

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14590

研究課題名(和文)無機的環境下における真菌類の単体硫酸化と化学合成によるエネルギー生成

研究課題名(英文)Oxidation of sulfur and chemolithotrophic energy production by fungi under inorganic condition

研究代表者

片山 葉子 (Katayama, Yoko)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90165415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：真菌類は有機物を利用する従属栄養性の微生物と考えられてきたが、独立栄養的な生育も数多くの真菌株に見つかっている。これらは有機物の存在しない条件においても硫黄を酸化し、大気微量成分であるCOSを加水分解することができる。内生細菌を除去したFusarium solani THIF01株およびF. solani NBRC9425について、硫黄を含む無機塩培地での生育を確認した。土壌環境が大気中のCOSの主要な消失源であることから、土壌に広く生息する真菌としてTrichoderma sp. THIF08を用いてCOS分解酵素の精製を行った。以上の結果、真菌の新たな硫黄代謝の重要性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Although heterotrophic growth requirement has been considered as the fundamental characteristics for the organisms in the domain fungi, chemolitho-autotrophic growth ability have been observed in various fungi isolated from soils and the deteriorated stone. These fungal isolates oxidized elemental sulfur in the absence of organic substances and hydrolyzed carbonyl sulfide. Endobacterium-free Fusarium solani strain THIF01 that was cured with antibiotics and F. solani strain NBRC9425 proliferated in the mineral salts medium supplemented with elemental sulfur as the sole energy source, indicating the growth ability of these fungi by oxidizing elemental sulfur without organic matter. Isolation of COS degrading enzyme was also conducted by using Trichoderma sp. strain THIF08 to understand metabolism of inorganic sulfur compound by fungi that is one of the major microorganisms in soil environments.

研究分野：環境微生物学

キーワード：硫酸化微生物 真菌類 化学合成的増殖 単体硫酸化 硫化カルボニル分解

1. 研究開始当初の背景

真核生物である真菌類は、有機物のみを資化する従属栄養性の生物であるとされており、単体硫黄(S⁰)やチオ硫酸塩の酸化に伴い硫酸イオンの生成は確認されてはきたものの、有機物の共存する条件下でのみ見られる現象と理解されてきた。カンボジアのアンコール遺跡では石材の劣化が著しく、遺跡保存を行う上で問題となっているが、ここから分離された *Fusarium solani* THIF01 株には、S⁰を含む無機塩培地において、S⁰酸化と共に増殖することも観察され、化学合成無機独立栄養性の特徴も備わっていることが確認されている(Li *et al.*, 2010)。同様の生理学的特徴を示す真菌は、THIF01 株以外にも複数の分離株において見られることが我々の研究によって確認されており、これまで細菌やアーキアのみ知られていた、硫黄を基質とする独立栄養的生育は、実は真菌類にも広く見られる現象ではないかと予想している。また、大気微量成分であり硫黄化合物の中では最大の存在量を示すことで知られる硫化カルボニル(COS)は、その消失源として土壌環境が重要であり、高い分解活性を有する微生物として細菌だけでなく多数の真菌株も見つかっている。このように COS に対する代謝能も S⁰と同様に多くの真菌に存在し、自然界の硫黄循環における真菌類の貢献は高いものであることが予想される。一方、THIF01 株には *Bradyrhizobium* 属の細菌が内在しており、これらの細菌が硫黄酸化に関与している可能性もまだ残されたままである。

2. 研究の目的

これまで還元型硫黄化合物の酸化に関しては細菌とアーキアを中心に調べられてきており、真菌類を対象とした報告は限られている。本研究では、まず(1) THIF01 株の内生細菌の除去を試み、これまで観察されてきた硫黄酸化活性が内生細菌によるものではないことを明らかにした。さらに、(2)カルチャーコレクションから分与された真菌株の中から、内生細菌が確認されず、しかも硫黄酸化活性の高い株を選び、硫黄酸化に伴う独立栄養的な特性が THIF01 株以外の真菌類にも見られるものであるのかどうかを調べるとともに、培養基質に有機物質が加わることにより硫黄酸化並びに生育はどのような影響を受けるかを調べた。また、(3)大気中に 500 pptv 前後の濃度で存在する COS は、これを分解可能な生物にとっては大気からの硫黄源として機能することが考えられる。しかし、真菌類では COS 分解酵素に関する報告はなく、その分解のメカニズムは不明である。そこで大気濃度 COS を取り込むことが可能な真菌株を用いて COS 分解酵素の探索を行った。

3. 研究の方法

(1) 劣化石材から分離された *F. solani* THIF01 株を用いて、単孢子分離および抗生物質による内生細菌の除去を試みた。細菌が取り除かれたかどうかの確認は、16S rRNA 遺伝子をターゲットにした PCR の結果に基づいて行った。S⁰の酸化に伴う培地の pH 低下を調べた。

