

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高妻 篤史

土壌では硫黄元素の大半が有機硫黄化合物として存在するため、環境中の様々な有機硫黄化合物から硫黄を獲得するための機構は土壌細菌の生存戦略上重要となる。有機硫黄物を分解し硫黄源を獲得するための遺伝子群は硫酸飢餓応答を示し、硫酸イオンが欠乏した条件下で誘導的に発現することが知られている。しかし、その制御機構については大腸菌のスルホン酸/タウリン代謝系をモデルとして研究が行われているものの、土壌細菌がどのように硫酸飢餓を感知して多様な有機硫黄化合物代謝系遺伝子を発現させているのかについては未解明の部分が多いのが現状であった。

本論文では、土壌細菌 *Pseudomonas putida* DS1 株のスルホン代謝に関与する硫酸飢餓応答機構について解析が行われた。DS1 株において、ジメチルスルホンの酸化に関与する *sfnFG* オペロンの発現は *sfnECR* オペロン内にコードされる σ^{54} 依存性の転写因子 SfnR により正に制御され、これら *sfn* 遺伝子群の発現は硫酸飢餓時に誘導的に発現することが明らかとなっていた。これまでに硫酸飢餓応答に σ^{54} 依存性の転写因子が関与するといった報告はなく、SfnR の発見は *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していた。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。よって本論文では新規転写因子 SfnR が関与する *sfn* 遺伝子群の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、以下に示す解析が行われた。

本論文は 5 章から構成され、実験内容は第 2 章から第 4 章に記述されている。第 2 章では、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) 変異導入が行われた。その結果、PTS^{Ntr} 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* が DMSO₂ 代謝に必要な遺伝子として単離された。PTS^{Ntr} family のリン酸基転移酵素は σ^{54} 依存性転写因子による発現制御に関与することが報告されていた。したがって *ptsP* の破壊は SfnR (σ^{54} 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 DMSO₂ 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^{Ntr} 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。

第 3 章では *sfnR* がどのように発現するのかを明らかにするため、*sfnR* を含む *sfnECR* オペロンの転写調節機構について詳細な解析が行われた。in vivo での転写解析及び in vitro でのタンパク質-DNA 結合解析の結果、SfnR が *sfnECR* の転写開始点下流に結合することでその転

写を抑制していることが明らかとなった。また、*sfnECR* 転写開始点上流には広くグラム陰性細菌の硫黄代謝に関与する転写因子 CysB が結合し、その転写を活性化していることが明らかとなった。

第 4 章においては *sfn* オペロンの転写抑制を引き起こすシグナル分子の探索が行われた。*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が、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。そこで本章では、硫酸イオン代謝系遺伝子の破壊株を用いた発現解析によって、転写抑制を引き起こすシグナル分子の絞込みが行われた。硫酸イオンが全く代謝されない遺伝子破壊株、及び亜硫酸イオンまでは代謝されるが、それより下流の化合物には代謝されない遺伝子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の解析が行われた。その結果、*sfnFG* の転写量は硫酸イオンが全く代謝されない株において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強く示唆された。一方、*sfnECR* の転写量は、硫酸イオンが亜硫酸イオンまで代謝される株において減少しなかった。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。

以上、第 2 章から第 4 章までの結果から、総括にあたる第 5 章において、次の *sfn* 遺伝子群の転写制御のカスケードモデルが提唱された。硫酸イオン代謝経路の下流代謝産物(スルフィドイオンもしくはシステイン)が欠乏した場合は、CysB が *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、DMSO₂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^{Ntr} family のタンパク質 PtsP も *sfnFG* の転写活性化に関与する。

本論文で提唱された上記のカスケードモデルは既知の大腸菌のスルホン酸代謝系の硫酸飢餓応答機構と機能的には類似していた。しかし、両者には硫酸イオンの存在を示すシグナル分子、およびその認識機構に違いが存在すると考えられ、土壌細菌である *Pseudomonas* 属細菌が大腸菌とは異なる硫酸飢餓応答の分子機構を発達させてきたことが示唆された。本研究は土壌細菌の転写制御機構及びストレス応答機構について新たな知見を与えたという点で学術上寄与するところが大きい。また産業利用への発展が期待されるスルホン代謝系酵素遺伝子の発現制御系を解析したという点で応用的にも貢献すると考えられる。よって審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位として価値あるものと認めた。