

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22327

研究課題名（和文）真菌類が硫化カルボニル代謝により気体状硫黄を固定する生理的意義と代謝経路の解明

研究課題名（英文）Evidence of the existence of gaseous sulfur fixation via carbonyl sulfide metabolism in fungi

研究代表者

吉田 誠（Yoshida, Makoto）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：30447510

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：真菌類は森林生態系において多様な役割を果たすと同時に、木材の主要な微生物劣化の原因となるため、真菌類の生理学的な知見を蓄積することは重要である。一般に、糸状菌の生理学的研究は炭素源や窒素源の獲得に着目したものが主流であり、ミネラル類についての知見は少ない。本研究では、ミネラル類の中でも豊富に存在する硫黄に焦点を当て、真菌類の硫黄獲得経路の一つに気体状の硫黄化合物を硫黄固定する経路が関わるという仮説を立て、それを支持する知見を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、真菌類が硫黄を栄養源として獲得するための経路の一つに、気体状の硫黄化合物である硫化カルボニルという化合物を利用する経路がある可能性を見出した。これは気体状の二酸化炭素を利用して炭素を獲得する炭素固定である光合成、細菌類の一部が気体状の窒素を獲得するためにを行う窒素固定に次ぐ新たな生物的固定プロセスの発見にも繋がるものである。

研究成果の概要（英文）：Because fungi play diverse roles in forest ecosystems and are major causing organisms of wood decay, it is important to accumulate knowledge on the physiology of fungi. In general, physiological studies of filamentous fungi have focused on the acquisition of carbon and nitrogen sources, and little is known about minerals. In this study, we focused on sulfur, which is abundant among minerals, and hypothesized that fungi can use the gaseous sulfur compounds as a sulfur source, and succeeded in obtaining findings that support this hypothesis.

研究分野：木材腐朽菌学

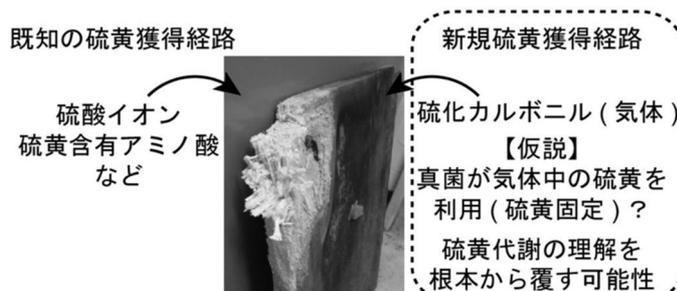
キーワード：硫黄固定 真菌類 硫黄代謝 硫化カルボニル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真菌類は森林生態系において多様な役割を果たすと同時に、産業的な観点においても、木材を利用する上で商品価値を落とす主要な微生物劣化(腐朽やカビ汚染)の原因となる。よって、それらの真菌類の生理学的な知見を蓄積することは、森林生態系の深い理解に繋がるとともに、木材の生物劣化への対策を考える上でも重要である。

一般に、糸状菌の生理学的研究は炭素源や窒素源の獲得に着目したものがその主流である。その一方で、ミネラル類についての研究は、生理的な重要性とはうらはらに研究例が少ない。本研究では、生物の必須元素であり、ミネラル類の中でも豊富に存在する硫黄に焦点を当てた。真菌類は硫酸イオンや硫黄含有アミノ酸を硫黄源とすると考えられてきたが、その一方で糸状菌は大気中にほぼ普遍的に存在する気体状の硫化カルボニル(COS)を分解する活性を有することが知られており、このことから糸状菌が気体状のCOSを出発物質とした硫黄獲得経路を持つ、すなわち「糸状菌には気体状硫黄化合物を硫黄固定する能力が備わっている」という仮説を立てた。



