

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580375

研究課題名（和文）

無機硫黄化合物の酵素化学の確立とその応用

研究課題名（英文）

Studies on the enzymatic chemistry involved in the inorganic sulfur metabolism and its application.

研究代表者

金尾 忠芳 (TADAYOSHI KANAOK)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・准教授

研究者番号：40379813

研究成果の概要（和文）：

本研究は、硫黄酸化細菌に存在する無機硫黄化合物を基質とした酵素について詳細な解析を行い、この様な細菌の硫黄代謝に対する理解を深めるとともに、「無機硫黄の酵素化学」という新たな学問領域への知見の蓄積を目的とする。鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* を研究の対象とし、硫黄化合物を代謝する酵素であるテトラチオン酸ヒドロラーゼ (4THase) について詳細な研究を行った。本研究課題において、4THase をコードした遺伝子 (*Af-tth*) が同定され、大腸菌による組換え発現と封入体による回収、新規な酸性条件下での refolding 法を開発し、これによる活性型酵素を獲得した。さらにこの活性型酵素を高度に精製し、4THase の結晶化に成功した。本酵素結晶への X-線照射により 2.15Å の回折像を得た。また MAD/SAD 法による位相決定のため、セレンメチオニン (Se-Met) 置換した本酵素の結晶の作製を行い、2.8 Å の回折像を得た。これらのデータを基に本酵素の立体構造を決定する作業を行っている。

研究成果の概要（英文）：

This study has been performed to progress our knowledge about the enzymes involved in the dissimilatory inorganic sulfur metabolism in the sulfur-oxidizing bacteria. We have isolated and identified the gene encoding tetrathionate hydrolase (*Af-tth*) which is the key enzyme in the metabolism in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Although *Af-tth* was cloned and expressed in recombinant *Escherichia coli*, the recombinant proteins were synthesized in inclusion bodies as an inactive form. However, we have developed a new method to obtain the recombinant *Af-Tth* in an active form by refolding under acidic conditions. The enzyme was purified to homogeneity and crystallized. X-ray crystallographic analysis showed that the crystal diffracted to 2.15 Å resolution and belongs to space group $P3_1$ or $P3_2$ with unit-cell parameters $a = b = 92.1$, $c = 232.6$ Å. Further analyses such as multiple/single anomalous dispersion methods are required to determine the *Af-Tth* structure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：遺伝子資源

1. 研究開始当初の背景

硫黄は生命に必須の元素であり、地球上に豊富に存在する。石油の脱硫による硫黄が需要を上回って余剰状態にあることが問題となりつつある。生物的な硫黄の処理技術は、現在の所有効な手段が開発されておらず、これを開発するためには先ず、生物による硫黄代謝を理解しなければならない。従って、当該研究課題では、硫黄を好んで食べる硫黄酸化細菌の酵素を対象に、その代謝する仕組みを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究課題は、硫黄を好んで食べる硫黄酸化細菌が持つ「硫黄化合物を消化する酵素」を対象として生化学的・分子生物学的に研究し、個々の酵素の反応機構の解明や代謝における相互作用等を解明することで、これまでほとんど研究がなされていない無機硫黄化合物を代謝する酵素の知見を増やし、無機硫黄化合物の酵素化学という新たな研究分野を確立することを目的として行う。

3. 研究の方法

好酸性硫黄酸化細菌の一種 *Acidithiobacillus ferrooxidans* を研究の対象として、無機硫黄化合物をエネルギー源として培養を行い、様々な硫黄化合物に対する酸化活性を検討したところ、テトラチオン酸に対して良好な酸化能を示した。本研究ではこの代謝の鍵となる酵素、テトラチオン酸ヒドロラーゼについて詳細な解析を進めた。精製およびこれをコードする遺伝子の同定、生化学的解析、大腸菌を宿主とした組換え発現などを行い、この酵素が不溶性の封入体を形成したことから、refolding 処理による活性化を試みた。また得られた活性型酵素を高度に精製し、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を試みた。得られた結晶に対して X-線を照射し、結晶構造解析を行った。また、海洋性硫黄酸化細菌における本酵素についても遺伝子の同定や生化学的解析をすすめた。本酵素以外にも本菌の硫黄代謝において本酵素の基質であるテトラチオン酸を供給する重要な役割を果たすと考えられる、チオ硫酸デヒドロゲナーゼの精製と性質検討を行った。

4. 研究成果

(1) *A. ferrooxidans* のテトラチオン酸ヒドロラーゼの大腸菌を宿主とした組換え発現。これをコードした遺伝子 (*Af-tth*) を

大腸菌で組換え発現したところ、不溶性の封入体を形成した。このため refolding 処理による酵素の再生を行った結果、これまでに多くの報告がある中性での処理では活性の回復は認められず、酸性環境下で処理したところ活性が回復した。このことは好酸性菌由来の本酵素が、細胞質外に分泌された後に成熟して活性型となることを反映していた。酸性環境下での refolding 処理は例が無く、本研究課題において開発された新たな手法である。

