

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450482

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 (Kanao, Tadayoshi)

岡山大学・環境生命科学研究科・准教授

研究者番号：40379813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、硫黄を好んで食べる硫黄酸化細菌の「硫黄を消化(代謝)する酵素」を研究することで、その細菌が硫黄を代謝する仕組みを解明する。この理解は「無機硫黄化合物の酵素化学」という硫黄の化学として新たな研究分野を開拓することにつながる。これにより得られる知見は、石油の脱硫に伴い生じた大量の脱硫硫黄の生物的处理への応用が期待できる。我々は既に複数の硫黄酸化細菌から新規な硫黄代謝酵素を発見した。この内、テトラチオン酸ヒドロラーゼは酸性の硫黄酸化微生物にだけ確認されたユニークな酵素であり、この遺伝子の同定・組換え発現・結晶化に成功した。X線結晶構造解析により、その新規な反応メカニズムの一部を解明した。

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 sulfur-oxidizing bacteria. We have isolated and identified the gene encoding tetrathionate hydrolase (*Af-tth*) which is the key enzyme in the metabolism in sulfur-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans*. The recombinant *Af*-Tth was successfully obtained as an active form by new refolding method under acidic condition. The enzyme was crystallized to apply X-ray diffraction analysis. The 3D structure of *Af*-Tth has been determined by MAD/SAD methods with the Se-methionylated enzyme. The active center was also determined by the X-ray diffraction analysis of the crystal with tetrathionate. No cysteine residue was observed around the active center in the enzyme. It suggested that the enzyme has a unique cysteine independent reaction distinct from almost all other enzymes concerning dissimilatory sulfur-metabolism.

研究分野：応用微生物学

キーワード：硫黄酸化細菌 硫黄代謝 無機硫黄化合物 脱硫硫黄 酵素化学 酵素の結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

石油は現代文明を支えるエネルギー基盤である。しかしながら石油を燃料として利用する場合、大気汚染や酸性雨の原因となる硫黄成分を除去する必要がある。近年は、技術開発により燃料中の硫黄成分をほぼ100%除去したサルファフリー燃料として市場に供給されているが、一方で除去した硫黄(脱硫硫黄)が国内において余剰状態となり、その処理という新たな問題が生じている。これに対しては、物理的(隔離や埋立)化学的(硫安・農業肥料への変換)処理などによって凌いでいるのが現状である。世界的な石油消費の増大に伴い、脱硫硫黄の余剰も深刻化することが懸念されている。これに関して生物学的処理は現在まで有効な手段が開発されていない。我々は、硫黄を好んで食べる微生物の一種、硫黄酸化細菌を利用した生物学的脱硫硫黄の処理方法を開発することを目指して、このような硫黄酸化細菌の硫黄を消化(代謝)する酵素の基礎研究を行なった。

## 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

我々はこれまでに好酸性硫黄酸化細菌の一種 *Acidithiobacillus ferrooxidans* を研究の対象として、これの異化的硫黄代謝の全容解明を目標として、個々の酵素における詳細な解析を行ってきた。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 (*Af-tth*)、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、新たに酸性 refolding 処理を開発し、これによる活性化を試みた。得られた酵素からは活性が検出され、活性型酵素の遺伝子組換えによる大量取得に成功した。この活性型 *Af-Tth* を高度に精製した後、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。

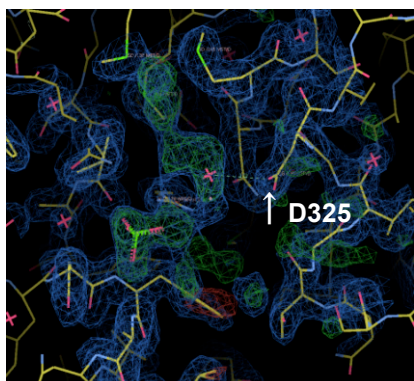
## 4. 研究成果

(1) *Af-Tth* の結晶構造解析による 3次元構造の決定。*Af-Tth* の一次配列は新規構造を有するため、分子置換法による構造決定ができなかった。このため、セレノメチオニンを取り込ませた組換え型 *Af-Tth* を作成し、これを結晶化することで多波長・単波長異常散乱法 (MAD/SAD 法) による位相の決定を行い、本酵素の立体構造の決定に成功した。本酵素結晶は 2.15Å の分解能で回折像を得た。これを基に解析したところ、本結晶は空間群  $P3_2$  に属し、本酵の構造は Class において All beta protein [48724]、Fold において 8-bladed beta propeller [50997] に分類されることが分かった。

