

平成22年5月31日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19580091  
 研究課題名（和文）有機硫黄化合物に作用する酵素について—特異的な炭素—硫黄結合の開裂と形成—  
 研究課題名（英文）Studies on enzymes for organic sulfur compounds – cleavage and formation of carbon-sulfur bond  
 研究代表者  
 大城 隆（OHSHIRO TAKASHI）  
 鳥取大学・大学院工学研究科・教授  
 研究者番号：00233106

研究成果の概要（和文）：有機硫黄化合物として、石油中のジベンゾチオフェン（DBT）、海藻中のフコイダンを対象とし、これらに作用する酵素の研究を行った。石油燃焼により酸性雨の原因物質が発生するため、燃焼前の“脱硫”工程は不可欠である。DBT 分解酵素はバイオ脱硫への応用が可能であり、今回その酵素を遺伝子工学的に改良した。フコイダンは抗ガン作用等の生理活性を持つ高分子化合物であるが、低分子化により新たな活性を見いだせる可能性がある。今回新規フコイダン分解微生物を単離し、酵素活性を検出できた。

研究成果の概要（英文）：Enzymes acting on dibenzothiophene (DBT) and fucoidan were investigated; DBT was contained in petroleum and fucoidan in algae. Since combustion of petroleum released substances for acid rain, “desulfurization” is a necessary step before combustion. DBT degrading enzymes was applicable to biodesulfurization, and the enzyme was improved by genetic engineering method in this study. Fucoidan is a high-molecular-weight compound with physiological activities such as anticancer one, and decreasing the molecular weight would lead to finding of new activities. Novel fucoidan-degrading microorganisms were isolated, and enzyme activities were detected in this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：応用微生物学、応用酵素学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物脱硫、ジベンゾチオフェン、オキシゲナーゼ、フコイダン、硫酸化フカン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) バイオ脱硫に関する研究を、難除去性硫黄化合物のモデルであるジベンゾチオフェン（DBT）を用いて実施しており、その過程で DBT 脱硫代謝系を構成する個々の酵素反応が、通常の化学

反応では進行しない非常にユニークな反応であることを明らかにした。なかでも、脱硫細菌 *Rhodococcus erythropolis* 由来で、芳香族化合物から亜硫酸を遊離させる 2'-ヒドロキシビフェニル 2-スルフィン酸デスルフィナーゼ (DsZB) は、アミ

ノ酸配列のホモロジー検索の結果、既知のどのタンパク質とも相同性がなく、基質の炭素-硫黄結合を開裂する際に補酵素や他のタンパク質を必要としないことが明らかにされていた。さらに反応に関与すると推定されるアミノ酸残基から今までにほとんど報告のないタイプの炭素-硫黄結合を開裂する加水分解酵素であると考えられた。

(2) 高温性脱硫細菌 *Bacillus* sp. WU-S2B 由来の DBT モノオキシゲナーゼ (BdsC) を高発現する組み換え大腸菌が、培養時において酵素の発現とともに青色に変色する現象をきっかけに、BdsC がインドールにも作用することを酵素的に明らかにした。この事実は、DBT 脱硫酵素群が DBT 以外の化合物にも作用しうることを示唆していた。

(3) 硫酸化された多糖類の多くは生理活性を有しており、分子量ならびに硫酸化度と生理活性の相関性が注目を集めていた。

## 2. 研究の目的

(1) DBT の微生物脱硫には、脱硫菌 *R. erythropolis* の場合 DBT モノオキシゲナーゼ (DszC)、DBT スルホンモノオキシゲナーゼ (DszA) および、先述した DszB が関与している。そのなかでも DszB は活性や安定性が他の脱硫酵素と比べて非常に低いため、脱硫酵素系の律速段階となっている。そこで、解明されたばかりの DszB の立体構造解析の結果を基にさまざまな変異酵素を構築し、欠点を克服した酵素への機能改変を実施することにした。そして、得られた変異酵素の酵素化学的性質の解明、および DBT 脱硫酵素反応への適用を行うことにした。

また、DszC、DszA も DszB 同様ユニークな反応を触媒し、これら酵素と同じ反応を触媒する酵素の立体構造の解析はなされていないことから、三次元構造の決定は意義深いものと考えられた。そして、DszB と同様これらについても、構造解析は進行しつつあった。そこで、解析結果から、酵素分子内において基質が

結合する空間ならびに基質と直接相互作用をしているアミノ酸残基を同定し、このアミノ酸残基を他の残基へ置換した変異酵素を作成することにした。立体構造解析については、東京大学の田之倉研究室と協力して進めることにした。

