

大気微量成分である硫化カルボニル (COS) の微生物分解  
-*Thiobacillus thioparus* THI115 株の COS 加水分解酵素の性質  
並びに放線菌による COS 分解-

Microbial degradation of carbonyl sulfide (COS), an atmospheric trace gas  
-Characterization of COS hydrolase from *Thiobacillus thioparus*  
strain THI115 and degradation of COS by actinomycetes-

2018. 3

東京農工大学大学院

連合農学研究科

小川 貴弘

## 目次

|   |    |
|---|----|
| 目次 .....  | 2  |
| 学位論文要旨 .....  | 4  |
| 学位論文を構成する原著論文 .....   | 6  |
| 略語 .....  | 7  |
| 第 1 章 .....   | 8  |
| 1-1 地球規模の硫化カルボニルの循環 .....   | 8  |
| 1-2 COS の分解に関わる生物と酵素 .....  | 9  |
| 1-3 <i>Thiobacillus thioparus</i> strain THI115 株と COSase .....   | 10 |
| 1-4 本研究の背景と目的 .....   | 10 |
| 第 2 章 COSase の酵素学的な性質及び結晶構造解析 .....   | 17 |
| 2-1 COSase の精製 .....  | 17 |
| 2-1-1 はじめに .....  | 17 |
| 2-1-2 材料と方法 .....   | 19 |
| 2-1-3 結果 .....  | 22 |
| 2-1-4 考察 .....  | 24 |
| 2-2 COSase の COS、CO <sub>2</sub> 、CS <sub>2</sub> 分解活性、及び <i>T. thioparus</i> THI115 株と COSase による大気濃度 COS に対する分解活性 ..... | 31 |
| 2-2-1 はじめに .....  | 31 |
| 2-2-2 材料と方法 .....   | 33 |
| 2-2-3 結果 .....  | 39 |
| 2-2-4 考察 .....  | 41 |
| 2-3 COSase の結晶構造 .....  | 51 |
| 2-3-1 はじめに .....  | 51 |
| 2-3-2 材料と方法 .....   | 52 |
| 2-3-3 結果 .....  | 53 |
| 2-3-4 考察 .....  | 55 |
| 第 3 章 放線菌の COS 分解と COSase を含む $\beta$ -CA の clade D 遺伝子の検出 .....  | 67 |
| 3-1 はじめに .....  | 67 |
| 3-2 材料と方法 .....   | 68 |
| 3-3 結果 .....  | 71 |
| 3-4 考察 .....  | 73 |

|   |     |
|---|-----|
| 第4章 COSase 及び <i>T. thioparus</i> THI115 株の COS 分解に伴う硫黄の同位体分別 ..... | 83  |
| 4-1 はじめに .....  | 83  |
| 4-2 材料と方法 .....   | 85  |
| 4-3 結果 .....  | 88  |
| 4-4 考察 .....  | 89  |
| 第5章 総合考察 .....  | 98  |
| 謝辞 .....  | 101 |
| 引用文献 .....  | 102 |
| 補足情報 .....  | 117 |

## 学 位 論 文 要 旨

大気微量成分である硫化カルボニル (COS) の微生物分解  
-*Thiobacillus thioparus* THI115 株の COS 加水分解酵素の性質  
並びに放線菌による COS 分解-

Microbial degradation of carbonyl sulfide (COS), an atmospheric trace gas  
-Characterization of COS hydrolase from *Thiobacillus thioparus* strain THI115  
and degradation of COS by actinomycetes-

