課程 進学  
氏名 高妻 篤史  
指導教員名 山根 久和

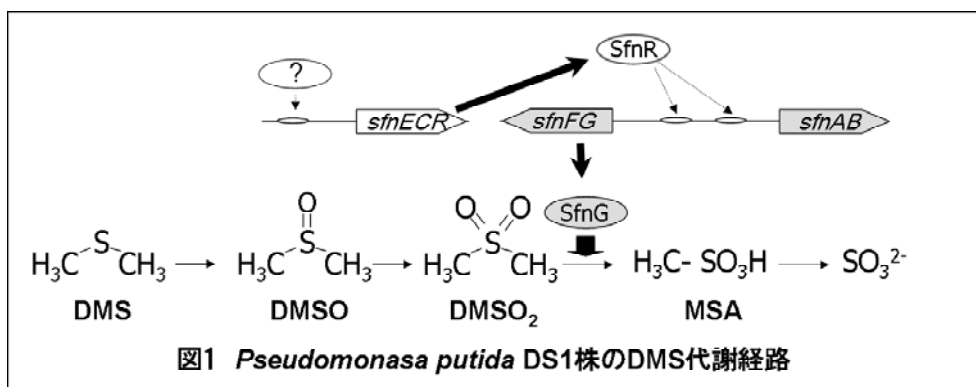
## 論文題目

### *Pseudomonas putida* DS1 株のスルホン代謝に関与する新規硫酸飢餓応答機構の解析

細菌の生育においても必須な元素である硫黄は、様々な硫黄源から同化される。細菌が最も利用しやすい硫黄源は硫酸イオン ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) であるが、土壌中では硫酸イオンは硫黄分全体の 5% を占めるに過ぎない。その他の硫黄分は硫酸エステル ( $\text{R-OSO}_3\text{H}$ )、スルホン酸 ( $\text{R-SO}_3\text{H}$ ) やアミノ酸といった有機硫黄化合物として存在する。揮発性の有機硫黄化合物であるジメチルスルフィド ( $\text{CH}_3\text{-S-CH}_3$ ) も海洋、淡水堆積物、土壌から放出されており、環境中に豊富に存在する。したがって細菌 (特に土壌に生息する細菌) はこのような様々な有機硫黄化合物から硫黄を獲得する能力を発達させることで、硫酸飢餓環境においても生存を図ってきたものと考えられる。

有機硫黄化合物の代謝に関わる遺伝子は硫酸飢餓応答を示し、硫酸イオン欠乏時に誘導的に発現することが知られている。硫酸飢餓応答の分子機構は大腸菌のスルホン酸代謝系において解析されてきた。しかし、実際に硫酸飢餓環境中で生息する土壌細菌がどのように硫酸飢餓条件を感知して、多様な有機硫黄化合物代謝能を発揮するのかについてはほとんど知られていなかった。特に、ジメチルスルフィドからの硫黄獲得機構に関する知見はほぼ皆無であった。

*Pseudomonas putida* DS1 株は以前筆者の所属研究室により単離された土壌細菌であり、ジメチルスルフィド ( $\text{DMS}$ ) を唯一の硫黄源として生育可能である。DS1 株は連続的酸化反応により  $\text{DMS}$  をジメチルスルホキサイド ( $\text{DMSO}$ )、ジメチルスルホン ( $\text{DMSO}_2$ )、メタンスルホン酸 ( $\text{MSA}$ ) を経て亜硫酸イオン ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) へと変換する (図 1)。



DMSO<sub>2</sub> から MSA への変換は、FMNH<sub>2</sub> 依存性 monooxygenase (SfnG) が触媒する。sfnG を含む sfnFG オペロンの発現には σ<sup>54</sup> 依存性の (NtrC type) の転写因子 SfnR が必要である。細菌の有機硫黄化合物代謝に σ<sup>54</sup> 依存性転写因子が関与する例は他に知られておらず、SfnR の発見は DS1 株のスルホン代謝系 sfn 遺伝子群が既知のものとは全く異なる硫酸飢餓応答機構を備えていることを示すものであった。しかし、sfnR 自身 (sfnECR オペロンに含まれる) の発現制御機構はほぼ未解明であった。また、細胞内の硫酸イオン濃度認識における SfnR の役割は不明であった。

そこで本研究ではこの sfn 遺伝子群の新規硫酸飢餓応答機構を分子レベルで明らかにすることを目的とし、以下に示す解析を行った。

### 1. ジメチルスルホン代謝に必要な遺伝子の単離と解析

既に単離されていたもの以外にも sfn 遺伝子群の転写調節に関与する遺伝子を単離するため、DS1 株に対しトランスポゾン (Tn) 変異導入を行った。その結果、PTS<sup>Ntr</sup> family に属するリン酸基転移酵素遺伝子と相同性を示す遺伝子 ptsP を DMSO<sub>2</sub> 代謝に必要な遺伝子として単離した。相同性組換えにより作製した ptsP 破壊株も Tn 挿入株と同様に DMSO<sub>2</sub> 資化能が欠損した。またその資化能の欠損は ptsP をプラスミドにより相補することで回復可能であった。