(2) 先述した DszC、DszA、DszB の基質特異性は、それまでの検討から非常に狭いという結果が得られていた。また、高温性脱硫細菌 *Bacillus* sp. WU-S2B 由来で同じ反応を触媒する BdsC、BdsA、BdsB についても基質特異性は狭いと考えられていた。ただし、基質特異性の検討は微生物脱硫という観点からにとどまっており、DBT 環を有する化合物のみを対象としていた。そこで、本研究では、DBT 脱硫酵素が基質として利用できる物質の検索について、芳香族化合物を中心として幅広く行い、これら酵素の真の基質に迫るとともに、酵素の利用価値の拡大を図ることにした。

(3) 硫酸化多糖を単一炭素源、単一硫黄源として生育する微生物菌株の検索を行うことにした。そして、得られた菌株に含まれる低分子化酵素、脱硫酸化酵素を用いて、炭素-硫黄結合の開裂と形成反応を検討することにした。

## 3. 研究の方法

(1) DszB の立体構造から、Cys 27 を中心とした活性部位近傍に位置するアミノ酸残基ならびに、酵素と基質との相互作用に関与するアミノ酸残基がいくつか同定できていた。一方、今までに DszB と同じ反応を触媒する酵素として好熱性脱硫細菌である *Bacillus* sp. WU-S2B 由来の BdsB、*Paenibacillus* sp. A11-2 由来の TdsB が知られている。そこでまず、これら三者のアミノ酸配列を比較し、異なっている残基は DszB のアミノ酸残基を BdsB あるいは TdsB の残基に置換した。さらに、基質との相互作用が想定される残基については集中的にアミノ酸置換を行った。

得られた変異脱硫酵素遺伝子の大腸菌内での発現は、シャペロン遺伝子、*groEL-groES* との共発現を 25°C で行っ

た。そして、無細胞抽出液中の酵素活性の確認を行うとともに、酵素の熱安定性や至適反応温度を測定した。

一つのアミノ酸置換による酵素の特性改良がいくつか確認できれば、それらを組み合わせた多重変異酵素の作成も実施した。そして改良型酵素を発現する変異型 *dszABC* を構築し、まずは大腸菌へ導入した。*DszC*、*DszA* の活性発現に必要なフラビンレダクターゼ遺伝子も同時に導入した。作成した組換え株の菌体を用いて DBT を基質とした休止菌体反応を実施し、野生型 *dszABC* を発現させた大腸菌と、反応温度、反応速度などの比較検討を行った。

決定された *DszC*、*DszA* の立体構造と類似したタンパク質を検索し、それらタンパク質の活性中心に位置するアミノ酸を置換した変異型酵素遺伝子を構築し、大腸菌での発現、酵素活性の測定を実施した。

(2) *BdsC* の場合はインドールに作用することが明らかにされており、DBT 以外の類似化合物への反応性が示されていた。そこで、DBT の構造類似体、各種多環芳香族化合物を基質として、*DszC*、*BdsC* あるいは *DszA*、*BdsA* の発現株の菌体反応を実施し、これら酵素の基質の探索を網羅的に行った。

(3) フコイタンを単一炭素源、単一硫黄源とする培地にさまざまな土壌サンプル、海洋由来サンプルを接種し、集積培養を繰り返し実施し、平板培地上で菌株の単離を行った。得られた菌株の培養液上清あるいは無細胞抽出液を粗酵素として、フコイタンを基質とした酵素反応を行い、HPLC により分子量の低下を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 研究目的の項目においても述べたように、*DszB* の活性中心付近のアミノ酸配列と好熱性脱硫細菌由来の *BdsB*、*TdsB* のアミノ酸配列を比較し、異なっている残基について、*DszB* のアミノ酸残基を *BdsB* あるいは *TdsB* の残基に置換し、変異酵素タンパク質を大腸菌内

で発現させ、酵素活性を測定した。その結果、変異酵素 *Y63F* は比活性が 352 units/mg であり、野生型酵素 (184 units/mg) の 2 倍になった。一方、変異酵素 *Q65H* の比活性は野生型酵素の半分であったが、熱安定性 (35°C、30 分熱処理後も残存活性 60%) が野生型酵素 (35°C、30 分熱処理後の残存活性 5%以下) に比べて高くなった。そこで、二重変異酵素 *Y63F-Q65H* を作成したところ、野生型酵素に比べて比活性の低下はなく、熱安定性は *Q65H* と同程度上昇していた。基質に対する親和性は野生型酵素と変わりなく、従って触媒活性 (*k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>*) も野生型酵素と同じであった。本研究により、立体構造情報から酵素特性を改良するために最適と予測されるアミノ酸置換を実施し、予想通りに性質が改良された変異酵素を得ることができた。同様の手法で他の脱硫酵素についても特性改良を行うことができると考えられた。

