

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310051

研究課題名(和文) 効率的除去を目指した新奇硫化カルボニル分解酵素の高機能化

研究課題名(英文) High functionality of novel carbonyl sulfide hydrolase aiming at the effective removal of carbonyl sulfide

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) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：硫黄酸化細菌から精製されたCOS加水分解酵素(COSase)は、地球の気候に影響を与える硫化カルボニル(COS)を分解する新奇酵素である。この酵素活性をより効率の高いものとする事を目指して、酵素の活性中心付近および基質あるいは反応生成物のトンネル付近のアミノ酸の変異体を作製し、酵素活性への影響を調べた。さらに自然界のCOSの動態を明らかにする研究の一環として、COSを効率よく取込み分解する細菌及び真菌を土壌から分離し、その中から高い分解活性を有する7株の分解菌を得た。

研究成果の概要(英文)：Carbonyl sulfide hydrolase (COSase) has been isolated from sulfur oxidizing bacterium. COSase catalyses degradation of carbonyl sulfide (COS) that is a trace constituent in the atmosphere and is considered as one of important gas affecting on the global climate especially on ozone depletion. The aim of our research is to obtain information to make highly efficient enzyme molecule so that powerful removal of COS will be possible. We introduced mutations of several amino acids around the sequence of the active center of the enzyme and alpha 5 helix that is a putative tunnel of substrate or reaction product by forming point mutation and examined the effects against COS degrading activity. Furthermore, we tried to isolate new COS degrading microorganisms from soil samples because soil environment is the major sink of atmospheric COS. Novel COS degrading microorganisms including bacteria and fungi were isolated from the soil.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 ・ 環境技術・環境材料

キーワード：硫化カルボニル 致死性有毒ガス オゾン層破壊 酵素分解処理 分子育種 結晶構造解析 微生物分解

1. 研究開始当初の背景

硫化カルボニル (COS) は化学的に安定で大気圏に長く留まり、オゾン層破壊に関連する成層圏硫酸エアロゾルの原因物質のひとつである事、またCO₂の1000倍以上の温室効果を持つ事から、大気微量成分であるにも拘らず大気化学などの分野においては注目される化合物のひとつである。COSの近年の大気濃度は500 pptv程度であるが、その発生源のおよそ1/3は人為起源であるといわれ、将来その発生量が増加し大気中のCOS濃度が増した場合に、地球の気候がどのような影響を被るかが危惧されている。そのため地表と大気間のCOSの動態、特にCOSの消失に大きな寄与をする事が予想される微生物分解についての研究は、COSの影響を抑制する上で極めて重要であるといえる。

硫黄酸化細菌である *Thiobacillus thioparus* THI 115株はCOSを唯一のエネルギーとして生育に利用する事ができる化学合成無機独立栄養性の細菌である。THI115株から精製され、遺伝子のクローニング、大腸菌での大量発現系の構築、生化学的特性の解析、さらにX線結晶構造解析が本研究メンバーによって行なわれているCOS加水分解酵素

(COSase) は、COSを硫化水素(H₂S)と二酸化炭素(CO₂)に加水分解する新奇酵素である。COSaseは、致死濃度に相当するppmvオーダーの濃度から、大気に存在する500 pptv前後の希薄なCOSまで、広い濃度範囲のCOSを分解する事が可能である。COSaseはほとんどの生物に存在するカーボニックアンヒドラーゼ(CA)にアミノ酸配列ならびに立体構造のレベルできわめて類似しているにもかかわらず、CA本来の触媒活性である[CO₂+H₂O ⇌ HCO₃⁻+H⁺]に関する触媒能は極めて微弱であり、高感度の測定ができるStopped-flow spectroscopyを使用した測定によって、CAよりも3~4オーダー低い活性しか示さない事が確認された。そのため、活性部位の立体構造のわずかな差異や基質・生産物の移動経路が触媒活性に影響を及ぼす可能性が高いと示唆された。そこで、酵素反応についてのより詳細な機作に関する情報を得る事を目的に、変異体について解析を行なった。

