

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08169

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) Establishment of enzymatic chemistry (enzymology) of inorganic sulfur compounds and its applications

研究代表者

金尾 忠芳 (Kanao, Tadayoshi)

岡山大学・環境生命科学学域・准教授

研究者番号：40379813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：無機硫黄化合物の酵素化学の対象として、まずは硫黄酸化細菌の一種*Acidithiobacillus ferrooxidans*由来のテトラチオン酸ヒドロラーゼ(*Af*-Tth)について研究を行った。我々は既に本酵素コードする新規な遺伝子を初めて同定し、独自に開発した酸性refoldingによる活性型酵素の取得とこれの結晶化に成功した。得られた本酵素の結晶を基質であるテトラチオン酸とともにX-線結晶構造解析することで、そのユニークな反応メカニズムの解明を目指している。本研究では、*Af*-TthのD325がテトラチオン酸を加水分解する重要な残基であることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

硫黄酸化細菌 *A. ferrooxidans* 由来のテトラチオン酸ヒドロラーゼは、無機硫黄化合物のテトラチオン酸を基質として加水分解し、単体硫黄、チオ硫酸および硫酸を生成するユニークな酵素である。この触媒メカニズムを解明するべく、我々は本酵素のX-線結晶構造解析を行った結果、325番目のアスパラギン酸残基(D325)が基質の加水分解に関わっていることを実証した。現在まで無機硫黄化合物の代謝に関わる酵素は、ほとんどがシステイン残基を介しており、アスパラギン酸残基を触媒とする新たな反応を発見したことは学術的に極めて重要である。また脱硫硫黄の生物学的処理への知見を蓄積するため、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：As a target for enzymatic chemistry of inorganic sulfur compounds, we studied tetrathionate hydrolase (*Af*-Tth) from *Acidithiobacillus ferrooxidans*, one of the sulfur-oxidizing bacteria. We have already identified a novel gene encoding this enzyme for the first time, and succeeded in obtaining the active form of the recombinant enzyme by acidic refolding treatment, which we originally developed, also in crystallizing it. We are now working to elucidate the unique reaction mechanism of this enzyme by X-ray crystallographic analysis of the obtained crystals together with its substrate, tetrathionate. In this study, we demonstrated that D325 of *Af*-Tth is an important residue for hydrolyzing tetrathionate molecule.

研究分野：応用微生物化学

キーワード：無機硫黄化合物 酵素化学 硫黄酸化細菌 異化的硫黄代謝 環境微生物 脱硫硫黄 独立栄養細菌 応用微生物学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 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。このような現状において生物的な硫黄の処理は現在まで有効な手段が開発されていない。生物的处理については、一般に常温・常圧、省エネルギー、低コスト、低環境負荷に優れた技術であり、大気中の温室効果ガスの蓄積による気候変動など様々な環境問題が唱えられる時代において、その重要性がますます高まっている。

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。このような基礎研究は、「無機硫黄化合物の酵素化学」という新たな学術分野を確立することができ、微生物の代謝における多様性から新たな硫黄の化学における知見を得ることができる。したがってサイエンスの深化にも大きく貢献することも期待できる。既に硫黄酸化細菌の一種である *Acidithiobacillus ferrooxidans* を研究の対象として、本菌由来の極めてユニークな無機硫黄化合物代謝酵素の一つテトラチオン酸ヒドロラーゼ(4THase)の精製と性質決定を行い、これをコードする遺伝子(*Af-tth*)を世界で初めて同定した。さらに本遺伝子の転写制御に関する研究や大腸菌異種組換え発現、および独自に開発した酸性 refolding 法による活性型酵素の取得に成功した。またこれを高度に精製し、様々な条件検討を行った末に結晶化にも成功した。

## 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った。さらには当研究室で分離培養に成功した新種の海洋性硫黄酸化細菌 SH 株についてもその硫黄代謝と関連酵素の解明を目指して取り組んだ。これらの理解を深めることで、最終的に石油脱硫硫黄の生物的処理に向けた有効な手段を探索していく。

## 3. 研究の方法

まずは硫黄酸化細菌の一種 *A.ferrooxidans* 由来の極めてユニークな酵素、テトラチオン酸ヒドロラーゼ(*Af-Tth*)を足掛かりに詳細な解析を行った。本酵素を大腸菌組換え体から封入体として回収後、酸性 refolding 処理によって活性型 *Af-Tth* を獲得した。これをカラムクロマトグラフィーによって高度に精製し、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって結晶化した。得られた結晶は基質であるテトラチオン酸を浸漬して X-線結晶構造解析することで、酵素の立体構造を決定するだけでなく、基質の結合部位や活性に関わるアミノ酸残基、そして生成物の分子についての知見を得ることができる。得られたデータを詳細に解析することで、その反応メカニズムの解明を目指す。本酵素の反応メカニズムを知ることにより、無機硫黄化合物の酵素化学について知見を蓄積する。そして *Af-Tth* の生成物であるチオ硫酸の代謝に関わる酵素の解明や、本菌におけるその他の無機硫黄化合物の代謝関連酵素に