小川 貴弘  
Ogawa Takahiro

硫化カルボニル (COS) は、対流圏に 500 parts per trillion by volume (pptv) 前後で存在し、一部は成層圏に移行して成層圏エアロゾルの構成成分である硫酸に分解される。成層圏エアロゾルは、地球の気候やオゾン層の破壊に影響を及ぼすため、その起源物質として COS の地球規模の循環を理解することは重要である。また、COS は植物における総一次生産量を見積るためのトレーサーになり得るとして、近年注目されている。土壌は、対流圏の COS の主要な消失源の 1 つとされるが、推定される消失量には幅があり、個々の反応メカニズムの詳細を明らかにすることは、COS の地球規模の動態を正確に把握する上で極めて重要である。そこで本研究は、① *Thiobacillus thioparus* THI115 株 (以下、THI115 株) の COS 加水分解酵素 (COSase) の酵素学的性質、結晶構造解析、② 主に放線菌を対象とした COS 分解活性の確認、及び COSase と COSase にアミノ酸配列や結晶構造で類似した clade D に属する beta-class carbonic anhydrase ( $\beta$ -CA) の探索、③ COSase 及び THI115 株の COS 分解における同位体分別に関して行ない、COS の動態把握に反映させることに資する情報を得ることとした。

土壌では、微生物が COS の分解を担うが、土壌微生物を用いた酵素レベルでの COS 分解を研究した例はない。*T. thioparus* は、土壌や淡水に広く分布する化学合成無機独立栄養細菌であり、チオシアン酸塩をエネルギー源として生育する過程で、代謝中間体として COS を経由する。本研究では、THI115 株から精製した COSase を用いて、酵素学的性質などの研究を行なった。精製した COSase は、COS を硫化水素と二酸化炭素 ( $\text{CO}_2$ ) に加水分解し、 $V_{\text{max}} = 74 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ 、 $K_m = 60 \mu\text{M}$ 、 $k_{\text{cat}} = 58 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_{\text{cat}} / K_m = 9.6 \square 10^5$  を示し、COS 分解能



を持つことが知られている carbonic anhydrase (CA) などの既知の酵素の中でも、高い分解活性を示した。これらの既知酵素に対する研究では、ppmv オーダーの COS が用いられたが、大気 COS の消失源としての寄与を考え、大気濃度の COS も用いたところ、THI115 株と COSase 精製酵素の両者に分解活性が確認され、土壌による大気中の COS の取込みに、COSase の寄与が予想された。

アミノ酸配列だけではなく、1.20 Å の解像度で得られた COSase の結晶構造からも、COSase は clade D に属する  $\beta$ -CA に類似した。結晶構造解析の結果、 $\beta$ -CA 及び  $\beta$ -CA の酵素ファミリーである二硫化炭素 ( $\text{CS}_2$ ) 加水分解酵素 (hydrolase) の活性中心と、COSase の活性中心は類似していることが明らかとなった。このため、基質特異性は異なるものの、それぞれの基質に対する触媒メカニズムは、ほぼ同様であることが示唆された。 $\beta$ -CA と  $\text{CS}_2$  hydrolase には、高い COS 加水分解活性が報告されている。一方、 $\beta$ -CA や  $\text{CS}_2$  hydrolase の本来の反応である  $\text{CO}_2$  水和活性は、COSase では 3~4 桁低く、 $\text{CS}_2$  加水分解活性も 1 桁低いことが示された。基質の進入や生成物の退出の経路の幅は、 $\beta$ -CA に比べ COSase や  $\text{CS}_2$  hydrolase では狭く、しかも疎水性であった。さらに、 $\text{CS}_2$  hydrolase には、 $\text{CO}_2$  水和活性を持たないことが知られている。以上の結果を総合すると、COS 並びに反応生成物である  $\text{CO}_2$  や  $\text{H}_2\text{S}$  は、これらの経路を通過できるが、 $\text{CO}_2$  の水和によって生じる炭酸水素イオンは、サイズが大きいためこの経路を通過できず、そのことが基質特異性を決める要因になっていると考えられる。

既知の COS 分解細菌に関する情報は限られるが、その中でも *Mycobacterium* 属の細菌は、高い COS 分解活性を持つ。そこで、放線菌の COS 分解活性を調べたところ、20 菌株中 17 菌株で 30 ppmv COS に対する分解活性を示した。特に、分解活性の高い 12 菌株について、大気濃度 COS の分解活性を調べた結果、明らかな分解を示すのは 2 菌株のみであり、多くの放線菌に COS 分解能は見られるものの、大気のコス分解に寄与する微生物は一部である可能性を示した。