また、土壌は大型動物の致死レベルを遥かに超える濃度のCOSも吸収し無毒化する事¹⁾、土壌からは高いCOS分解活性を保持する従属栄養性細菌が分離される事²⁾、しかも土壌直上の大気に含まれるCOSの濃度はその上部のCOSよりも明らかに低下³⁾しており、土壌と大気間のCOSのフラックスに微生物が重要なはたらきを担っている事が明らかとなっている。

2. 研究の目的

(1) 結晶構造解析と突然変異体作製

酵素の活性中心近傍ならびに基質・反応産物の移動系路に関するより詳細な情報を得る事を目指して、変異体を作製しそれらの酵素活性を比較する。

(2) 新規 COS 分解細菌および真菌の分離

より強力な分解活性を有する COS 分解微生物を取得する事を目指して、複数の土壌から細菌および真菌を分離し、その中から COS 分解活性を有する菌株をスクリーニングする。

3. 研究の方法

(1) 結晶構造解析と変異体の作製

COSase の基質選択性について立体構造に基づいた検討を行うために、COSase と基質類似化合物との複合体の結晶化とX線結晶構造解析を行った。X線回折実験には、高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設のタンパク質結晶用ビームライン NW12A を共同利用課題として利用した。回折データ処理、結晶構造解析に必要なソフトウェア等は研究室に既設のシステムを利用した。

COSase の結晶構造解析によって明らかとなった活性中心付近の基質結合に関与すると考えられるアミノ酸に対して、点変異導入により変異体を作製し、大腸菌を用いた発現系を作製した。それぞれの変異体タンパク質を精製後、検出器としてFPDを装備したガスクロマトグラフ(FPD-GC)を用いて、COSの分解に伴うH₂Sの生成を調べる事で、酵素活性を求めた。

(2) 分解細菌、真菌の分離

4種の土壌および1種のバイオフィーム試料を供試し、分解微生物のスクリーニングを行なった。1/10濃度 NBY 寒天培地上で細菌株を、PDA 平板培地を用いて真菌を純粋分離した。特に高い分解活性の確認された真菌株については、更に単孢子分離を実施することで純化を行なった。それぞれの分離株のCOS分解活性は、培養容器の気相に添加した標準COSガスの減少及びH₂Sの生成を、FPD-GCで分析し求めた。

4. 研究成果

(1) 結晶構造解析と部位特異的変異体作製

収集した回折データを基に構造解析を行ったところ、基質類似化合物であるSCN⁻との複合体について分解能 1.45 Å での構造決定に成功した (PDB ID: 3VRK, R = 0.159, Rfree = 0.204)。

触媒部位に存在する亜鉛近傍の構造はこれまでに結晶解析されたβ-炭酸脱水素酵素(β-CA)で共通して見出されていた構造に類似していたが、基質の認識に関与すると考えられるアミノ酸残基の一部に変異が見られ

た。触媒部位を構成するアミノ酸残基の違いにより、 β -CA は plant 型と Cab 型に分類されている。COSase の触媒部位、および、全体構造を 2 種の構造と比較した結果、COSase は Cab 型に属すると考えられた。

COSase の基質結合部位近傍のアミノ酸残基である N 末端から数えて 45 番目のメチオニン残基 (メチオニン 45、以下同様)、ヒスチジン 63、イソロイシン 82、ロイシン 87 は、CA の活性部位との比較によって COSase に特異的に存在するものである事が示された。このことは COSase の触媒活性に影響を及ぼすことが示唆されるため、これら 4 つのアミノ酸残基のそれぞれに、CA で見られるアミノ酸やサイズの小さいグリシンへの点変異導入を行い、4 種の変異体を作製した。また、COSase は低い CO_2 加水分解活性を示すが、類似の酵素である二硫化炭素加水分解酵素 (CS_2 hydrolase) は CO_2 加水分解活性がないと報告されている。そこで、COSase と CS_2 hydrolase の活性部位の構造比較を行なったところ、 CS_2 hydrolase のアルギニン 20 とグルタミン酸 38 に相当する位置で COSase はイソロイシン 33、アラニン 47 となっており、疎水的な環境になっていることが明らかになった。そのため、触媒ポケットの奥に位置するアミノ酸残基イソロイシン 33 が基質認識に関与する可能性が高いと考えられたことから、 CS_2 hydrolase タイプのアミノ酸への点変異導入による変異体も作製した。即ち、COSase のイソロイシン 33 をアルギニンに、アラニン 47 をグルタミン酸に置換した部位特異的変異体を作製した。これらの変異体は GST を付加した組換え体の発現系を作製したが、これまでのところ、活性測定、結晶解析に十分な酵素を得るまでには至っていない。さらに発現系を工夫する事で、その活性の変化を調べると共に、それらの精製酵素についての結晶構造を詳細に解析する計画である。