【目的】

真菌類が硫黄固定するという仮説を立証する

図 本研究課題の背景と目的の概略

2. 研究の目的

以上の背景を受け、本研究では「糸状菌には気体状硫黄化合物を硫黄固定する能力が備わっている」という仮説を立証することを目的とした。実際に、COSは低濃度ではあるものの、二酸化炭素や窒素と同様に大気中にごく一般的に含まれる分子であることから、もしCOSの代謝経路の存在が真実であれば、植物の光合成による炭素固定や細菌による窒素固定のように、大気中の硫黄元素を生物的に固定するプロセスが存在することを示す極めて重大な発見となり得る。

3. 研究の方法

(3-1) 供試菌

本研究では、東京農工大学フィールドミュージアム唐沢山演習林の森林土壌から分離されたCOS高分解性の糸状菌 *Trichoderma harzianum* THIF08 株を用いた。本菌は、ppmv オーダーのCOS高濃度条件のみならず大気濃度条件であってもCOSを分解することが可能な糸状菌である。

(3-2) 孢子形成

T. harzianum THIF08 株をPDA寒天培地プレートに接種し、25℃で培養し保存した。孢子懸濁液を作成するため、THIF08 株をPDAプレート培地上で25℃、暗黒下で10~12日間培養し、孢子を形成させた。THIF08 株を培養したシャーレに2mlのPBS bufferを加え、穏やかに振盪した後、孢子が懸濁したPBSを回収した。回収した液体を遠心分離した後、上清を捨て、新たに1mlのPBSを加え、十分にボルテックスした。遠心分離から懸濁までの一連の操作を3回繰り返した。

(3-3) 培養条件

20mlの硫黄を含まない改変 Czapek-Dox 寒天培地プレート上に10µlの孢子懸濁液を植菌した。孢子を接種したシャーレを、5L容 Tedlar Bag (GL Sciences, Tokyo, Japan) に入れた。袋内の気相の体積を2lに調整し、COS標準ガスを添加した。Tedlar Bagに入れたTHIF08 株を25℃、暗所で2週間培養し、ガスクロマトグラフ-炎光検出器を用いてCOSを経時的に測定した。培養後、菌体からエルゴステロールを抽出し、HPLCによりエルゴステロール量を測定した。

様々な濃度のCOS条件下でTHIF08 株を培養するために、20mlの硫黄を含まない改変 Czapek-Dox 寒天培地プレート上に孢子懸濁液を植菌し、5L-Smart PA Bagに入れ、袋内の気相の体積を2lに調整し、0.16、16、160、1,600、16,000、160,000 nmol COSをそれぞれ暴露した。比較として、シャーレに入れた20mlの寒天培地に16,000 nmolの硫酸を含む培地も準備した。バックに入れたTHIF08 株を25℃、暗所で2週間培養した。

また、32ml試験管で作成した硫黄を含まない改変 Czapek-Dox 寒天培地または硫黄を含む培地の10mlのスラント培地に孢子懸濁液を接種した。硫黄を含む培地中の硫酸塩は、それぞれ20、200、2,000 nmolに調整した。試験管にWブチルゴム栓をし、硫黄を含まない培

地のヘッドスペース 22 ml に COS を 20、200、2,000 nmol 暴露した。それらを 25°C、暗黒下で 8 日間培養し、エルゴステロールを抽出し、エルゴステロール量を測定した。

(3-4) COS または硫酸塩で培養した THIF08 株の網羅的硫黄代謝物解析

COS または硫酸塩を単一の硫黄源として THIF08 株を培養するため、32 ml 試験管に入れた 10 ml の硫黄を含まない改変 Czapek-Dox 傾斜培地に孢子懸濁液を植え付けた。硫酸塩を硫黄源とする試験区には、10 ml の培地に 1,000 nmol MgSO₄ を含む培地を使用した。接種 3 日後に COS を気相で各 190 nmol 添加した。4 日間培養後、99.7%メタノール (Wako) 3 ml で菌糸を回収し、直ちに液体窒素で凍らせた。室温でサンプルを融解し、全量 3 ml のうち 0.5 ml を氷上で 1 分間超音波処理し、菌糸を懸濁した。遠心分離後に上清 100 μL を回収し、モノプロモビマン修飾液 30 μL を加えた。これを混合したのち、乾固させ、乾固したサンプルは分析まで -20 °C で保存した。得られたサンプルは網羅的な硫黄代謝物解析であるサルファーインデックス解析に供した。サルファーインデックス解析は、LC-MS/MS と S-bimanyl 誘導体を用いた解析法である。試料は逆相カラムで分離し、MS/MS 解析はオンラインで行った。質量分析計のピーク面積から目的の代謝物量を求め、エルゴステロールの量で正規化した。