(2) *Af-Tth* の結晶化。酸性 refolding 処理により活性化した本酵素を高度に精製し、結晶化を行った。約 200 通りの条件に精製した試料を供し、結晶化条件を最適化した。この結晶に X-線を照射し、2.15Å の回折像を得た。本結晶は空間群 $P3_1$ または $P3_2$ に属することが分かった。しかしながら、本酵素は新規構造を有するため、単波長・多波長異常散乱法により位相決定をする必要があった。このため、セレンメチオン置換した *Af-Tth* の結晶も作製し、X-線照射を行った。構造解析を現在進行している。

(3) チオ硫酸デヒドロゲナーゼ (*Af-Tsd*) に関する研究。*A. ferrooxidans* において本酵素は *Af-Tth* に基質であるテトラチオン酸を供給し、チオ硫酸から還元力を生成する重要な働きを担っている。本菌よりチオ硫酸デヒドロゲナーゼを精製し、性質検討、これをコードする遺伝子の同定を行った。本酵素は、硫酸結合タンパク質と複合体を形成することにより活性が変化することが明らかとなり、本菌の硫黄代謝における新たなタンパク質の存在と生理的意義について新たな知見を得た。

(4) 海洋性硫黄酸化細菌 *A. thiooxidans* SH 株由来のテトラチオン酸ヒドロラーゼ (*SH-Tth*) の研究。本酵素を SH 株より精製し、性質検討、これをコードする遺伝子の同定 (*SH-tth*) を行った。さらに大腸菌組換え発現から得られた組換えタンパク質は封入体を形成したが、*Af-Tth* 同様、refolding により活性型を獲得することに成功した。また、refolding の際に NaCl の存在により効率の向上が確認され、海洋性細菌由来の特徴を示した。

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)

総件数 6 件 (2010 年～現在)

(1) Kanao T., Kosaka M., Yoshida K., Nakayama H., Tamada T., Kuroki R., Yamada H., Takada J., Kamimura K., Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of tetrathionate hydrolase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acta Cryst.*, 査読有, F69, 2013, 692-694

(2) Kikumoto M., Nogami S., Kanao T., Takada J., Kamimura K., Tetrathionate-forming thiosulfate dehydrogenase from the acidophilic, chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 査読有, 79, 2013, 113-120

(3) Manchur M. A., Kikumoto M., Kanao T., Takada J., Kamimura K., Characterization of an OmpA-like outer membrane protein of the acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans.*, *Extremophiles*, 査読有, 15, 2011, 403-410

(4) Kanao T., Matsumoto C., Shiraga K., Yoshida K., Takada J., Kamimura K., Recombinant tetrathionate hydrolase from *Acidithiobacillus ferrooxidans* requires exposure to acidic conditions for proper folding., *FEMS Microbiol. Lett.*, 査読有, 309, 2010, 43-47

[学会発表] (計 11 件)

(1) Kanao T., Tetrathionate hydrolase from the marine acidophilic sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* strain SH, 9th International Congress on Extremophiles, 2012. 9.10~9.13, Spain Sevilla

(2) Sato T., Isolation and properties of acidophilic bacteria and the cryptic plasmid from acidic environments, 9th International Congress on Extremophiles, 2012. 9.10~9.13, Spain Sevilla

(3) 安田貴志、中等度酸性環境微生物相の解析、日本農芸化学会年次大会、2013. 3. 25., 仙台

(4) 上村一雄、鉄酸化細菌*A. ferrooxidans*のロダネース様タンパク質の機能解析、日本農芸化学会年次大会、2013. 3. 26., 仙台

(5) 金尾忠芳、鉄硫黄酸化細菌*Acidithiobacillus ferrooxidans*におけるテトラチオン酸ヒドロラーゼ遺伝子の転写と翻訳に関する研究、日本農芸化学会年次大会、2013. 3. 26., 仙台

(6) 中山久之、鉄硫黄酸化細菌*Acidithiobacillus ferrooxidans*由来テトラチオン酸ヒドロラーゼの結晶化、

(7) 金尾忠芳、海洋性硫黄酸化細菌*Acidithiobacillus thiooxidans* SH株のテトラチオン酸ヒドロラーゼに関する研究、日本農芸化学会年次大会、2012. 3. 25., 京都

(8) 菊本愛生、鉄酸化細菌*At. ferrooxidans*のチオ硫酸デヒドロゲナーゼの精製とその遺伝子の同定、日本農芸化学会年次大会、2012. 3. 25., 京都

(9) 王 揚、酸性鉱山廃水の生成に関与する新規な鉄酸化細菌、日本農芸化学会年次大会、2012. 3. 25., 京都

(10) 金尾忠芳、硫黄酸化微生物による石油脱硫硫黄の処理とCO₂固定回収技術、JOGMEC-TRCウィーク2011、2011. 11. 8. 千葉 (招待講演)

(11) Kanao T., Tetrathionate hydrolase is a key enzyme of the dissimilatory sulfur metabolism in the iron- and sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011. 9. 7. 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者
金尾 忠芳 (KANA O TADAYOSHI)
岡山大学・大学院環境生命科学研究所・准教授
研究者番号：40379813

(2)研究分担者
なし ()

(3)連携研究者
上村 一雄 (KAMIMURA KAZUO)
岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授
研究者番号：80294445