COSase と β CA、 CS_2 hydrolase の結晶構造の比較から、COSase では $\alpha 5$ ヘリックス (118~133 アミノ酸残基目) が基質ポケットに繋がるトンネルとして存在することで基質特異性を決定している事が示唆された (図 1)。そこで、この部分の欠損変異体の組み換え体を作製し、His タグを付加した発現系構築を試みた。COSase の野生型の活性は 1.1×10^2 nmol/ $\mu\text{g}/\text{min}$ であるのに対して、欠損変異体では 1.7 nmol/ $\mu\text{g}/\text{min}$ の活性であった。この結果、COSase において、 $\alpha 5$ ヘリックスは酵素タンパク質の立体構造形成に大きく寄与している可能性が示唆された。

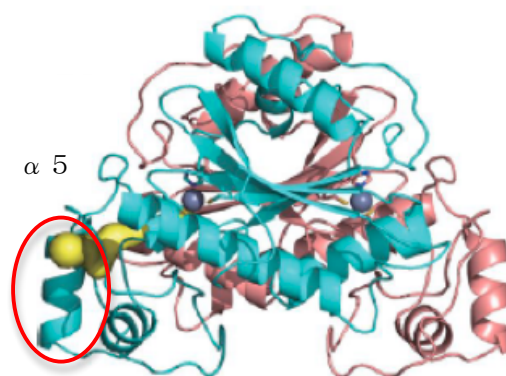


図 1. COSase の立体構造。青と赤の二つのサブユニットを示す。灰色の丸印は活性中心の亜鉛原子を示し、黄色は基質 (COS)、あるいは反応生成物 (H_2S , CO_2) の移動するトンネルの端を示す。

(2) 新規 COS 分解細菌および真菌の分離
細菌 COS の分解が確認された土壌から、計 228 株の細菌を無作為に分離し COS 分解を調べたところ、活性に差は見られるものの高頻度で COS 分解が確認され、従属栄養性の土壌細菌には COS 分解能が広く見出される事が確認された。これらの中から 25 ppmv COS を 3 時間以内に検出限界値以下にまで分解する K23 株、及び K42 株が得られた (図 2)。

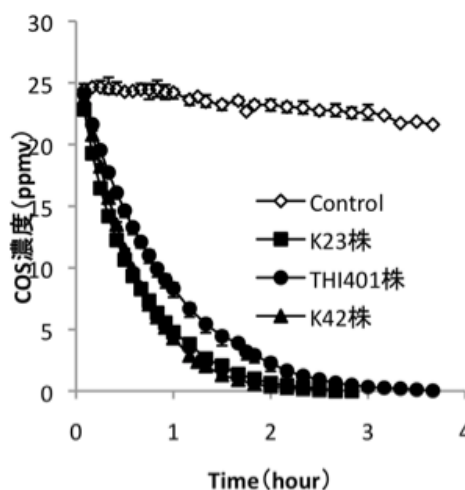


図 2. 土壌から分離された新規 COS 分解細菌による 25 ppmv COS の分解。

16S rRNA の塩基配列を基に系統解析を行なった結果、K23 株は *Rhodococcus* 属、K42 株は *Mycobacterium* 属に属する細菌であり、特に後者については Kato *et al.* (2008) の結果を裏付ける成果が得られたと云える。

真菌 上記土壌から 59 株の真菌を分離し、この内 10 株に 30 ppmv COS を 5 時間以内に分解する活性が確認された。更にこの内 5 株は 1.5 時間以内の分解が可能であった。高い

分解活性を示した 5 株について、ITS 領域の塩基配列を元に近縁種検索を行なったところ、*Trichoderma* 属 (4 株)、*Arthrographis* 属 (1 株)、に近縁であり、特に *Trichoderma* 属に比較的高い頻度で COS 分解能を有する菌株が見出される事が判明した。