土壌から分離した 8 菌株の COS 分解細菌に対して、COSase や  $\beta$ -CA の clade D の探索を PCR 法により行ない、*Mycobacterium* 属の 5 菌株と *Williamsia* 属の 1 菌株で、 $\beta$ -CA の clade D の存在が示唆された。このことは、細菌における COS 分解を担う酵素としての、 $\beta$ -CA の clade D の重要性を示すものである。

COS の地球規模の循環を把握する上で、同位体の利用は有効な手段になり得る。そこで、COSase 精製酵素と THI115 株の菌体を用いて、COS 分解における硫黄の同位体分別を調べた。その結果、両者共に  $\text{CO}^{34}\text{S}$  よりも  $\text{CO}^{32}\text{S}$  を優先して分解し、その同位体分別定数は、それぞれ -2.2%、-3.6% であった。さらに Rees モデルに当てはめたところ、菌体に取り込まれた COS の 9 割以上は COSase によって分解されることが示された。

本研究により、 $\beta$ -CA の中でも特に、COSase を含む clade D の酵素は、大気 COS の動態を理解する上で重要な酵素であることが示唆された。今後は、その他の clade に属する酵素や、土壌バイオマスとして豊富な菌類を含めた、土壌微生物による COS 分解についてのより広範な研究を行なうことで、COS の主要な消失源としての土壌の詳細が、明らかになるものと考えられる。

## 学位論文を構成する原著論文

- **Ogawa, T., Noguchi, K., Saito, M., Nagahata, Y., Kato, H., Ohtaki, A., Nakayama, H., Dohmae, N., Matsushita, Y., Odaka, M., Yohda, M., Nyunoya, H. and Katayama, Y. (2013).** Carbonyl sulfide hydrolase from *Thiobacillus thioparus* Strain THI115 is one of the  $\beta$ -carbonic anhydrase family enzymes. *J Am Chem Soc* **135**, 3818-3825.
- **Ogawa, T., Kato, H., Higashide, M., Nishimiya, M. and Katayama, Y. (2016).** Degradation of carbonyl sulfide by Actinomycetes and detection of clade D of  $\beta$ -class carbonic anhydrase. *FEMS Microbiol Lett* **363**, fnw223, doi.org/10.1093/femsle/fnw223.
- **Ogawa, T., Hattori, S., Kamezaki, K., Kato, H., Yoshida, N., and Katayama, Y. (2017).** Isotopic fractionation of sulfur in carbonyl sulfide by carbonyl sulfide hydrolase of *Thiobacillus thioparus* THI115. *Microbes Environ* **32**, 367-375.

## 略語

$\alpha$ : 同位体分別ファクター

$\alpha$ -CA: alpha-class carbonic anhydrase

$\beta$ -CA: beta-class carbonic anhydrase

$\epsilon$ : 同位体分別定数

CA: carbonic anhydrase

CODH: carbon monoxide dehydrogenase

COSase: COS hydrolase (一部の表記は COS を分解する酵素全般として記載)

DsrAB: dissimilatory sulfite reductase

FPD: 円光光度検出器

GC: ガスクロマトグラフ

GC-IRMS: ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計

IRMS: 同位体比質量分析計

JCM: 国立研究開発法人理化学研究所 Japan Collection of Microorganisms

MDF: mass-dependent fractionation

MIF: mass-independent fractionation 又は non-mass-dependent fractionation

NBRC: 独立行政法人製品評価技術基盤機構 Biological Resource Center

NCBI: National Center for Biotechnology Information, USA

PDB: Protein Data Bank Japan

ppbv: parts per billion by volume

ppmv: parts per million by volume

pptv: parts per trillion by volume

PYG: polypeptone-yeast extract-glucose

R: R-factor (ただし、4章では R はプログラミング言語の R として記載)