(2) S⁰を基質とする生育及びその酸化活性の試験には *F. solani* NBRC 9425 を供試した。培養は WS-5 無機塩培地をベースとし、30°C、暗所において好氣的に行った。S⁰の酸化は培地 pH の低下ならびに硫酸イオン生成を、生育量は真菌類の細胞膜に存在するエルゴステロールを指標とした。無機塩培地への前培養からの持込を最小限にするために、前培養の寒天平板培地上に形成された胞子を回収し、それを滅菌水で十分に洗浄後、接種に用いた。

(3) COS 分解酵素の探索には、土壌から分離された、大気濃度 COS に対する取り込み活性の確認された *Trichoderma* sp. THIF20 株を供試した。PDA 生育菌体を破砕後、カラムクロマトグラフィーによりタンパク質の精製を行った。大気濃度 COS の定量は、液体酸素下で濃縮後に FPD-GC により行った。

4. 研究成果

(1) 内生細菌除去後の硫黄酸化活性

THIF01 株に内生する *Bradyrhizobium* 属細菌を、単孢子分離あるいは培地に抗生物質を添加することで除去することを試みた。その結果、carbenicillin, ciprofloxacin などの抗生物質により内生細菌は除去され、内生細菌フリー株を得ることができた。単孢子分離は本菌株の細菌除去には有効ではなかった。細菌フリー THIF01 株を、S⁰を唯一のエネルギー源とする無機塩培地に接種後、好氣的に培養し経時的に培地 pH の変化を調べた。その結果、初期 pH 4.8 から、培養開始後 28 日目には硫酸イオンの生成に伴い pH 3.8 まで低下した(表 1)。この結果、本菌株で見られる硫黄酸化は内生細菌に因るものではなく、*F. solani* THIF01 株自体によるものであることが確認され、真菌である *Fusarium* には硫黄を酸化することで無機的環境においても独立栄養的又は混在する微量有機物を用いた生育が可能であることが初めて示された。

培養時間 (日)	内生細菌フリー	内生細菌あり	未接種
5	4.4	4.4	4.7
12	4.0	3.8	4.7
28	3.8	3.5	4.7

表 1 *F. solani* THIF01 の内生細菌除去後の S⁰-無機塩培地における硫黄酸化

(2) *F. solani* NBRC 9425 の硫黄酸化

カルチャーコレクション由来の *Amylomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Gliocladium*, *Trichoderma* 属の 18 株の真菌の中から、PCR 法によって内生細菌が確認されず、寒天平板培地上の培養によって硫黄の溶解に伴う明確なクリアゾーン形成が見られる 7 株を、更にその中から硫酸イオン生成の最も盛んな *F. solani* NBRC 9425 を選び、以下の実験に用いた。

本菌株は S^0 を基質とする WS-5 培地では、培養開始後 30 日目では 0.1 mM の硫酸イオンが、また真菌の増殖の指標としたエルゴステロール量は 14 mg/L にまで増加することを確認した。DAPI 染色後の蛍光顕微鏡観察では、 S^0 の粒子表面は菌糸によって密に覆われていた。また、WS5 の成分から硫酸塩を塩化物に変換した培地を用いた場合に、チオ硫酸塩を添加することで、生育は約 3 倍に、また硫酸イオンの生成量は約 2.3 倍に増え、生育促進効果の見られることが確認された。硫酸酸化活性を有する菌体をより多く得ることを目的に、培地へ添加する有機物質の濃度の影響を調べた結果、酵母エキスの場合は 15 mg/L の濃度で最大の活性が、グルコースでは 1-10 mg/L の濃度範囲において菌体量の増加と共に硫酸酸化に伴う硫酸イオンの増加が見られた。これらの結果は、低濃度の有機物質によって硫酸酸化は促進が見られるものの、全く添加していない系においても硫酸イオンの生成が見られ、有機物を添加していない条件においても、THIF01 株と同様に完全な硫酸酸化反応が進行していることを示す。

S^0 およびチオ硫酸塩を加えた培地あるいは有機物を生育基質とした培地を用いて培養した菌体について、可溶性タンパク質の二次元電気泳動法により比較を行った。その結果、特に分子量 40-60 kDa の範囲において複数のスポットが出現しており、両培養系における細胞内代謝系の著しい変動が確認された(図 1)。