についても同定し、順次解析を行う。海洋性硫黄酸化細菌 SH 株においては全ゲノム解析を行い、その代謝関連遺伝子に迫った。

#### 4. 研究成果

##### (1) X-線結晶構造解析を基にしたテトラチオン酸加水分解メカニズムの解明

Af-Tth の結晶に基質であるテトラチオン酸を浸漬処理した後、X-線照射実験を行い、1.95 オングストロームの解像度で得られたデータを解析した。その結果、生成物と推定される硫酸イオンの電子密度を確認し、基質および中間体と考えられる電子密度も確認できた。これら基質であるテトラチオン酸に由来する電子密度に関与できる距離に本酵素のアスパラギン酸 325 (D325) の存在が明らかとなった。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のと同一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。図 1 にその反応メカニズムを示した。

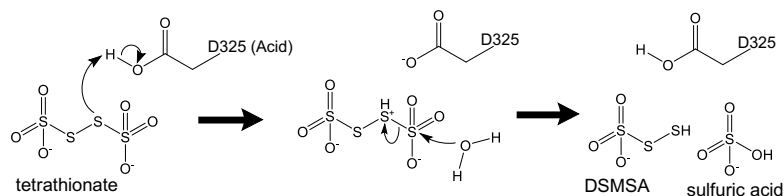


図 1. D325 が関与する Af-Tth のテトラチオン酸加水分解メカニズム

D325 によって基質のテトラチオン酸の α 位の硫黄原子がプロトン化されることで、末端のスルホン基が水の求核攻撃を受けて脱離する。これにより硫酸イオンとジサルファンモノスルホン酸 (DSMSA) が生成する。

##### (2) 海洋性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus* sp. SH 株の全ゲノム解析

当研究室において瀬戸内海 (岡山県牛窓沿岸) の海水より分離培養に成功した、2% 塩化ナトリウムを最適な生育に要求する海洋性好酸性硫黄酸化細菌 SH 株について、次世代シーケンサーによる全ゲノム配列の決定とゲノム解析を行った。

本菌株のゲノムは約 2.9 Mbp であり、2978 遺伝子の内 52 の遺伝子は RNA に関する遺伝子であり、タンパク質をコードしている遺伝子は 2844 個と推定された。Rubisco 遺伝子を筆頭にカルビンサイクルに関連すると推定される遺伝子群、硫黄代謝に関わる SOX クラスタが存在した。さらにテトラチオン酸ヒドロラーゼ遺伝子、2つのチオ硫酸キノン酸化還元酵素、硫化水素キノン酸化還元酵素などの硫黄代謝関連酵素遺伝子も確認できた。

