

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月11日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580093

研究課題名（和文）自然界の有用環状含硫化合物の C-S 結合と開裂反応に関連の酵素類の構造と機能解析

研究課題名（英文）Studies on the structure and function of enzymes related to C-S bond formation and cleavage of useful naturally-occurring cyclic compounds having sulfur

研究代表者

和泉 好計 (IZUMI YOSHIKAZU)

鳥取大学・大学院工学研究科・名誉教授

研究者番号：40026555

研究成果の概要（和文）：自然界に存在する重要な環状含硫化合物のC-S結合関連の好熱性酵素系酵素に関して構造と機能の解析を世界で初めて行った。酵素類としてはC-S結合の形成に至る酵素系の例としてビオチン生合成系の第1段階反応を触媒する酵素KAPA合成酵素（BioF）、またC-S結合の開裂に関連の酵素系の例として石油中の大気汚染物質であるジベンゾチオフェン（DBT）脱硫酵素系の第1及び第2段階反応を触媒する酵素DBTモノオキシゲナーゼ（BdsC）を対象とした。前者については常温菌のBioFよりも有用な温度特性、基質特異性の機能が優れていること、また後者については新規反応の触媒機能を見いだした。

研究成果の概要（英文）：The structure and function of thermophilic enzymes related to C-S bond formation and cleavage of naturally occurring important cyclic compounds were studied for the first time. Targeted enzymes are KAPA synthase (BioF), which is involved in the first step of biotin (vitamin H) synthetic pathway, as the model enzyme related to C-S bond formation pathway, and dibenzothiophene (DBT) monooxygenase (BdsC), which is involved in the first and second steps of DBT, an air pollutant contained in petroleum, as the model enzyme related to C-S bond cleavage pathway. As for the former enzyme, the temperature properties and substrate specificities were significantly superior to those of known mesophilic organisms. As for the latter enzyme, a useful new reaction was found in terms of application.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：好熱性微生物 好熱性酵素 環状含硫有機化合物 ビオチン生合成系酵素 ジベンゾチオフェン脱硫酵素系

1. 研究開始当初の背景

自然界に存在する環状の含硫化合物（複素環硫黄化合物）には、ビオチン（ビタミン H）、チアミン（ビタミン B1）などのビタミンやペニシリン、セファロスポリン、チオペプチン、オーレオスリシン、チオルチンなどの抗生物質に代表される重要な生理活性物質がよく知られているが、それらだけでなく、石油・石炭に含まれるジベンゾチオフェン（DBT）類やチオフェン類に代表される難除去性環境汚染物質なども挙げられる。

このように自然界において重要な意義を有する複素環硫黄化合物がかなり多数存在するにもかかわらず、その炭素—硫黄（C-S）チン（図 1）の生合成系酵素類（BioW、BioF、

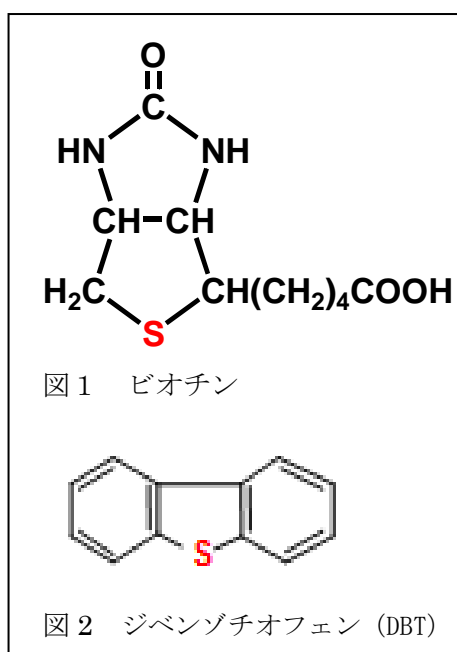


図 1 ビオチン

図 2 ジベンゾチオフェン（DBT）

BioA、BioD、BioB）を、また C-S 結合の開裂反応に至る酵素系としてのモデルとしてジベンゾチオフェン（DBT、図 2）脱硫代謝系の酵素類（DszC、DszA、DszB）をとりあげたが、いずれも好熱性微生物由来の好熱性酵素についての構造と機能については今まで全く報告がなかった。

2. 研究の目的

自然界に存在する複素環硫黄化合物の炭素—硫黄（C-S）結合の形成反応および開裂反応に関連の一連の酵素類の代表例として、前者については好熱性微生物の C-S 結合形成関連の酵素系としてのビオチン生合成系酵素（Bio 酵素類）、特に第 2 段階反応を触媒する BioF 酵素について、および後者についてはジベンゾチオフェン（DBT）脱硫微生物の C-S 結合の開裂反応関連の酵素系としての DBT 脱硫代謝系酵素（Dsz、Bds 酵素類）のうちの酵素、特に第 1 段階反応を触媒する BdsC 酵素についてその構造と機能解析を行う。その解析によって