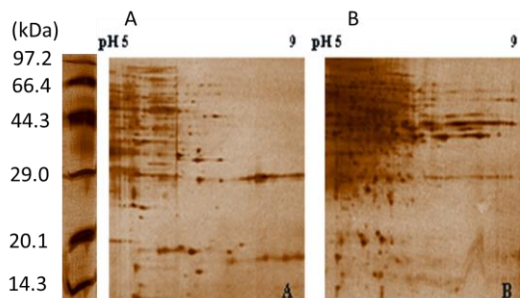


図 1 *F. solani* NBRC 9425 の可溶性画分の二次元電気泳動像

A. マルトース生育菌体、B. S^0 + チオ硫酸塩生育菌体

(3) COS 分解酵素の精製

細菌やアーキアなど、様々な微生物による COS 分解が報告されているにも関わらず、真菌についての COS 分解の報告はない。特に、森林土壌では真菌は重要な分解者として広

く知られており、生態系の物質循環に大きく寄与しており、そのバイオマスは細菌に匹敵する場合もあることが知られている。本研究では、土壌から分離し、大気濃度 COS を分解することが示されている真菌 7 菌株について、その分解速度を比較し、最も優れた THIF08 株を選び、以下の実験に用いた(図 2)。

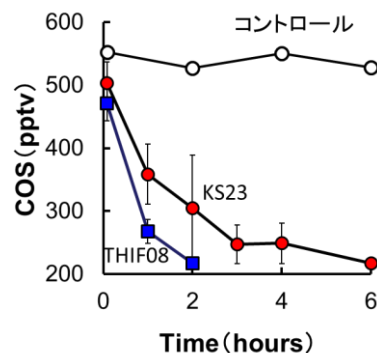


図 2. 森林土壌から分離された真菌による大気濃度 COS の取り込み。THIF08 及び KS23 の結果を示す。

PD 液体培地で培養した *Trichoderma* sp. THIF08 株の菌体を破碎後、その粗抽出液を硫酸アンモニウム分画、カラムクロマトグラフィーによる精製後、プロテインシーケンサーによって N 末端アミノ酸配列を 10 アミノ酸残基について決定することができ、この配列をもとに COS 分解酵素遺伝子のクローニングを行い大腸菌で発現させたところ COS 分解が確認された(図 3)。

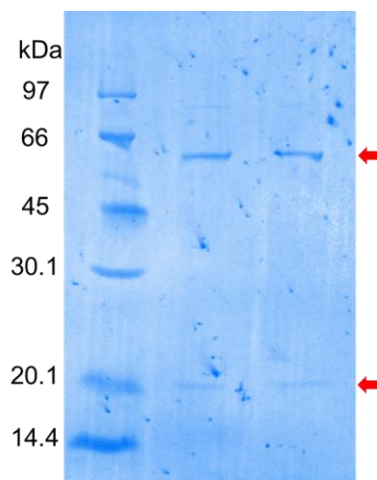


図 3 THIF08 株から部分精製された COS 分解酵素の PVDF へのウエスタンブロッティング後の CBB 染色像。~20 kDa のバンドの N 末端アミノ酸配列決定、クローニングされた遺伝子を *E. coli* で発現させたところ、COS 分解活性が確認された。

本研究では、 S^0 および COS を基質として、カルチャーコレクションから分与、あるいは土壌から分離された菌株を用いて、その代謝

活性を比較検討するとともに、有機物が共存する場合の無機硫黄の利用における影響の表れ方についても検討を行った。これらの研究から得られた成果は、真菌類では初めての報告といえるものであり、今後のより広範な検証が実施されることが期待される。今回調査した菌株における、 S^0 と COS の代謝の連携については、情報はまだ充分とは云えない。しかし、近年 H_2S が細胞シグナルとして機能することが注目されており、COS 分解の反応産物が H_2S であることなどから、今後はこれらの生理活性との相関にも目を向けた研究を進めることが重要であるといえる。

<引用文献>

- ① Li XS, Sato T, Ooiwa et al. Oxidation of elemental sulfur by *Fusarium solani* strain THIF01 harboring endobacterium *Bradyrhizobium* sp. *Microbial Ecol.* 60, 96-104, 2010.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- ① Ihara H, Hori T, Aoyagi T, Takasaki M, Katayama Y. Sulfur-oxidizing bacteria mediate microbial community succession and element cycling in launched marine sediment. *Front. Microbiol.* 8, 152, 2017. DOI:10.3389/fmicb.2017.00152 (査読有)
- ② Meng H, Luo L, Chan HW, Katayama Y., Gu JD. Higher diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea than bacteria detected at the Bayon Temple of Angkor Thom in Cambodia. *Int. Biodeter. Biodeg.* 115, 234-243, 2016. DOI:org/10.1016/j.ibiod.2016.08.021 (査読有)
- ③ Ogawa T, Kato H, Higashide M, Nishimiya M, Katayama Y. Degradation of carbonyl sulfide by Actinomycetes and detection of clade D of β -class carbonic anhydrase. *FEMS Microbiol Lett.* 363, fnw223, 2016. DOI:10.1093/femsle/fnw223 (査読有)
- ④ Okuda T, Lin F, Nakai S, Nishijima W, Katayama Y., Okada M. Effect of changes in the physicochemical properties of sand-alternatives on community structure in coastal sediments. *Ecol. Eng.* 88, 177-185, 2016. DOI:10.1016/j.ecoleng.2015.12.025 (査読有)
- ⑤ Kamezaki K, Hattori S, Ogawa T, Toyoda S, Kato H, Katayama Y., Yoshida N. Sulfur isotopic fractionation of carbonyl sulfide during degradation by soil bacteria. *Env. Sci. Technol.* 50, 3537-3544, 2016. DOI:10.1021/acs.est.5b05325 (査読有)