(3-5) 組換え発現で生産した *T. harzianum* THIF08 株由来 COS 分解酵素の機能解析

T. harzianum THIF08 株からクローニングした COS 分解酵素遺伝子を、大腸菌を宿主とした異種宿主発現により、組換え GST 融合 COS 分解酵素として生産した。細胞を超音波破碎して得た抽出液から、グルタチオンセファロースビーズを用いて精製した後、得られた組換え GST 融合 COS 分解酵素を用いて、様々な濃度の CO₂ 存在下での COS 分解酵素活性を測定した。さらに、*T. harzianum* THIF08 株が有する COS 加水分解酵素を発現する組換え大腸菌を用いて、これを硫黄を与えない条件と COS を単一の硫黄源とした条件で培養し、生育量を OD₆₀₀ を測定することで評価した。

(3-6) *T. harzianum* THIF08 株の COS 取り込みに関する調査

³⁴S で標識した CO³⁴S を単一の硫黄源として THIF08 株を培養し、細胞に含まれる ³⁴S 化合物の割合を調査した。また、寒天培地を取り除いた状態での COS 分解活性を測定した。THIF08 株を寒天培地の上に置いたポリエチレンの網目シート上に接種し、十分に生育した後、シートを培地から剥がし、COS 分解活性を測定した。

4 . 研究成果

(4-1) COS を唯一の硫黄源とした培養条件における成長量の調査

THIF08 株を、硫黄源を添加しない培地に接種し、単一の硫黄源として気体状 COS を暴露した条件と暴露しない条件で培養することで、COS が THIF08 株の成長に及ぼす影響を調査した。その結果、硫黄を添加しない条件では薄く白い菌糸が培地表面に広がっていたが、COS 添加区では顕著な菌糸伸長や菌糸の着色が観察された。また、COS を暴露して培養した THIF08 株は、2 週間培養後、真菌の細胞膜の成分で増殖の指標となるエルゴステロールの量が、COS を暴露していない場合に比べて顕著に多くなった。さらに、ヘッドスペース中の COS の量は THIF08 株の培養を培養した条件で徐々に減少した。これらの結果は、THIF08 株がヘッドスペースに暴露した気体状の COS を唯一の硫黄源として利用していることを示唆する。

単一の硫黄源として様々な量の COS を暴露し、培養した THIF08 株を観察した結果、COS を暴露しない条件では、シャーレの表面に薄く白い菌糸が広がった。COS を添加した場合、COS を添加しなかった場合と比較して菌糸の量が顕著に増加した。一方、過度な COS を暴露した場合には、菌糸の伸長自体は抑制された。

(4-2) COS または硫酸塩で培養した THIF08 株の網羅的硫黄代謝物解析

COS を栄養源とした場合の硫黄代謝経路に関する知見を得るために、COS または硫酸塩をそれぞれ単一硫黄源として含む培地で 7 日間培養した菌体の抽出物を網羅的硫黄代謝物解析であるサルファーインデックス解析に供した。その結果、いずれの試験区においても、システインが検出され、その下流の代謝物に位置付けられる多くの硫黄化合物も検出された。両培地において培養した菌体におけるこれらの硫黄化合物の含有量を比較した結果、含有量に有意な差があるとされた化合物の全てで、COS を硫黄源とした試験区の方が含有量が高かった。