将来、自然界で重要な役割を演ずる有用な環状含硫化合物の微生物代謝や環境浄化などの応用的研究に資する基本データの提供と技術の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各種好熱菌由来ビオチン生合成系酵素 BioF の取得

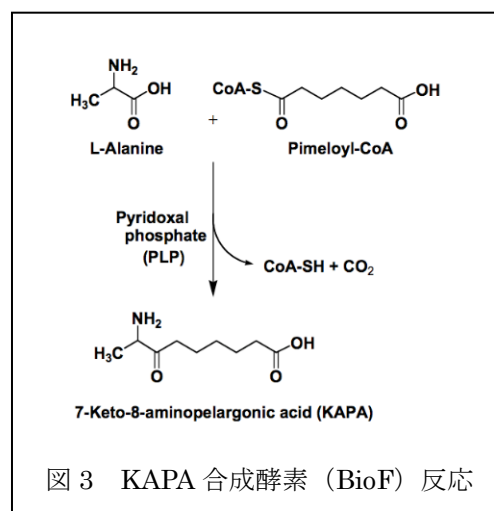


図 3 KAPA 合成酵素（BioF）反応

好熱性細菌 *Aquifex aeolicus* VF5, *Symbiobacterium thermophilum* IAM1486, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Clostridium thermocellum* ATCC2740, *Geobacillus kaustophilus* JCM12893 の遺伝子データベースより大腸菌 *bioF* 遺伝子配列と相同性の高い遺伝子を PCR によってクローニングし、大腸菌で高発現させた。それらの *bioF* と推定された遺伝子を以下ではそれぞれ TTHA1582 gene, *AqbioF*, *CltbioF*, *GkbioF*, *SytbioF* および *EcbioF* とする。これらの遺伝子を大腸菌に導入しその遺伝子産物タンパク質を高発現させた。その後各種カラムを用いてそれらのタンパク質をすべて単一に精製して本研究に用いた。

(2) BioF 酵素反応の測定方法

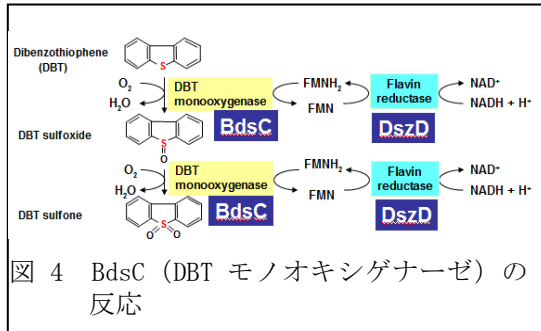
BioF 酵素（KAPA 合成酵素）の反応を図 1 に示す。BioF 酵素（KAPA 合成酵素）の測定は主として図 3 に示す酵素反応を指定の温度で 1 h 行って生じる反応生成物 KAPA の量を *Saccharmyces cerevisiae* を用いる微生物学的定量法によって測定した。酵素単位 1 unit は指定された反応条件下で 1 nmol KAPA を生成させる酵素量とした。また別法として図 3 で示す acyl-CoA から生成する CoASH を Ellman 試薬 DTNB と反応させて thiophenolate の生成に伴う 412nm における吸光度の減少を 60°C, 1 min 連続分光学的方法によって測定し $\epsilon_{412} = 13,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ に基づいて CoASH の生成量 = 反応生成物生成量を算出した。

(3) DBT モノオキシゲナーゼ（BszC）の取得

好熱性 DBT 脱硫細菌 *Bacillus subtilis* WU-S2B の DBT モノオキシゲナーゼ (BsZC) 遺伝子 *bdsC* を大腸菌に導入して培養し BsZC を高発現させた。この高発現大腸菌から BsZC を高度に精製した。

(4) BdsC 活性の測定方法

図 4 に示す BdsC (DBT モノオキシゲナーゼ) の反応にしたがって、DBT, FMN, NADH とともに BdsC 精製酵素と他の DBT 脱硫細菌



Rhodococcus erythropolis D-1 の組換え DszD 酵素を加えて 30°C で激しく振とうして反応を行った。反応液の酢酸エチル抽出液を HPLC 分析しピーク面積から DBT スルホン生成量を算出した。