PTS<sup>Ntr</sup> family のリン酸基転移酵素は σ<sup>54</sup> 依存性転写因子による発現制御に関係することが報告されている。したがって ptsP の破壊は SfnR (σ<sup>54</sup> 依存性転写因子) による sfnFG の発現制御に影響を与えていることが予想された。定量的 RT-PCR 解析により sfnFG 発現量を測定した結果、ptsP 破壊株では野生株と比較して有意に発現量が減少していることが明らかとなった。したがって ptsP 破壊による DMSO<sub>2</sub> 資化能欠損は sfnFG 発現量の減少に起因していると考えられた。本研究は PTS<sup>Ntr</sup> family のリン酸基転移酵素が有機硫黄化合物代謝に関与していることを示した最初の報告となった[1]。

### 2. ジメチルスルホン代謝系オペロン (sfn オペロン) の転写調節機構

SfnR は sfn オペロンの硫酸飢餓応答において鍵となる役割を果たしていると予想されたが、sfnR 遺伝子自身がどのような発現制御を受けるのかは不明であった。そこで筆者は sfnR を含む sfnECR オペロンの転写調節機構を詳細に解析した。

最初に sfnECR の転写開始点をプライマー伸長法により決定した。その際、SfnR 自身による

autoregulation の可能性も考慮して、野生株と同時に *sfnR* 破壊株においても解析を行った。 *sfnECR* の転写開始点は開始コドンの 189 bp 上流に見出されたが、予想に反し、野生株よりも *sfnR* 破壊株において、プライマー伸長産物の量が多いという結果となった。この結果から、SfnR が自身の遺伝子を含む *sfnECR* オペロンの発現を抑制していることが示唆された。転写開始点下流+28 から+45 までの領域には、*sfnFG* オペロンの転写開始点上流にも存在する SfnR の結合モチーフが見出された。したがって、SfnR がこのモチーフに結合することで、*sfnECR* の mRNA 伸長を阻害していることが予想された。

この仮説を証明するため、SfnR 結合モチーフを含む DNA 領域の deletion 解析を行った。その結果、野生株では deletion により *sfnECR* の発現量が有意に増加した。一方、*sfnR* 破壊株においては発現量の増加は認められなかった。また、この結合モチーフを含む DNA 領域に SfnR が結合することをゲルシフトアッセイにより確認した。以上の結果から、転写開始点の下流に SfnR が結合することで、*sfnECR* の発現が抑制されていることが明らかとなった。

次に、*sfnECR* の転写活性化に必要な領域を絞り込むため、*sfnECR* 上流の 5'-deletion 解析を行った。その結果、転写開始点上流 -63 までの領域が硫酸飢餓時の転写活性化に必要であることが明らかとなった。

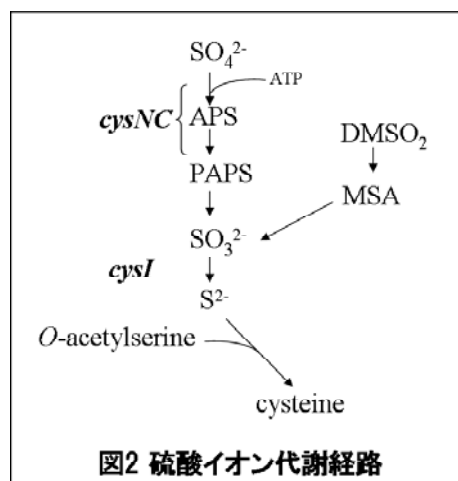
*sfnECR* の転写活性化には、広くグラム陰性細菌の硫酸代謝に関与する LysR-type の転写因子 CysB が必要であることが既に明らかとなっていた。しかし、CysB が *sfnECR* のプロモーター領域に結合することで、直接その転写を制御しているかどうかは不明であった。そこで筆者は精製 CysB タンパク質と *sfnECR* 上流配列をプローブとして用いたゲルシフトアッセイ及び DNase I footprinting を行い、CysB が *sfnECR* のプロモーター領域(転写開始上流 -71 から -32 まで)に直接結合することを明らかにした。大腸菌の CysB は、*O*-acetylserine を inducer と認識した場合に標的となるプロモーター領域に適切に結合し、転写を活性化することが報告されている。しかし、大腸菌の場合とは異なり、ゲルシフトアッセイにおいて反応系に *O*-acetylserine を添加した場合でも、DS1 株の CysB の DNA 結合能は変化しなかった。したがって DS1 株の CysB は大腸菌のものとは異なる制御様式を備えていることが示唆された。

