

助成年度：平成6年度

[所属] 広島大学 理学部

[役職] 教授

[氏名] 佐藤 敏生 (他計3名)

[課題]

水圏のイオウ循環に関する dimethyl sulfoxide (DMSO) 呼吸の機構

[内容]

近年、自然界のイオウ循環における DMS (dimethyl sulfide) の重要性が指摘されている。海洋性植物プランクトンは、浸透圧調節のために DMSP (dimethyl sulfonio-propionate) を体内に大量に有している。DMSP は海水中に溶出すると、バクテリアによって DMS に変換される。いわゆる磯の香りは DMS によると考えられている。さらに、DMS は大気中に拡散し、光化学反応によってすぐに亜硫酸ガス (SO_2) に変換され、硫酸ミストとなって雲の凝集核となり成層圏の雲を形成し、その結果、DMS の発生が気象変動に大きく影響する事が分かってきている。水圏の種々のバクテリアは嫌気呼吸の一種である DMSO (dimethyl sulfoxide) 呼吸能を有する。DMSO はパルプ製造の副産物として生成され、また、その良好な化学的性質から有機化合物の溶媒等に繁用されている。しかし、自然界に DMSO が存在するのかも明かでなく、DMSP、DMSO、DMS の化学量論的な物質収支も不明である。

私達が分離した脱窒光合成細菌は、さらに DMSO 呼吸能をも有する。これまでその末端還元酵素の性質を調べてきた。本申請研究では、まず、脱窒光合成細菌の DMSO 呼吸の機構を遺伝生化学的に明らかにする事を目的とした。本報告では DMSO 呼吸の遺伝子のクローン化とその構造を中心に報告する。

脱窒光合成細菌から DNA を抽出し、DNA ライブラリーを作成した。DMSO 還元酵素を V8 プロテアーゼで水解し、その水解ペプチドの N 末端アミノ酸配列を基にして DNA プローブ作成し、DNA ライブラリーから DMSO 還元酵素遺伝子をもつファージを分離し、さらにそれをサブクローン化して、塩基配列を決定し、DMSO 還元酵素遺伝子を *dmsA* と命名した。*dmsA* の上流にはさらに3つの ORF が存在し、それぞれ *dmsB*、*dmsC*、*dmsR* と命名した。*dmsA* の翻訳開始コドンと *dmsB* の翻訳終結コドンおよび *dmsB* の開始コドンと *dmsC* の終結コドンは互いに重なりあっており、*dmsABC* は1つのオペロンを形成していることが推定された。*dmsC* の上流にある *dmsR* は、転写方向が *dmsABC* とは逆向きであった。

dmsA 遺伝子は821アミノ酸をコードしており、N末端から42残基までがシグナルペプチドを形成していた。他のモリブデン酵素と比べると6ヶ所の領域が互いに相同であった。

dmsB 遺伝子は226アミノ酸をコードしており、膜貫通領域をもたない際牧膜結合性のタンパク質と推定された。

dmsC 遺伝子は404アミノ酸をコードしており、N末端から42アミノ酸がシグナルペプチドを形成していると推定した。ヘム結合のモチーフである GCXCHbox が5ヶ所存在しており、*DmsC* タンパク質はペンタヘムタンパク質であると考えられた。

dmsR 遺伝子は232アミノ酸をコードしており、*DmsR* タンパク質は *OmpR*、*PhoB*、*ArcA* タンパク質などの二成分転写制御系 DNA 結合性タンパク質と高い相同性を示し、*DmsR* が *dms* オペロンの転写制御に関与していることが推定された。

DMSP 還元 DMS 生成における DMSO 呼吸の役割、自然界における DMSP、DMSO、DMS の物質収支の問題は今後の検討課題として残された。

近年、自然界のイオウ循環における DMS (dimethyl sulfide) の重要性が指摘されている。海洋性植物プランクトンは浸透圧調節の役割をしている DMSP (dimethyl sulfoniopropionate) を大量に有し、DMSP は、

植物プランクトンが海洋小動物に食されたり死滅したりすると海水中に溶出し、バクテリアによって DMS に変換されると推定されている。いわゆる磯の香りは DMS によると考えられている。さらに、DMS は大気中に拡散し、光化学反応によってすぐに亜硫酸ガス (SO₂) に変換され、硫酸ミストとなって雲の凝集核となり、その結果、DMS の発生が、地球温暖化を抑制したり、気候変動に大きく影響することが分かってきている。しかし、発生した DMS は減少した DMSP の 20%しか確認できておらず、DMSP、DMS の物質収支は未だ明らかでない。

水圏では、種々のバクテリアが DMSO (dimethyl sulfoxide) を還元し、DMS を生成することが知られている。一方、DMSO はパルプ製造の副産物として生成され、また、その良好な化学的性質から有機化学反応の溶媒、生物学においても有機物の溶剤等に繁用されている。私達は、当初、DMS の起源は DMSO にあると考えていた。しかし、海水中には遊離の形で DMSO は存在しないことが報告され、DMS の起源は DMSP であることがわかってきた。そこから次の新たな問題が生じた。即ち、DMSP から生成した DMS の残り 80%の行方はどうなっているか、DMSP 還元は DMSO 呼吸によるものかである。

私達は脱窒能を持つ光合成細菌を世界で初めて分離し、その脱窒の機構を明らかにしてきた。この脱窒光合成細菌は、さらに嫌気呼吸の一種である DMSO 呼吸能をも有することを見だし、その末端還元酵素の性質、DMSO 呼吸系遺伝子の構造を調べてきた。DMSO 呼吸の研究は、日本では私達だけであり、世界的にも 1~2ヶ所であまり研究されていない。DMSO 呼吸系は DMSO で誘導され、酸素で抑制されるという 2重に制御され、その制御機構の解明という点でも興味ある対象である。本申請研究では、まずは脱窒光合成細菌の DMSO 呼吸の機構を遺伝子化学的に明らかにすることを目的とした。本報告では DMSO 呼吸末端還元酵素の遺伝子の分離とその構造を中心に報告する。DMSO 呼吸と DMSP 還元の関係、生成した DMS の転換経路については今後の問題とした。

実験材料と方法

脱窒光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL106 株を光合成培養し、染色体 DNA を抽出した。この DNA を制限酵素 MboI で部分水解し、約 2 万塩基対 (20kbp) の長さの DNA をベクター λEMBL3 に組み込んで DNA ライブラリーを作成した。DNA プローブを作成するために、精製した DMSO 還元酵素を V8 プロテアーゼで水解し、HPLC で分離したペプチドの N-末端領域のアミノ酸配列を、Edman 法の自動シーケンサーで決定した。得られたアミノ酸配列を基にして DNA プローブを合成したが、有効だったのは KNIEKMGYDD 配列を基にして作成した混合プローブ

5' -AAG (A) AAC (T) ATC (T/A) GAG (A) AAG (A) ATGGGC (A/T/G) TAT (C) GAC (T) GA-3'

であった。³²P で標識してブランクハイブリッド形成法によって上記の DNA ライブラリーをスクリーンし、DNA ハイブリッドを形成する組換えファージを分離した。DNA の塩基配列はジデオキシヌクレオチド法で BcaBEST DNA ポリメラーゼと蛍光プライマーを用いて反応後、自動シーケンサーで分析した。得られた塩基配列と解析結果は DDBJ、GSDB、EMBL、NCBI のデータベースから、accession number D38634 で見る事ができる。