RMSD: 根平均二乗分散

RuBisCO: ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase

SCNase: thiocyanate hydrolase

SDS: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

TOC: 全有機炭素

TrzN: *s*-triazine hydrolase

## 第 1 章

### 1-1 地球規模の硫化カルボニルの循環

硫化カルボニル (COS) は、対流圏で最も多く存在する気体状の硫黄化合物で、その濃度は、およそ 500 pptv (parts per trillion by volume) である (Chin and Davis, 1995; Montzka *et al.*, 2007)。対流圏に存在する COS は、化学的に安定であるため、その一部は成層圏へ移行し、光分解やラジカル [ $\cdot\text{OH}$  及び  $\text{O}(^3\text{P})$ ] との反応により分解される。さらに、硫黄画分は、二酸化硫黄 ( $\text{SO}_2$ ) を経て、最終的に硫酸に酸化される (Crutzen, 1976; Chin and Davis, 1993)。硫酸は、気候の冷却化や、オゾン層の破壊に影響を及ぼす成層圏エアロゾルの 70~75% を占める構成成分であり (Solomon, 1999; Steele *et al.*, 2003)、硫酸の存在量が、成層圏エアロゾル量を決定づけるといえる。モデル研究では、大きな噴火がない期間の成層圏エアロゾルに含まれる硫酸は、43% (Pitari *et al.*, 2002) あるいは 56% (Sheng *et al.*, 2015) が、COS に起因すると見積もられるという報告があり、主要な起源物質として COS は注目されている (Crutzen, 1976)。氷床コアや、万年雪にトラップされている過去の COS 濃度の測定値は、産業革命以前と比べて 1980 年代中頃まで上昇し、その後、減少しつつあることを示し、人間活動による影響を示唆する (Aydin *et al.*, 2002, 2007, 2008; Montzka *et al.*, 2004)。一方、成層圏における硫酸のもう 1 つの主要な起源物質は  $\text{SO}_2$  である。特に、噴火によって噴出する  $\text{SO}_2$  による成層圏エアロゾル量の増加が地球の冷却化に与える影響は大きい。例えば、1999 年から 2010 年までの成層圏エアロゾル量の増加は、主として噴火によるものと考えられており、 $0.07^\circ\text{C}$  の地球の冷却化をもたらしたとするモデル研究がある (Solomon *et al.*, 2011)。逆に、噴火による影響を排除したモデル研究は、1960 年から 2000 年までの成層圏エアロゾル量の増加が、およそ  $0.05^\circ\text{C}$  の地球の冷却化をもたらしたと提案している (Solomon *et al.*, 2011)。一方、COS 自身は、二酸化炭素 ( $\text{CO}_2$ ) の 724 倍の放射強制力をもつ温室効果ガスとしても知られ、この COS による温暖化と成層圏エアロゾルを介した冷却化の影響は、互いに相殺され、COS は、ほとんど気候に影響を及ぼさない可能性が指摘されている (Brühl *et al.*, 2012)。このように、COS は、気候の冷却化と温暖化の両者に関わるため、その地球化学的な動態を把握することの意義は、きわめて大きいといえる。

COS の地球規模の循環を把握するために、これまでに、さまざまな研究が行なわれており、COS の発生源と消失源、そして、その収支のバランスに関して明らかになりつつある (Turco *et al.*, 1980; Khalil and Rasmussen, 1984; Chin and Davis, 1993; Andreae and Crutzen, 1997; Watts, 2000; Kettle *et al.*, 2002; Montzka *et al.*, 2007; Berry *et al.*, 2013; Launois *et al.*, 2015; Whelan *et al.*, 2017)。主な発生源としては、海洋、人間活動、バイオマスの燃焼、主な消失源としては植物、土壌、ラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) による酸化が挙げられる。しかしながら、見積もられる量に関しては幅が大きく、発生量と消失量の間にはバランスがとれているのかも不透明である。そのため、COS の発生源、消失源共に、さらなる研究が求められている。

