

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19780068  
 研究課題名（和文） 有機物回収型排水処理技術の基盤となる細菌硫酸飢餓応答機構の解析  
 研究課題名（英文） Analysis of bacterial sulfate-starvation responses and its application to waste water treatment  
 研究代表者  
 羽部 浩（HABE HIROSHI）  
 独立行政法人産業技術総合研究所・環境化学技術研究部門・研究員  
 研究者番号：20313075

研究成果の概要（和文）：細菌は通常は最も利用しやすい無機硫酸イオン（ $\text{SO}_4^{2-}$ ）を硫黄源とする。しかし「硫酸飢餓」と呼ばれる硫黄欠乏状態に陥ると、その環境に存在する様々な有機化合物を分解して硫黄源とする。我々は、細菌が有する硫酸飢餓応答のメカニズムを上手く制御することで、近年成長著しい電子工業分野において洗浄剤として使用されているジメチルスルホキシドを含有する排水から、メタンスルホン酸を高効率で生産可能な生物学的廃水処理システムの構築を最終的な目的としている。

研究成果の概要（英文）：The preferred sulfur source for bacteria is inorganic sulfate,  $\text{SO}_4^{2-}$ , but in some environments, sulfate may not be freely available. Thus, several soil bacterial species have developed a number of systems that allow the use of various organosulfur compounds, which is called “sulfate-starvation responses (SSR)”. By controlling the mechanism of bacterial SSR, we tried to develop a methanesulfonic acid-producing process using the waste water containing dimethylsulfone, used for washing in some electronic industry.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,300,000	570,000	3,870,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：応用微生物、細菌、環境

## 1. 研究開始当初の背景

DMSO [化学式（ $\text{CH}_3$ ）<sub>2</sub>SO]は各種無機物や有機物に対して高い溶解性・浸透性を有するため、有用な有機溶媒として様々な産業におい

て広く使用されており、国内だけでも年間7000トンの需要がある。特に近年では、微細加工などにより高純度・高品位が要求される電子部品製造分野において、フロンや有機塩素系に代わる剥離剤や洗浄剤として使用さ

れており、5000 トン / 日程度の洗浄純水と合わさることで多量の DMSO 含有排水が発生する。DMSO 廃液は処理が難しく、以前は産業廃棄物として処分されることも多かった。DMSO 使用の増加に伴い各電子工業メーカー等により DMSO 含有排水の様々な処理方法が開発されてきたが、UV やオゾンなどを用いた物理化学的処理法ではエネルギーやコストがかかるため、より環境低負荷型の生物学的処理が望ましいとされている。しかし現在までに報告のある生物学的処理法は、未だ解決すべき問題が多い上、単に DMSO を生分解して CO<sub>2</sub> を排出するだけであり、DMSO から MSA のような有価物を回収するといった考え方は皆無である。MSA は、ファインケミカル年鑑（シーエムシー出版、2005 年版）の製品一覧でも紹介されている化学物質であり、医薬品合成原料向けその他、メッキ液電解質、エステル化触媒、脱水剤、防腐剤、繊維処理剤など工業用に使用されている。MSA の国内需要量は約 600 トン / 年と推定されているが、工業向けの MSA が堅調であることから、今後も安定した需要が見込まれている。DMSO 含有排水を一つの資源と考えて、付加価値の高い化学物質を生産できれば、それを現状価格より安く販売することで（MSA の場合、工業用で現状 1000 ~ 1300 円 / kg）処理コスト自体をかなり抑えることができる。またこのような環境低負荷型・資源循環型プロセスの開発を目指すことは、社会的なニーズにも応えている。

## 2. 研究の目的

細菌は他の微生物と同様その生育に硫黄を必要とするが、通常は最も利用しやすい無機硫酸イオン (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) を硫黄源とする。しかし自分の周辺環境から自由に SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> を摂取できない、「硫酸飢餓」と呼ばれる一種の硫黄欠乏状態に陥ると、その環境に存在する様々な有機化合物を分解して硫黄源とする能力を持っている。土壌中の硫黄元素はその 98% が有機物の形で存在しているため、土壌細菌にとってはこの硫酸飢餓応答機構が土壌環境中における重要な生存戦略となる。我々はこれまでに DMSO を唯一の“硫黄源”として生育可能な土壌細菌 *Pseudomonas putida* DS1 株を単離し、本菌株が DMSO をどのように代謝して硫黄源を獲得するのか分子レベルで解析を行ってきた。DS1 株は、DMSO をジメチルスルホン (DMSO<sub>2</sub>)、MSA、亜硫酸イオンへと順次代謝して硫黄源とするが、これら代謝に関与する遺伝子は全て SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 濃度が低い「硫酸飢餓状態」でのみ発現することが示されている。基礎研究での重要な成果として、我々は DMSO<sub>2</sub> から MSA への代謝に関与する新規な炭素-硫黄結合開裂酵素遺伝子 *sfnG* を世界で初