### 3. *sfn* オペロンの転写抑制を引き起こすシグナル分子の絞り込み

*sfnECR* , *sfnFG* 両オペロンの転写はいずれも硫酸イオンが豊富に存在する条件下では抑制される。しかしその転写抑制を引き起こすシグナル分子(硫酸イオンもしくはその代謝産物と予想される)はこれまで未同定であった。したがって、両オペロンで転写抑制を引き起こすシグナル分子は共通しているのか、それとも CysB と SfnR が異なるシグナル分子を認識することで両オペロンの制御様式に違いがあるのかは不明であった。筆者はそのことを明らかにするため、硫酸イオン代謝系遺伝子の破壊株を用いた発現解析を行った。

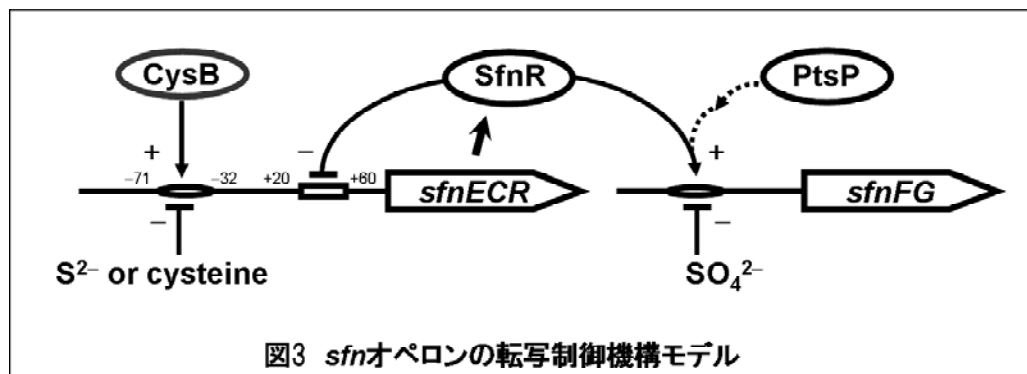
まず、硫酸イオン代謝経路(図 2)に関わる遺伝子の中で *cysNC* と *cysI* の破壊株を相同性組換えにより作製した。代謝経路から予想される通り、*cysNC* 破壊株は硫酸イオン( $\text{SO}_4^{2-}$ )を、*cysI* 破壊株は亜硫酸イオン( $\text{SO}_3^{2-}$ )を硫黄源として生育することができなかった。次に、各破壊株を硫酸イオン存在下で培養し、細胞内で蓄積する硫酸イオンもしくはその代謝産物により、*sfnFG* , *sfnECR* の発現量が抑制されるかどうかを定量的 RT-PCR により解析した。

その結果, *sfnFG* の転写量は *cysNC* 破壊株に硫酸イオンを添加した場合でも減少したことから, *sfnFG* の発現は硫酸イオン自身によって抑制されることが明らかとなった. 一方, *sfnECR* の転写量は *cysNC*, *cysI* 破壊株のいずれに硫酸イオンを添加した場合でも減少しなかった. この結果から *sfnECR* の発現は亜硫酸イオン以降の代謝産物, つまりスルフィドイオン ( $S^{2-}$ ) もしくはシステインにより抑制されることが示唆された. 以上の結果から, CysB と SfnR がそれぞれ異なるシグナル分子を認識することにより, 階層的に *sfn* オペロンの発現を制御していることが示唆された.



#### 4. 総括と展望

本研究により推定された *sfn* オペロンの転写制御機構モデルを図 3 に示した. 硫酸イオン代謝経路の下流代謝産物 ( $S^{2-}$  もしくはシステイン) が欠乏した場合は, CysB が硫酸イオン代謝系 *cys* 遺伝子に加え, *sfnECR* の転写を活性化する. 下流代謝産物に加え, 硫酸イオン自身も欠乏した場合には, SfnR が *sfnFG* の転写を活性化し,  $DMSO_2$  からの硫黄分の獲得が促進される. SfnR は *sfnECR* の発現を抑制する働きもしており, その結果 *sfnR* の発現量は適切なレベルに抑えられていると考えられる. 詳細な分子機構は不明であるが, PTS<sup>Nr</sup> family のタンパク質 PtsP も *sfnFG* の転写活性化に関与する.



本研究により, SfnR が硫酸イオンを認識している可能性が考えられた. SfnR は他の多くの  $\sigma^{54}$  依存性の転写因子と異なり, N 末端側のエフェクター認識ドメインが無いという珍しい特徴を持つ. したがって SfnR が硫酸イオンを認識しているならば, その認識機構は非常に新規性が高い. 今後硫酸イオンの認識に SfnR, さらには PtsP がどのように関係しているかを解析していくことで, 細菌における新しい硫酸飢餓応答機構の詳細が明らかになっていくものと期待される.

発表論文

1. Kouzuma et al., 2007. FEMS Microbiol. Lett. 275, 175-181.