(5) ベンゾチオフェン (BT) 化合物及びインドール化合物に対する BdsC の反応性測定方法

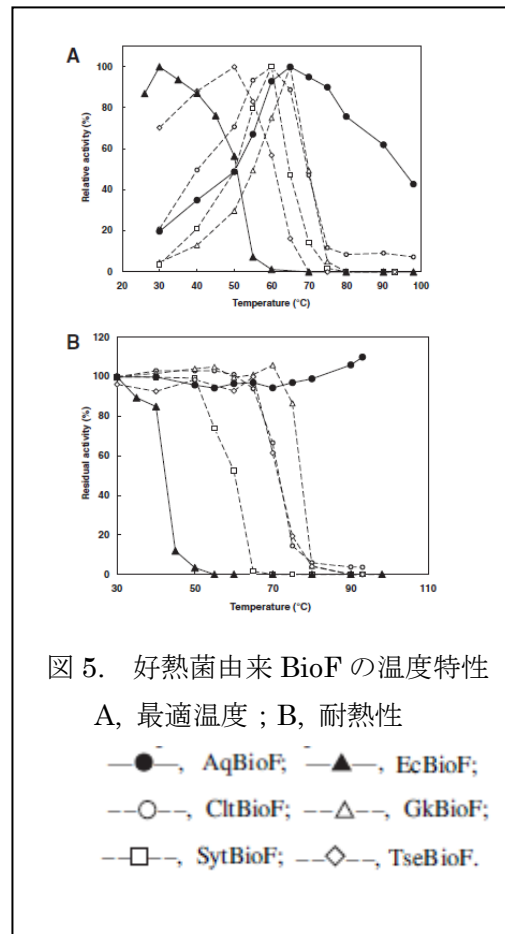
BT 類に関しては上記 (4) の DBT の代わりに BT 化合物を加え (4) と同様に反応後酢酸エチル抽出液を HPLC にかけてピーク面積から生成物を測定した。インドールとその誘導体を基質に用いた場合は、生成物のインジゴやその誘導体が水に不溶性のためジメチルフォルムアミド (DMF) に溶かしたあといくつかの処理をして基質残存量は HPLC で測定し、生成物は GCMS で分析した (詳細は論文⑤参照)。

4. 研究成果

(1) 好熱性微生物由来ビオチン生合成系 (Bio 酵素類) の好熱性 BioF 酵素の構造と機能の解明

遺伝子データベース BLAST を用いるバイオインフォマティクス的手法から、ビオチン生合成系酵素 BioF を持つと推定される好熱菌 *A. aeolicus* (AqBioF), *C. thermocellum* (CltBioF), *G. kaustophilus* (GkBioF), *S. thermophilum* (SytBioF), および *T. elongatus* (TseBioF) の 5 種を見だし、それぞれの BioF ホモログと推定された遺伝

子のクローニングを行い、組換え大腸菌によって高発現された組換え AqBioF, CltBioF, GkBioF, SytBioF, および TseBioF 酵素を精製するとともに、BioF 活性を好熱菌として初めて検出することに成功した。酵素化学的特性を検討した結果、いずれも常温菌の大腸菌の BioF と比較して至適温度 (図 5A) および耐熱性 (図 5B) とともに高く、特に AqBioF が著しく至適温度が高く、BioF 酵素を含む α -オキソアミン合成酵素ファミリーで最も高かった。また各温度での保存



に対しても著しい温度安定性を示すことが明らかになり、実用的な長所を有することがわかった。さらに SytBioF の基質特異性は広く (表 1) ビオチン中間体アナログ合成に利用できる酵素であることがわかった。

表 1. 各種好熱菌由来 BioF の基質特異性

BioFs	Amino acids ^a	Specific activities (nmol/min/mg)	
		Acetyl-CoA	Pimeloyl-CoA
AqBioF	L-Alanine	0	2,460
	Glycine	0	0
	L-Serine	0	0
GkBioF	L-Alanine	0	71
	Glycine	0	0
	L-Serine	0	0
SytBioF	L-Alanine	272	78
	Glycine	897	32
	L-Serine	0	0
TTHA1582 ^b	Glycine	191	2
	L-Alanine	109	4
	L-Serine	27	2

(2) 好熱性細菌由来ジベンゾチオフェン (DBT) 脱硫系酵素系の DBT モノオキシゲナーゼ (BdsC) の新しい機能の発見

好熱性 DBT 脱硫細菌 *Bacillus subtilis* WU-S2B の *bdsC* 遺伝子を大腸菌で高発現させ高度に精製した BdsC を用いて本来の基質である DBT 以外の硫黄を含まない各種芳香族化合物を基質としたときの反応性について検討した結果、図 6 に示すようにインドール及び各種インドール誘導体から酵素反応が進むことを見いだした。この結果から DBT モノオキシゲナーゼが硫黄を含まない芳香族化合物も基質とすることができることがわかった (図 6 に記載の化合物以外に 7-メチルインドール、5-プロモインドール、5-クロロインドール、5-メトキシインドールも基質となった)。インドール誘導体のなかで特に 5-メチルインドールが最も良好な基質となることがわかった。