(2) *Af-Tth* における唯一のシステイン残基の役割に関する研究。無機硫黄化合物を基質とする酵素は、ほとんど全てが活性中心にシステイン残基を有し、このチオール基が基質の硫黄原子と反応してジスルフィド結合を形成し、触媒反応を促進すると報告されている。そこで *Af-Tth* の一次構造を調べたところ、システイン残基は全 499 アミノ酸 (成熟タンパク質では 467 アミノ酸) の内、307 番目に唯一存在した (C301)。このシステイン残基の役割を調べるために、部位特異的変異導入によってシステイン残基をアラニン残基に置換した変異酵素 (*Af-Tth* C301A) を作成した。本変異酵素は、野生型酵素と同様に組換え発現、酸性 refolding によって可溶性画分に検出されただけでなく、4THase 活性も野生型と同等レベルで検出できた。さらにホモダイマー構造に関しても野生型酵素と同等の挙動を示したため、ダイマーの形成に関与するものでもないことが分かった。以上のことから、本酵素に存在する唯一のシステイン残基は特別な役割を担う残基ではないことが分かったが、同時に本酵素がシステイン残基に依存しないこれまでの硫黄代謝関連酵素とは異なる新たな反応機構によって触媒活性を持つことが強く示唆された。

(3) 結晶構造解析による *Af-Tth* の反応機構の解明。本酵素の新たな反応機構が示唆されたため、これを解明するために本酵素の結晶を基質であるテトラチオン酸溶液に浸漬し、X-

線結晶構造解析を行った。これにより 2.0Å を下回る分解能で基質であるテトラチオン酸と推定される電子雲を特定し、本酵素の活性中心と期待される基質結合部位を決定することができた。(下図)



そしてこの基質の電子雲に関与できる距離にアスパラギン酸残基 (D325) が存在し、その左下に切断された生成物と推定される硫酸イオンの電子雲も観察できた。そこで、この D325 をアスパラギン残基に置換した部位特異的変異酵素 (*Af-Tth* D325N) を作成した。本変異酵素も野生株と同様に組換え発現、酸性 refolding 処理により可溶性タンパク質として獲得できた。しかしながら本酵素活性は完全に消失しており、この D325 残基が活性に関わる重要な残基であることが分かった。また本変異酵素 (D325N) も X-線結晶構造解析を行い、立体構造において野生型のもと同ーであることも確認しており、この活性の消失は refolding の不具合によるものではないことも証明されている。以上の結果より、本酵素の反応の第一段階において D325 残基が関与した反応機構を解明することができた。

(4) 海洋性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* SH 株の 4THase に関する研究。我々の研究室にて単離された海洋性硫黄酸化細菌の一種、SH 株からも 4THase 活性が検出されたため、これについての研究を行った。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、NaCl の存在により活性化されることが確認され、海洋性細菌由来の特徴を示した。

(5) 海洋性硫黄酸化細菌 *A. thiooxidans* SH 株のチオ硫酸デヒドロゲナーゼに関する研究。SH 株の硫黄代謝の解明のために、本菌株よりチオ硫酸デヒドロゲナーゼ (SH-Tsd) の精

製を試みた。各種カラムクロマトグラフィーによって電気泳動的に単一に精製し、諸性質の検討を行った。精製酵素タンパク質をトリプシン消化し、断片を質量分析することで内部配列を決定した。この情報を基に本酵素をコードする遺伝子を特定したが、それから推定した一次構造は、従来報告されている主要なチオ硫酸デヒドロゲナーゼ (Tsd) とは全く異なる新規な構造を持つ Tsd であることが分かった。

## 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)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Characterization of a novel thiosulfate dehydrogenase from a marine acidophilic sulfur-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus thiooxidans* strain SH., Sharmin S., Yoshino E., Kanao T., Kamimura K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80: 273-278 (2016) 査読有  
DOI: 10.1080/09168451.2015.1088377

2. The sole cysteine residue (Cys301) of tetrathionate hydrolase from *Acidithiobacillus ferrooxidans* does not play a role in enzyme activity., Kanao T., Nakayama H., Kato M., Kamimura K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78: 2030-2035 (2014) 査読有  
DOI: 10.1080/09168451.2014.948374.