近年、COS は、植物の光合成による  $\text{CO}_2$  吸収量である、総一次生産 (gross primary production) を見積もるためのトレーサーとしての利用も期待されている (Campbell *et al.*, 2008; Seibt *et al.*, 2010; Stimler *et*

al., 2010)。植物は、CO<sub>2</sub>を光合成により吸収すると共に、呼吸により排出しているため、これまでは、正味のCO<sub>2</sub>吸収量である純一次生産 (net primary production) を測定することはできたが、総一次生産は明らかではなかった。一方、植物によって、CO<sub>2</sub>とCOSは一定の割合で吸収され、CO<sub>2</sub>とは異なり、COSは排出されないことから、COSの吸収量からCO<sub>2</sub>の総一次生産量を推定するのが、この方法である。このように、COSは、地球の気候に影響を及ぼすだけでなく、CO<sub>2</sub>の地球規模の循環に関する研究においても、重要な物質と考えられる。

## 1-2 COSの分解に関わる生物と酵素

これまでに、COSを分解する生物として、①植物 (Taylor *et al.*, 1983)、②緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii*、*Mantoniella squamata*、*Prymnesium parvum*、*Amphidinium klebsii* (Protoschill-Krebs *et al.*, 1995; Blezinger *et al.*, 2000)、③真菌 (Li *et al.*, 2010; Masaki *et al.*, 2016)、④地衣類 (Gries *et al.*, 1994)、⑤シアノバクテリア (Miller *et al.*, 1989)、⑥唯一のエネルギー源としてCOSを用いて生育する *Thiobacillus* 属の細菌 (Smith and Kelly, 1988; Kim and Katayama, 2000) や *Paracoccus denitrificans* (Jordan *et al.*, 1997)、⑦CO資化性細菌である *Peptostreptococcus productus*、*Eubacterium limosum*、*Rhodospirillum rubrum* (Smith *et al.*, 1991)、⑧土壌から分離された *Mycobacterium*、*Williamsia*、*Cupriavidus* 属の細菌、及び砂岩から分離された *Mycobacterium* 属の細菌 (Kato *et al.*, 2008; Kusumi *et al.*, 2011)、⑨唯一のエネルギー源としてCS<sub>2</sub>を用いて生育する *Thiobacillus* 属の細菌 (Smith and Kelly, 1988; Hartikainen *et al.*, 2000) や、二硫化炭素 (CS<sub>2</sub>) 加水分解酵素 (hydrolase) を持つことが示唆されている *Methylomicrobium alcaliphilum* (Smeulders *et al.*, 2013) が知られている。また、COSを基質とする酵素としては、alpha-class carbonic anhydrase ( $\alpha$ -CA) (Chengelis and Neal, 1979; Haritos and Dojchinov, 2005)、beta-class carbonic anhydrase ( $\beta$ -CA) (Protoschill-Krebs *et al.*, 1996; Ogée *et al.*, 2016)、nitrogenase (Seefeldt *et al.*, 1995)、carbon monoxide dehydrogenase (CODH) (Ensign, 1995)、ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) (Lorimer and Pierce, 1989)、CS<sub>2</sub> hydrolase (Smeulders *et al.*, 2011) が知られている (Table 1-1)。しかし、 $\beta$ -CAとCS<sub>2</sub> hydrolaseを除き、これらの酵素は、COSが元々の基質の化学構造に類似していることや、酵素の基質特異性が低いことに起因し、COSも反応基質とすることが可能なものであるが、いずれの酵素の場合も、本来の基質と比べてCOSに対する反応性は乏しいといえる (Table 1-2)。CS<sub>2</sub>を含む火山ガスが噴出する硫気孔付近や、CS<sub>2</sub>除去のためのバイオフィルターから分離された *Acidianus* sp. A1-3 株、*Acidithiobacillus thiooxidans* S1p 株、*Acidithiobacillus thiooxidans* G8 株から精製されたCS<sub>2</sub> hydrolaseは、高いCOS分解活性がある。しかし、これらの好酸性の古細菌や細菌は、硫気孔などのいわゆる極限環境下でのみ生育することが可能なことから、大気中のCOSの消失源について見てみた場合、それに関与する酵素としてのCS<sub>2</sub> hydrolaseの寄与は、小さいのではないかと考えられる。これまでに、*Fusarium* 属の真菌、土壌から分離された *Mycobacterium* 属の細菌は、大気レベルの濃度のCOSを分解することが報告されている (Kato *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010)。しかし、これらの微生物のCOS分解に関わる酵素に関する研究は、行