今後はこれらの菌株を用いて、COS 分解活性の至適条件の検討、COS 分解酵素について更に研究を進め、COS の微生物分解に関する基礎的情報の充実を図ると共に、これらの微生物の COS 分解活性を利用した効率的な COS 除去技術の創出に向けた研究を継続して行なう計画である。

引用文献

1. M. Saito, T. Honna, T. Kanagawa, Y. Katayama (2002). Microbial degradation of carbonyl sulfide in soils. *Microb Environ* 17, 32-38.
2. H. Kato, M. Saito, Y. Nagahata, Y. Katayama (2008). Degradation of ambient carbonyl sulfide by *Mycobacterium* spp. in soil. *Microbiol* 154, 249-255.
3. H. Kato, Y. Igarashi, Y. Dokiya, Y. Katayama (2012). Vertical distribution of carbonyl sulfide at Mt. Fuji, Japan. *Water Air Soil Pollut* 223, 159-167.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Ogawa T, Noguchi K, Saito M, Nagahata Y, Kato H, Ohtaki A, Nakayama H, Dohmae N, Matsushita Y, Odaka M, Yohda M, Nyunoya H, Katayama Y. Carbonyl sulfide hydrolase from *Thiobacillus thioparus* strain TH115 is one of the β -carbonic anhydrase family enzymes. *J Am Chem Soc*, 査読有 135, 3818-3825, 2013. doi:10.1021/ja307735e
- ② Gu JD, Kigawa R, Sato Y, Katayama Y. Addressing the microbiological problems of cultural property and archive documents after earthquake and tsunami. *Int Biodeter Biodeg*, 査読有 85, 345-346, 2013. doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.08.018
- ③ Hussain A, Ogawa T, Saito M, Sekine T, Nameki M, Matsushita Y, Hayashi T, Katayama Y. Cloning and expression of a gene encoding novel thermostable thiocyanate-degrading enzyme from a mesophilic alpha-proteobacteria strain TH1201. *Microbiol*, 査読有 159, 2294-2302, 2013. doi:10.1099/mic.0.063339-0
- ④ Kusumi A, Li X, Osuga Y, Kawashima A, Gu JD, Nasu M. Katayama Y. Bacterial communities in pigmented biofilms formed on

the sandstone bas-relief walls of the Bayon temple, Angkor Thom, Cambodia. *Microb Environ* 査読有 28, 422-431, 2013.

doi:10.1264/jsme2.ME13033

- ⑤ Hu H, Ding S, Katayama Y. (他 5 名). Occurrence of *Aspergillus allahabadii* on sandstone at Bayon Temple, Angkor Thom, Cambodia, *Int Biodeter Biodeg* 査読有 76, 112-117, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.06.022>
- ⑥ Boden, R, Cleland D, Green P N, Katayama Y (他3名). Phylogenetic assessment of culture collection strains of *Thiobacillus thioparus*, and definitive 16S rRNA gene sequences for *T. thioparus*, *T. denitrificans*, and *Halothiobacillus neapolitanus*. *Arch Microbiol* 査読有194, 187-195, 2013 doi:10.1007/s00203-011-0747-0
- ⑦ Kato H, Igarashi Y, Dokiya Y, Katayama Y. Vertical distribution of carbonyl sulfide at Mt. Fuji, Japan. *Water Air Soil Pollut*, 査読有 223, 159-167 2012 doi:10.1007/s11270-011-0847-0.
- ⑧ Kusumi A, Li X, Katayama Y. Mycobacteria isolated from Angkor monument sandstones grow chemolithoautotrophically by oxidizing elemental sulfur. *Front Microbiol* 査読有 2, article 104, 2011. doi: 10.3389/fmicb.2011.00104.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 片山葉子. 遺跡劣化砂岩から分離された *Fusarium solani* に内生する細菌, 第 1 回菌類内生細菌情報交換会 (招待講演), 2014 年 3 月 21 日, 茨城大学 (茨城県)
- ② 猪原英之. 津波堆積物の性状と微生物叢の好気および嫌気環境下での変化, 第 48 回日本水環境学会年会, 2014 年 3 月 19 日, 東北大学 (仙台市)
- ③ 猪俣祥. 土壌より分離した細菌による硫化カルボニル分解, 第 29 回日本微生物生態学会大会, 2013 年 11 月 24 日, 鹿児島大学 (鹿児島県)
- ④ 小澤理恵. 大気微量硫黄成分である硫化カルボニルの *Trichoderma* spp. による分解, 第 29 回日本微生物生態学会大会, 2013 年 11 月 24 日, 鹿児島大学 (鹿児島県)
- ⑤ 片山葉子. アンコール遺跡劣化石材表面のバイオフィルムに蓄積した硝酸とその起源の推定, 第 29 回日本微生物生態学会大会, 2013 年 11 月 24 日, 鹿児島大学 (鹿児島県)
- ⑥ H IHARA. Degradation of hedoro, organically enriched sediment, discharged by tsunami of the great east Japan earthquake in 2011, The 22th Korea-Japan Symposium on Water Environment 2013, 2013 年 10 月 21 日, グランドホテル テク (大韓民国)