インドールを基質としたとき反応液に水不溶性の青い物質が生成していることが観察された。この水不溶性物質を DMF で溶解後、分光学的な分析を行った結果 インジゴの標準物質と同じ結果を得た。しかし初発の基質量と比較してス化学量論的には生成しなかった。約 20%の収率であった。インジゴ以外の他の生成物は HPLC では観察されなかった。これは McClay らの報告でも推定しているように、インドールからインジゴに至る中間体は酸素存在下では不安定でさらに他の分解産物に変化していると思われた。本研究での BdsC 酵素反応を行うときに激しく振とうしているためこの推定が当てはまる。

上記のインドール誘導体からの生成物はインドールからインジゴ及びインジルピン合成の推定経路 (図 7) に基づいて、それらの生成物に相当する誘導体が合成されているものと推定される。

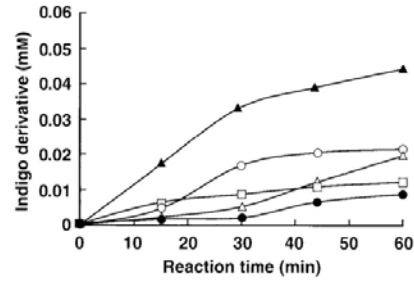


図 6. BdsC によるインドール及び各種インドール誘導体からのインジゴ誘導体合成の経時変化

○, indole; ●, 1-methylindole; △, 4-methylindole; ▲, 5-methylindole; □, 6-methylindole

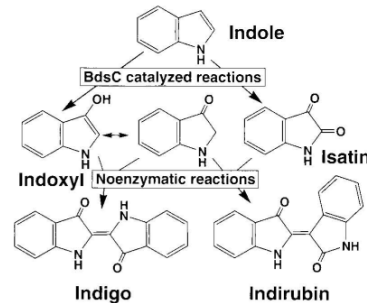


図 7. BdsC によるインドールからインジゴ及びインジルピン合成の推定経路

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 7 件)

① Takaaki Kubota and Yoshikazu Izumi, Detection and Characterization of a Thermophilic Biotin Biosynthetic Enzyme, 7-Keto-8-aminopelargonic Acid Synthase, from Various Thermophiles, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 685-690 (2012)

② Jiro Arima, Hirokazu Usuki, Tadashi Hatanaka² and Nobuhiro Mori: One-Pot Synthesis of Diverse DL-Configuration Dipeptides by a *Streptomyces* D-Stereospecific Amidohydrolase, *Appl. Environ. Microbiol.*, 7, 3209-8218 (2011)

③ Jiro Arima, Masazumi Morimoto, Hirokazu Usuki', Nobuhiro Mori, and Tadashi Hatanaka: □-Alanyl Peptide Synthesis by *Streptomyces* S9 Aminopeptidase, *J. Biotechnol.*, 147,

52-58 (2010)

④ Isam A. Mohamed Ahmed, Elfadil E. Babiker, Nobuhiro Mori: pH Stability and Influence of Salts on Activity of a Milk-clotting Enzyme from *Solanum dubium* Seeds and its Enzymatic Action on Bovine Caseins, *LWT-Food Sci. Technol.*, 43, 759-764 (2010)

⑤ Takashi Ohshiro, Shuhei Nakura, Yoshitaka Ishii, Kuniki Kino, Kohtaro Kirimura, and Yoshikazu Izumi: Novel Reactivity of Dibenzothiophene Monooxygenase from *Bacillus subtilis* WU-S2B, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 2128-2130 (2009)

⑥ Isam Ali Mohamed Ahmed, Jiro Arima, Tsuyoshi Ichiyanagi, Emi Sakuno and Nobuhiro Mori: Isolation and Characterization of 3-*N*-Trimethylamino- 1-propanol Degrading *Rhodococcus* sp. strain A2, *FEMS Microbiol. Lett.*, 296, 219-225 (2009)

⑦ Shiro Mitsuya, Yuka Yokota, Takashi Fujiwara, Nobuhiro Mori, and Tetsuko Takabe: OsBADH1 is Possibly Involved in aCetaldehydeoxidation in Rice Plant Peroxisomes, *FEBS Lett.*, 583, 3625-3629 (2009)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.tottori-u.ac.jp/~kino1/page/result.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和泉 好計 (IZUMI YOSHIKAZU)

鳥取大学・大学院工学研究科・名誉教授

研究者番号：40026555

(2) 研究分担者

森 信寛 (MORI NOBUHIRO)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30127409