なわれていない。そのため、一般的な土壌微生物から、COS を特異的に分解する酵素を明らかにし、大気濃度の COS を分解するか調べることは、土壌微生物による大気濃度の COS 分解への寄与を知る上で、極めて重要であると考えられる。

COS の主要な消失源である植物は、COS も基質とすることが可能な酵素として、 $\beta$ -CA と RuBisCO の両方を含む。しかし、COS 分解において、ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*) の RuBisCO よりも、エンドウ (*Pisum sativum*) の  $\beta$ -CA の方が、 $k_{cat} / K_m$  で 2 桁高いことから、 $\beta$ -CA が植物による COS 分解に寄与すると考えられる (Table 1-1) (Lorimer and Pierce, 1989; Protoschill-Krebs and Kesselmeier, 1992; Protoschill-Krebs *et al.*, 1996; Ogée *et al.*, 2016)。一方、土壌は、carbonic anhydrase (CA) に対する特異的阻害剤の添加や、オートクレーブ処理により COS の吸収が抑制されることから、土壌中の微生物においても、CA が COS の消費に寄与していると考えられる (Kesselmeier *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2002)。しかし、土壌微生物から精製された CA を用いた COS 分解実験は、これまで全く行なわれていない。

### 1-3 *Thiobacillus thioparus* strain THI115 株と COSase

*Thiobacillus thioparus* は、土壌や水環境に一般的に生息する化学合成独立栄養細菌である (Kelly *et al.*, 2005)。*T. thioparus* THI115 株は、コークス廃液に含まれるチオシアネート (SCN<sup>-</sup>) を処理する活性汚泥から分離され、SCN<sup>-</sup>を唯一のエネルギー源として生育する (Katayama *et al.*, 1992)。これまでに、SCN<sup>-</sup>を COS とアンモニアに加水分解するチオシアネート加水分解酵素 (thiocyanate hydrolase, SCNase, EC 3.5.5.8) が精製され、その  $K_m$  及び  $V_{max}$  は、それぞれ~11 mM、及び~0.056  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  であった (Katayama *et al.*, 1992)。この酵素による反応産物である COS は、さらに硫化水素と CO<sub>2</sub> に加水分解され、硫黄画分は、さらに硫酸まで酸化される過程で、*T. thioparus* THI115 株は、エネルギーを獲得する (Katayama *et al.*, 1992; Kim and Katayama, 2000)。この COS の分解を触媒する酵素として、COS 分解酵素 (COSase) が精製された (齋藤, 2003; 長畑, 2003)。しかし、その kinetics などの酵素学的性質は、まだ決定されておらず、SCNase によって生じた COS を、十分に加水分解する活性があるかどうかも分かっていない。一般に、酵素反応は基質が十分に存在する条件で調べられるが、COS の消失源を考慮する場合は大気の微量成分として含まれる、極めて低濃度における COS 分解の触媒活性についても考慮する必要がある。しかしながら、*T. thioparus* THI115 株の菌体や COSase においては、大気中の濃度である 500 pptv の COS を分解できるかどうかも明らかになってはいない。

### 1-4 本研究の背景と目的

本研究では以下の 3 つの研究を行なった。

#### 1-4-1 COSase の酵素学的な性質及び結晶構造解析

これまでに、本研究室では、齋藤 (2003)、長畑 (2003)、小川 (2005) により、COSase の精製、クローニング、大腸菌を用いた COSase の大量発現が行なわれている。そして、COSase の open reading frame