(4-3) COS の直接的な取り込み

気体状 COS を同化し、生体内硫黄代謝物として利用していることを証明するために、THIF08 株を ³⁴S でラベルした CO³⁴S または自然同位体比の COS をそれぞれ 190 nmol 添加した条件で培養を行った。4 日間培養後、採取した菌糸体をエルゴステロール定量およびファーインデックス解析に供した。CO³⁴S を添加した条件で菌糸から抽出されたエルゴステロール量は、自然同位体比の COS 添加条件とほぼ同じであり、安定同位体 ³⁴S が THIF08 の生育にほとんど影響を及ぼさないことが示唆された。本実験のサルファーインデックス分析では、自然同位体比の COS を硫

黄源として用いた場合に検出される主要な硫黄代謝物の ^{32}S と ^{34}S の同位体比を明らかにした。その結果から、COS 中の S は取り込まれ、硫黄代謝物として利用されている可能性が考えられた。

(4-4) COS 分解酵素の関与

組換え GST 融合 COS 分解酵素は、 CO_2 の有無に左右されずに COS 分解活性を有したことから、本酵素は COS に対して特異的に分解活性を有することが明らかになった。また、COS 分解酵素を組み込んだ組換え大腸菌の生育量調査により、本酵素による COS 分解が COS を基質とする硫黄獲得経路の第一段階である可能性が考えられた。

本研究課題で実施した上述の結果は、糸状菌が COS を硫黄源として利用することを強く示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshihito Masaki, Ryuka Iizuka, Hiromi Kato, Yuka Kojima, Takahiro Ogawa, Makoto Yoshida, Yasuhiko Matsushita, and Yoko Katayama	4. 巻 36
2. 論文標題 Fungal Carbonyl Sulfide Hydrolase of <i>Trichoderma harzianum</i> Strain THIF08 and its Relationship with Clade D α -Carbonic Anhydrases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 ME20058
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/j sme2.ME20058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawano Yusuke, Suzuki Kengo, Ohtsu Iwao	4. 巻 85
2. 論文標題 Development of quantitative analytical method for volatile thiol compound with LC-ESI-MS as nonvolatile derivative by integrating a thiol-specific derivatization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1932-1936
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurosawa Ryo, Sugimoto Ryota, Imai Hiroe, Atsuji Kohei, Yamada Koji, Kawano Yusuke, Ohtsu Iwao, Suzuki Kengo	4. 巻 11
2. 論文標題 Impact of spaceflight and artificial gravity on sulfur metabolism in mouse liver: sulfur metabolomic and transcriptomic analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21786
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01129-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 飯塚瑠翔、小坂優介、吉田誠、片山葉子、大津巖生
2. 発表標題 木材腐朽菌による硫化カルボニル分解挙動の調査
3. 学会等名 日本木材保存協会第36回年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯塚瑠翔、吉田誠、梅澤究、片山葉子、大津巖生
2. 発表標題 褐色腐朽菌Gloeophyllum trabeumにおける硫化カルボニル分解挙動の調査
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryuka Iizuka, Iwao Ohtsu, Yoko Katayama, Makoto Yoshida
2. 発表標題 Decomposition and metabolism of gaseous COS by wood rotting fungi
3. 学会等名 The International Research Group on Wood Protection (IRG52) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯塚瑠翔、小坂優介、正木哲仁、吉田誠、片山葉子、大津巖生
2. 発表標題 糸状菌の硫黄代謝におけるガス状硫化カルボニルを介した代謝系に関する研究
3. 学会等名 日本木材保存協会第37回年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯塚瑠翔、正木啓仁、吉田誠、片山葉子、大津巖生
2. 発表標題 糸状菌における気体状硫化カルボニルを基質とする 硫黄獲得経路に関する研究
3. 学会等名 第72回 日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯塚瑠翔、吉田誠、梅澤究、大津巖生、片山葉子
2. 発表標題 褐色腐朽菌Gloeophyllum trabeumにおける気体状硫化カルボニル代謝経路の調査
3. 学会等名 日本木材保存協会第38回年次大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大津 巖生 (Ohtsu Iwao) (60395655)	筑波大学・生命環境系・准教授 (12102)	
研究分担者	片山 葉子 (Katayama Yoko) (90165415)	独立行政法人国立文化財機構東京文化財研究所・保存科学研究センター・客員研究員 (82620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------