- ⑦ 小澤理恵. 森林および火山ガス発生地域の土壌から分離された真菌の硫化カルボニル分解活性の比較, 日本土壌微生物学会 2013 年度大会, 2013 年 6 月 20 日, 東京農工大学 (東京都)
- ⑧ 北原直樹. 遺跡劣化砂岩から分離された *Fusarium solani* THIF01f 株の無機塩硫黄培地での生育, 日本土壌微生物学会 2013 年度大会, 2013 年 6 月 20 日, 東京農工大学 (東京都)
- ⑨ Y. Katayama. Microbial deterioration of stones at Angkor site, Cambodia. International Symposium on the Conservation and Restoration of Cultural Property 2012. (招待講演), 2012 年 12 月 05 日, 上野 (東京都)
- ⑩ N. Kitahara. Oxidation of elemental sulfur and chemolithotrophic growth of *Fusarium solani* strain THIF01 isolated from deteriorated stone of Angkor monuments. International Symposium on the Conservation and Restoration of Cultural Property 2012, 2012 年 12 月 05 日, 上野(東京都)
- ⑪ R Ozawa. Degradation of atmospheric COS by *Trichoderma* sp. strain KSF8, 第 28 回日本微生物生態学会大会, 2012 年 09 月 10 日, 豊橋技術科学大学 (愛知県)
- ⑫ Y. Katayama. Microbial growth and oxidation of elemental sulfur on deteriorated sandstones in Angkor monuments, Cambodia. Chemical and ecological researches on the microorganisms for preserving cultural properties in both Japan and Hungary. (招待講演), 2012 年 07 月 07 日, 奈良市(奈良県)
- ⑬ T Ogawa. Carbonyl sulfide hydrolase: a novel β -carbonic anhydrase family enzyme catalyzing ambient level of carbonyl sulfide, 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering (日中韓酵素工学会議), 2012 年 05 月 28 日, 金沢市 (石川県)

[図書] (計 1 件)

- ①大河内博、緒方裕子、皆巳幸也、片山葉子、米持真一、成山堂書店、よみがえる富士山測候所 2012 年, 2012 年, 94-100 ページ

[その他]

ホームページ等

- ①国立大学法人東京農工大学科学技術展2013 土壌に生息する微生物による空気中の硫化カルボニルの分解 猪俣祥、小澤理恵、片山葉子
- ②国立大学法人東京農工大学科学技術展 2012 土壌微生物のはたらき—空気中の微量硫黄ガスの分解—小澤理恵、猪俣祥、加藤広海、片山葉子
- ③国立大学法人東京農工大学科学技術展

2011 効率的除去を目指した新奇硫化カルボニル分解酵素の高機能化 片山葉子、野口恵二、小川貴弘、尾高雅文

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：9 0 1 6 5 4 1 5

(2)研究分担者

尾高 雅文 (ODAKA Masahumi)
東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：2 0 2 2 4 2 4 8

野口 恵一 (NOGUCHI Keiichi)
東京農工大学・学内共同利用施設等・准教授
研究者番号：0 0 2 5 1 5 8 5