- ⑥ Masaki Y., Ozawa R, Kageyama K, Katayama Y. Degradation and emission of carbonyl sulfide, an atmospheric trace gas, by fungi isolated from forest soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 363, fnw197, 2016. DOI:10.1093/femsle/fnw197 (査読有)

[学会発表] (計11件)

- ① 猪原英之、堀知行、高崎みつる、片山葉子. 打ち上げられた海洋堆積物の微生物群集構造の鉛直変化及び硫黄循環への影響、日本水環境学会年会、2017年3月16日、熊本大学(大分県・熊本市)
- ② 猪原英之、堀知行、青柳智、高崎みつる、片山葉子. 海洋性硫黄酸化細菌のCOS分解特性、日本農芸化学会2017年度大会、2017年3月19日、京都女子大学(京都府・京都市)
- ③ 猪原英之、堀知行、高崎みつる、片山葉子. Redox環境の変化に適応できる津波堆積物由来の新規硫黄酸化細菌の特徴、日本微生物生態学会第31回大会、2016年10月23, 24日、横須賀市文化会館(神奈川県・横須賀市)
- ④ Ogawa T, Katayama Y. Substrate recognition mechanism of carbonyl sulfide hydrolase from *Thiobacillus thioparus* THI115. The 5th International Conference on Cofactors and Active Enzyme Molecule 2016. September 4-8, 2016. 黒部市宇奈月国際会館「セレン」(富山県・黒部市)
- ⑤ Katayama Y. Bacterial enzymes involved in emission and degradation of carbonyl sulfide. The Biosphere-Atmosphere Exchange and Global Budget of Carbonyl Sulfide Workshop. September 8, 2016. Hyttiälä, Finland.
- ⑥ Ogawa T, Masaki Y., Inomata S, Ozawa R, Nishimiya M, Higashide M, Kageyama K, Katayama Y. Emission of carbonyl sulfide by bacteria and fungi. The Biosphere-Atmosphere Exchange and Global Budget of Carbonyl Sulfide Workshop. September 5-9, 2016. Hyttiälä, Finland.
- ⑦ Ihara H, Hori T, Takasaki M, Katayama Y. Isolation of sulfur-oxidizing bacteria playing the critical role in element cycling in tsunami sediment under aerobic condition. 16th International Symposium on Microbial Ecology, Montreal, Canada, August 23, 2016.
- ⑧ Xu H., Katayama Y. Physiology of *Fusarium solani* f. sp. *pisi* using elemental sulfur as the sole energy source. The Second International Conference on Engineering and Natural Science. July 23, 2015. 早稲田大学(東京都・新宿区)
- ⑨ 中村聡美、龍田典子、上野大介、片山葉子. 染谷孝. アンコール遺跡バイオン寺院における石材劣化に及ぼす雨漏り滴下水

とコウモリグアノの影響、日本土壌微生物学会 2015 年度大会、2015 年 5 月 23 日、つくば国際会議場（茨城県・つくば市）

- ⑩ Gu JD, Katayama Y. Involvement of microbes in cultural heritage protection at Angkor Thom, Cambodia. 44th Annual Meeting of American Institute for Conservation. May 15-18, 2016. Montreal, Canada
- ⑪ Katayama Y, Ogawa T, Kato H. Degradation of carbonyl sulfide, an atmospheric sulfur compound, by Actinobacteria and fungi. EMBO Workshop on Microbial Sulfur Metabolism. April 12-15, 2015. Helsingor, Denmark.

〔図書〕（計 1 件）

- ① 太田寛行、難波謙二、諏訪裕一、片山葉子（共訳）微生物の地球化学 元素循環をめぐる微生物学 第3版 東海大学出版 2015年 216ページ。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 葉子 (KATAYAMA, Yoko)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：90165415

(2) 研究協力者

徐 海博 (XU, Haibo)
正木啓仁 (MASAKI Yoshihito)
高原 勇 (TAKAHARA Yu)