[学会発表] (計 15 件)

1. 長谷成記、小坂恵、玉田太郎、上村一雄、金尾忠芳、鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 由来テトラチオン酸ハイドロラーゼの結晶構造解析、日本農芸化学会年次大会、2017. 3.17-20. 「京都女子大 (京都)」

2. 大西萌映、上村一雄、金尾忠芳、海洋性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* 由来テトラチオン酸ハイドロラーゼに関する研究、日本農芸化学会中四国支部例会、2017. 1. 28, 「島根大学 (島根)」

3. 吉野永里子、金尾忠芳、上村一雄、チオ硫酸で生育した海洋性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* の末端酸化酵素の性質、日本農芸化学会中四国支部例会、2017. 1. 28, 「島根大学 (島根)」

4. 長谷成記、中山久之、小坂恵、玉田太郎、

上村一雄、金尾忠芳、鉄硫黄酸化細菌 *Acidithio- bacillus ferrooxidans* 由来テトラチオン酸ハイドロラーゼの結晶構造解析、日本生物工学会年次大会、2016. 9.28-30.「富山市（富山）」

5. 吉野永里子、金尾忠芳、上村一雄、硫黄酸化細菌 *A. thiooxidans* SH 株の末端酸化酵素の解析、日本生物工学会年次大会、2016. 9.28-30.「富山市（富山）」

6. Kanao T., Hase N., Nakayama H., Kamimura K., The role of the sole cysteine residue (C301) of tetrathionate hydrolase from the acidophilic sulfur-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans.*, International Society for Extremophiles, 2016. 9.12-16.「京都大学（京都）」

7. 金尾忠芳、無機硫黄化合物を基質とする新規酵素の構造と機能解析、酵素応用シンポジウム、2016. 6. 3.「名古屋（愛知）」

8. 長谷成記、中山久之、小坂恵、玉田太郎、上村一雄、金尾忠芳、鉄硫黄酸化細菌 *Acidithio- bacillus ferrooxidans* 由来テトラチオン酸ハイドロラーゼの結晶構造解析、日本農芸化学会年次大会、2016. 3.28-30.「札幌（北海道）」

9. 金尾忠芳、スルタナ シャーミン、上村一雄、海洋性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* SH 株のゲノム解析、日本農芸化学会年次大会、2016. 3.28-30.「札幌（北海道）」

10. 上村一雄、高田弓梨乃、金尾忠芳、*A. ferrooxidans* の新チオ硫酸代謝酵素系の解析、日本農芸化、2016. 3. 28-30, 「札幌（北海道）」

11. 高田弓梨乃、大西裕有、金尾忠芳、上村一雄、*Acidithiobacillus ferrooxidans* の新規チトクローム c の機能解析、日本農芸化学会中四国支部例会、2016. 1. 23, 「岡山県立大学（岡山）」

12. Sultana Sharmin, 金尾忠芳、上村一雄、Draft genome sequence of acidophilic and halophilic sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus thio- oxidans.*, 日本農芸化学会中四国支部例会、2015. 6. 13, 「鳥取大学（鳥取）」

13. 田原奈津美、上村一雄、金尾忠芳、鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* の異なる生育基質におけるタンパク質の解析、日本農芸化学会中四国支部例会、2015. 1. 24, 「水産大学校（山口）」

14. 秋田康裕、金尾忠芳、上村一雄、鉄酸化細菌のチオ硫酸デヒドロゲナーゼの性質、日本農芸化学会中四国支部例会、2015. 1. 24, 「水産大学校（山口）」

15. Sultana Sharmin, Tadayoshi Kanao, Kazuo Kamimura, Purification and properties of thiosulfate dehydrogenase from marine *Acidithiobacillus thiooxidans.*, 日本農芸化学会中四国支部例会、2015. 1. 24, 「水産大学校（山口）」

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

〔その他〕

以下の論文は 2014 年度 BBB 論文賞を受賞した。受賞年月 2015. 3.

The sole cysteine residue (Cys301) of tetrathionate hydrolase from *Acidithiobacillus ferrooxidans* does not play a role in enzyme activity., Kanao T., Nakayama H., Kato M., Kamimura K., Biosci. Biotechnol. Biochem., 78: 2030-2035 (2014)

以下の研究題目で、酵素応用シンポジウム研究奨励賞を受賞した。受賞年月 2016. 6.

「無機硫黄化合物を基質とする新規酵素の構造と機能解析」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金尾 忠芳 (KANAOK, Tadayoshi)

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

(2) 連携研究者

玉田 太郎 (TAMADA, Taro)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・上席研究員

研究者番号：50391248

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