##### (3) 海洋性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus* sp. SH 株の新規なチオ硫酸キノン酸化還元酵素

本研究課題の先行研究において、SH 株のチオ硫酸キノン酸化還元酵素 (TQO) の精製と性質の検討およびコードする遺伝子 (SH-*tqo*) については特定していたが、今回新たに本菌株の全ゲノム解析結果と照合して本酵素遺伝子のゲノムにおける位置付けとその周辺の遺伝子、およびこれらを *Acidithiobacillus* 属近縁種のゲノムと比較解析した。その結果、近縁種である *Acidithiobacillus caldus*, および *A. thiooxidans* のゲノム上に SH-*tqo* 遺伝子ホモログは存在しなかった。さらに SH-*tqo* 遺伝子のすぐ下流にはトランスポゾンと相同性を示す遺伝子が確認でき、この新規な TQO は水平伝播によって本菌株が独自に獲得したことが推定された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanao Tadayoshi, Hase Naruki, Nakayama Hisayuki, Yoshida Kyoya, Nishiura Kazumi, Kosaka Megumi, Kamimura Kazuo, Hirano Yu, Tamada Taro	4. 巻 30
2. 論文標題 Reaction mechanism of tetrathionate hydrolysis based on the crystal structure of tetrathionate hydrolase from <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 328 ~ 338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3984	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 -
1. 著者名 Kanao Tadayoshi, Sharmin Sultana, Tokuhisa Mirai, Otsuki Maho, Kamimura Kazuo	4. 巻 171
2. 論文標題 Identification of a gene encoding a novel thiosulfate:quinone oxidoreductase in marine <i>Acidithiobacillus</i> sp. strain SH	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Research in Microbiology	6. 最初と最後の頁 281 ~ 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resmic.2020.09.004	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 該当する
1. 著者名 Kanao Tadayoshi, Onishi Moe, Kajitani Yasuyuki, Hashimoto Yuki, Toge Tatsuya, Kikukawa Hiroshi, Kamimura Kazuo	4. 巻 82
2. 論文標題 Characterization of tetrathionate hydrolase from the marine acidophilic sulfur-oxidizing bacterium, <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> strain SH	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 152 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2017.1415128	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 Kamimura Kazuo, Sharmin Sultana, Yoshino Eriko, Tokuhisa Mirai, Kanao Tadayoshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of <i>Acidithiobacillus</i> sp. Strain SH, a Marine Acidophilic Sulfur-Oxidizing Bacterium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Announcements	6. 最初と最後の頁 e01603 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/genomeA.01603-17	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 國久智紀, 扇元修志, 田村隆, 上村一雄, 金尾忠芳
2. 発表標題 鉄硫黄酸化細菌 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> を宿主とした組換え発現系の構築
3. 学会等名 日本生物工学会西日本支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金尾忠芳, 扇元修志, 國久智紀, 田村隆, 上村一雄
2. 発表標題 鉄硫黄酸化細菌 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> を宿主とした組換え発現系の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuji Ohgimoto, Moe Onishi, Kazuo Kamimura, Tadayoshi Kanao
2. 発表標題 Characterization of tetrathionate hydrolase from the marine acidophilic sulfur-oxidizing bacterium, <i>Acidithiobacillus</i> sp. strain SH
3. 学会等名 23rd International Biohydrometallurgy symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadayoshi Kanao, Kazumi Nishiura, Megumi Kosaka, Kazuo Kamimura, Taro Tamada
2. 発表標題 Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of tetrathionate hydrolase from <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .
3. 学会等名 23rd International Biohydrometallurgy symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maho Otsuki, Tadayoshi Kanao, Sultana Sharmin, Mirai Tokuhisa, Kazuo Kamimura
2. 発表標題 Characterization of the novel thiosulfate: quinone oxidoreductase from a marine acidophilic sulfur-oxidizing bacterium, Acidithiobacillus thiooxidans sp. strain SH
3. 学会等名 23rd International Biohydrometallurgy symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanao T.
2. 発表標題 Characterization of tetrathionate hydrolase from a the marine acidophilic sulfur-oxidizing bacterium, Acidithiobacillus thiooxidans strain SH
3. 学会等名 5th International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kamimura K., Sultana S., Ohtsuki M., Tokuhisa M., Kanao T.
2. 発表標題 Characterization of the novel thiosulfate:quinone oxidoreductase from a marine acidophilic sulfur-oxidizing bacterium, Acidithiobacillus sp. strain SH
3. 学会等名 5th International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田くみ子、金尾忠芳、上村一雄
2. 発表標題 Acidithiobacillus ferrooxidans のチオ硫酸代謝に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井原里弥、上村一雄、金尾忠芳
2. 発表標題 鉄硫黄酸化細菌 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> 由来Sulfide:quinone oxidoreductaseに関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金尾忠芳、藤原孝太、上村一雄
2. 発表標題 好酸性従属栄養細菌への外来遺伝子導入と組換え発言系の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金尾忠芳、長谷成記、小坂恵、上村一雄、玉田太郎
2. 発表標題 鉄硫黄酸化細菌 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> 由来テトラチオン酸ハイドロラーゼの構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上村一雄、徳久未来、金尾忠芳
2. 発表標題 海洋性好酸性硫黄酸化細菌のチオ硫酸デヒドロゲナーゼの遺伝子解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金尾忠芳、上村一雄
2. 発表標題 海洋性硫黄酸化細菌Acidithiobacillus thiooxidans SH株由来テトラチオン酸ハイドロラーゼに関する研究～第2報
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原孝太、中谷安希、上村一雄、金尾忠芳
2. 発表標題 好酸性従属栄養細菌への外来遺伝子の導入と組換え発現系の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会3支部合同大会
4. 発表年 2017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
連携研究者	玉田 太郎  (Tamada Taro)  (50391248)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・東海量子ビーム応用研究センター・上席研究員   (82502)	
連携研究者	上村 一雄  (Kamimura Kazuo)  (80294445)	岡山大学・環境生命科学研究所・教授   (15301)	

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
---------	---------