めて単離したが、それ以上に興味深かった現象は、細菌の硫黄代謝系遺伝子（この場合 *sfnFG*）の転写調節に、σ<sup>54</sup> 依存性 NtrC family の転写制御因子 SfnR が関与していることを世界で初めて明らかにしたことである。というのも、これまで大腸菌や *Pseudomonas* などの細菌で報告されている硫黄代謝に関与する転写制御因子は、全て σ<sup>70</sup> 依存性の LysR family であったため、現在この新規転写制御因子 SfnR の硫黄代謝における役割に大きな興味を持たれている。

一方、本提案の基礎となる重要な発見は、DMSO<sub>2</sub> から MSA への代謝系酵素遺伝子を含む *sfnFG* オペロンと、MSA から亜硫酸イオンへの代謝系酵素遺伝子を含む *ssuEADCBF* オペロンは、全く異なる転写制御因子によって、それぞれの発現が調節されていることである。すなわち、もし未同定の *ssu* オペロン転写制御因子を発見して、転写調節機構を詳細に解析することができれば、*ssuD* の発現を ON/OFF（または発現量を調節）する方法が考案できるため、DMSO からの MSA 生産を人為的にコントロールできるようになる。例えば、*ssuD* の発現を ON にしている場合は、DS1 株が活性化するのに必要な硫黄源が得られることになるが、あまり SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 濃度が高くなってしまうと、硫酸飢餓応答性の DMSO 代謝遺伝子の発現が抑制されてしまうことになるため MSA 生産量は減少する。一方、*ssuD* の発現を OFF にしている場合、DS1 株は休止菌体状態となるが、DMSO 代謝系酵素群が働くので MSA 生産量は増加していく。通常、ある化学物質の分解系遺伝子群は同じオペロン上に存在しており、同一の転写制御を受ける場合が多いことから、このように人為的に代謝系の制御を行うことは難しい。

以上のような背景から、廃液中の唯一の含硫黄物質である DMSO を DS1 株に利用させることで硫酸飢餓応答性の DMSO 分解酵素群を生産させ、さらに *ssuD* 遺伝子の転写をプロセス中で人為的に調節することにより MSA の高効率生産を行う資源循環型排水処理技術を提案するに至った。本研究期間（三年）内には、1) 鍵となる制御因子の取得と *ssu* オペロン転写調節機構の解析、2) DMSO 分解 (MSA 生産) 特性の解析、および 3) DS1 株の担体への付着性試験、活性および生存性試験の三点について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

硫酸飢餓応答機構の分子レベルでの解析については、硫酸飢餓応答遺伝子オペロンの転写単位について RT-PCR 法により解析した後、プライマーエクステンション法により転

写開始点を決定する。これらの結果からプロモーター配列を推定した後、硫酸飢餓応答遺伝子オペロンの転写に必要なDNA領域を*lacZ* レポーター遺伝子解析により特定する。ここから硫酸飢餓応答遺伝子オペロンの転写を活性化（あるいは不活性化）させる未知の転写制御因子を単離するのが非常に難しい仕事になるが、以前の研究で作製済みのレポータープラスミドを有効に利用したスクリーニング法により取得できると考えている。すなわち硫酸飢餓応答遺伝子オペロンの転写に必要なDNA領域を含むレポータープラスミドを保持したDS1株にトランスポゾン（Tn）挿入を行い、硫酸飢餓状態において青色を呈しなくなったコロニーをスクリーニングするという考え方である。また取得した転写制御因子の詳細なDNA結合様式等を解析するため、DNase I footprinting 解析も行なう。

#### 4. 研究成果

2007年度は、MSAから亜硫酸イオンへの代謝系酵素遺伝子群を含む*ssuEADCBF*オペロンの転写調節に関与する転写制御因子、ならびにDMSO<sub>2</sub>からMSAへの代謝調節因子*sfnR*遺伝子の転写調節に関与する転写制御因子をコードする遺伝子を取得する目的で、基礎的な各オペロン転写調節機構の詳細な解析を実施した。まず*sfnECR*オペロンの転写単位についてRT-PCR法により解析した後、プライマーエクステンション法により転写開始点を決定した。加えて*sfnECR*上流領域の各種deletion解析やDNase I footprinting解析を行なった結果、1)SfnRが自身の遺伝子を含む*sfnR*の発現を抑制していること、2)CysBが*sfnECR*のプロモーター領域に直接結合して転写を活性化していること等が明らかとなった。今後は、CysBやSfnRが硫酸飢餓を認識するためのシグナル分子を解析していくことで、MSAの高生産に向けた要素技術の確立を目指す。また*ssu*オペロンの転写調節機構の解析についても、現在mRNAの発現量が低く解析が難航したため、*ssu*プロモーター領域をプラスミドに組み込んだ組換え体を作製し、引き続き詳細な転写解析を行なっていく。