*DszC* の構造が明らかになり、アミノ酸配列の相同性が高いアシル CoA デヒドロゲナーゼと立体構造も似ていることがわかった。また、第二段階を触媒する DBT スルホンモノオキシゲナーゼに関しては、*BdsA* の構造が明らかになり、アルカンスルホン酸モノオキシゲナーゼと類似した構造をしていることがわかった。これら2つの酵素タンパク質の活性中心と推定されるアミノ酸残基を変換したところ、活性を失うことが確認できた。ただ、アミノ酸置換による特性改良を実施するには至らなかった。

(2) 好熱性脱硫細菌 *B. subtilis* WU-S2B 由来の DBT モノオキシゲナーゼ (*BdsC*) は、インドールに作用し、インジゴ生成反応を触媒する。そこで、*BdsC* ならびに同じく DBT を基質とする *DszC* について、インドール誘導體、ベンゾチオフェン (BT) ならびにその誘導體への反応性を詳細に検討した。その結果、*BdsC* はこれらの化合物を基質にできる一方、*DszC* は BT に対しては作用するが、インドールには全く活性を持たないことを明らかにした。*BdsC* に関しては、インドール誘導體の中では特に 5-メチルインドールに対する活性がインド

ールよりも高いことや、2-メチル BT に対する活性は DBTの2倍に達することが明らかになった。このように、BdsC の新たな反応性を示すことができた。一方、DszA、BdsA に関しては、テストを行った中で活性を示した化合物を見いだすことはできなかった。

(3) 硫酸化された多糖としてオキナワモズクが生産するフコイダンを材料とした研究を実施した。さまざまな分離源を用いてフコイダンを分解資化できる微生物をスクリーニングし、3種類の微生物菌株を海洋環境から単離できた。それぞれの菌株の 16S rRNA 遺伝子配列の結果から、これらのうち 1 株は *Flavobacterium* 属細菌、2 株は *Luteolibacter* 属細菌であると考えられた。後者 2 株は難培養性微生物であるとされており、LB 培地では生育は認められなかった。3菌株ともフコイダン分解酵素は菌体内に存在し、フコイダンの低分子化が HPLC により確認できるとともに還元末端の遊離を検出することができた。培養上清に酵素活性は全く見いだせなかった。また、酵素的な硫酸基の遊離も同時に起こることが明らかになった。これらの菌株はグルコースを単一炭素源としても生育するが、フコイダン分解酵素の生産はグルコースによって抑制を受けた。さらに、フコイダン以外の海藻由来の特徴的な多糖であるアルギン酸やカラギーナンを単一炭素源として生育することはできず、フコイダン分解酵素、脱硫酸化酵素とともに、フコイダンによって誘導的に生産されることが示唆された。

#### 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 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). 査読有

② Takashi Ohshiro, Ryo Ohkita, Takeshi

Takikawa, Masanori Manabe, Woo Cheol Lee, Masaru Tanokura, and Yoshikazu Izumi, Improvement of 2'-hydroxybiphenyl-2-sulfinate desulfinate, an enzyme involved in the dibenzothiophene desulfurization pathway, from *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by site-directed mutagenesis, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2815-2821 (2007). 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① 大城 隆、原田尚美、小野嘉久、後山和也、三木康成、川本仁志、和泉好計、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 28 日、東京大学

② 大城 隆、小野嘉久、山川尚之、原田尚美、川本仁志、三木康成、和泉好計、新規なフコイダン資化性微生物、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 28 日、マリンメッセ福岡

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

① 名称: 硫酸基の脱離を抑えた硫酸化多糖の低分子化物およびその製造方法  
発明者: 齋本博之、森本 稔、大城 隆、和泉好計、佐藤公彦、吉田晋一、川本仁志、三木康成  
権利者: 国立大学法人 鳥取大学、鳥取県、(株)海産物のきむらや  
種類: 特許  
番号: 特願 2008-050534、特開 2008-266299  
出願年月日: 2008.2.29  
国内外の別: 国内

② 名称: 新規なフコイダン資化性微生物  
発明者: 大城 隆、和泉好計、三木康成、川本仁志  
権利者: 国立大学法人 鳥取大学、(株)海産物のきむらや  
種類: 特許  
番号: 特願 2008-296993  
出願年月日: 2008.11.20  
国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大城 隆 (OHSHIRO TAKASHI)  
鳥取大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：00233106

### (2)研究分担者

和泉好計 (IZUMI YOSHIKAZU)  
鳥取大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：40026555  
(H19)