2008年度は、CysBやSfnRが硫酸飢餓を認識するためのシグナル分子を解析することで、MSAの高生産に向けた要素技術を確認することとした。まずSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>存在下で、DMSO<sub>2</sub>からMSAへの代謝に関与する2つのオペロン*sfnECR*、*sfnFG*の転写を抑制するシグナル分子を絞り込むために、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>代謝系*cys*遺伝子の破壊株を用いた発現解析を行なった。その結果、*sfnFG*の発現はSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>イオン自身により抑制されることが強く示唆された。一方、

*sfnECR*の発現は硫酸イオン同化経路において亜硫酸イオンよりも下流に位置する代謝産物、つまりスルフィドイオン(S<sup>2-</sup>)もしくはシステイン自身により抑制されることが示唆された。これらの事実は、*sfn*遺伝子群がCysBとSfnRの2つの転写調節因子によって抑制され、階層的に硫黄源を資化することを示している。今後は、排水中の硫酸飢餓状態を保持するために、硫酸還元菌等を用いてSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を除去するプロセスも必要になってくることから、硫酸還元菌の代謝メカニズムについても、分子レベルで詳細な転写解析を行なっていく。

2009年度は主に、硫酸還元菌の代謝メカニズムについて、タンパク質レベルで詳細な発現解析を行なった。硫酸還元において重要な役割を果たす遺伝子を取得するため、安息香酸および酪酸等を炭素源として培養した細胞から全タンパク質を抽出後、各種調製を行い、2D-PAGEによるタンパク質発現パターンの解析を行なった。その結果、新たなelectron transfer proteinホモログが硫酸還元状態で高発現していることを見出し、本遺伝子を効率的に発現させることで継続的にSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を除去できる可能性が示された。現在、これら硫酸還元菌の代謝系の特徴を生かした新たな有価物回収型排水処理システムの検討を行なっている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

以下全て査読有り

高妻篤史、遠藤隆主、大森俊雄、野尻秀昭、山根久和、羽部浩, Transcription factors CysB and SfnR constitute the hierarchical regulatory system for the sulfate starvation response in *Pseudomonas putida*, J. Bacteriol., vol.190, pp.4521-4531, 2008.

高妻篤史、遠藤隆主、大森俊雄、野尻秀昭、山根久和、羽部浩, The *ptsP* gene encoding the PTS family protein E1<sup>Ntr</sup> is essential for dimethyl sulfone utilization by *Pseudomonas putida*, FEMS Microbiol. Lett., vol.275, pp.175-181, 2007.

高妻篤史、山根久和、羽部浩, 細菌の硫黄飢餓応答の有効活用～硫黄代謝系遺伝子の発現調節を利用したものづくりの可能性～, 生物と化学, vol.45, pp.609-610, 2007.

[学会発表](計3件)

高妻篤史、羽部浩、野尻秀昭、山根久和、  
硫酸飢餓応答に関する転写調節遺伝子  
*sfnR* の発現を制御する転写因子の同定、  
日本農芸化学会 2008 年度大会，東京，  
2008.3.28

羽部浩、高妻篤史、遠藤隆主、大森俊雄、  
山根久和、野尻秀昭，The  $\sigma^{54}$ -dependent  
activator SfnR is involved in the  
expression of the  
sulfate-starvation-induced gene,  
*sfnA*”，ASM Conference on Pseudomonas  
2007, Seattle (USA), 2007.8.28.

高妻篤史、羽部浩、野尻秀昭、山根久和、  
Transcriptional analyses of the operon  
encoding the  $\sigma^{54}$ -dependent  
transcriptional activator SfnR  
involved in the sulfate starvation  
response of *Pseudomonas putida*, The  
107th General Meeting of American  
Society for Microbiology, Toronto  
(Canada), 2007.5.24.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

羽部 浩 (HABE HIROSHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・環境化  
学技術研究部門・研究員

研究者番号：20313075

### (2)連携研究者

山根 久和 (YAMANE HISAKAZU)

東京大学・生物生産工学研究センター・教  
授

研究者番号：80090520

野尻 秀昭 (NOJIRI HIDEAKI)

東京大学・生物生産工学研究センター・准  
教授

研究者番号：90272468