660 bp を含む、COSase 遺伝子の 1864 bp の塩基配列が明らかにされた (Fig. 1-1)。その結果、COSase の遺伝子から推定されるアミノ酸配列は、CA の 5 つあるサブクラスの中の  $\beta$ -CA に相同性のあることが示された (Fig. 1-2)。また、質量分析や分子量の測定から、COSase は、サブユニット当たり 1 つの亜鉛が存在し、全体としてはテトラマー構造であることも示された。

CA は、 $\text{CO}_2$  を可逆的に炭酸水素イオンに水和する酵素 ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ) で、アミノ酸配列の比較に基づき互いに相同性を示さない  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、及び  $\zeta$  の 5 つのクラスに分類されることが知られている (Hewett-Emmett and Tashian, 1996; Tripp *et al.*, 2001; Lane *et al.*, 2005)。このうち、ウシ (*Bos taurus*) の  $\alpha$ -CA とエンドウ (*Pisum sativum*) の  $\beta$ -CA のみ、COS 分解活性が調べられ、 $\alpha$ -CA と  $\beta$ -CA では COS 分解活性が異なる (Table 1-1)。

植物の CA は、 $\beta$ -CA に分類される。また、COS に対して高い分解活性を有する  $\text{CS}_2$  hydrolase も、同様に  $\beta$ -CA に相同性を示す。それぞれの本来の基質である  $\text{CO}_2$  や  $\text{CS}_2$ 、及び COSase の基質である COS は、極性は異なるものの、炭素原子を中央に配し、両側に酸素又は硫黄が配置する直線状の化合物で、構造が似ている。これらの酵素と COSase を、酵素活性だけではなく、酵素タンパク質の構造の面からも比較することは、COSase の特性を理解する上でも重要である。

以上から、第 2 章では、COS の消失源の 1 つである微生物において、COS 分解を触媒する酵素反応を解明することを目的に、COSase について、①kinetics の決定、②大気レベルの COS に対する分解活性、③結晶構造を明らかにすることにした。

#### 1-4-2 放線菌の COS 分解と COSase を含む $\beta$ -CA の clade D 遺伝子の検出

本研究室では、様々な COS 分解微生物を土壌から分離してきた (Kato *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Kusumi *et al.*, 2011)。Kato *et al.* (2008) は、土壌から従属栄養性の COS 分解細菌を分離し、安定した COS 分解活性と成長を示す 7 菌株を選び、放線菌は、 $\beta$ -プロテオバクテリアの細菌よりも高い COS 分解活性を有すること、そして大気濃度の COS に対しても、分解活性があることを明らかにした。しかし、測定された細菌の分離株数は、必ずしも多くはなかったため、全般的に放線菌が高い COS 分解活性を有するのか、また、これらの菌株は、どのようなメカニズムによって COS を分解するのかは、明らかになっていない。

そこで、第 3 章では、放線菌が全般的に COS 分解活性があるかどうかを網羅的に把握するため、様々な放線菌の COS 分解活性を測定し、活性を菌株間で比較した。また、土壌における COS 分解の重要性から、Kato *et al.* (2008) によって土壌から分離された COS 分解細菌、及び *T. thioparus* THI115 株も同様にして比較した。さらに、第 2 章に記載した研究で明らかにしたように、細菌の COS 分解酵素として COSase の COS 分解活性は高いことから、COSase を含む  $\beta$ -CA 遺伝子の存在を PCR 法を用いて明らかにすることを試みた。

### 1-4-3 COSase 及び *T. thioparus* THI115 株の COS 分解に伴う硫黄の同位体分別

COS の同位体比や、COS の生成や分解に関する同位体分別の理解は、COS の物質循環を推定する方法の 1 つになり得る。Kamezaki *et al.* (2016) は、技術的な面から大気濃度ではなく、高濃度の COS を用いて、従属栄養性の COS 分解細菌による、COS 分解における硫黄の同位体分別を明らかにした。同位体分別を起こす詳細なメカニズムを解明することは、実際に進行している大気中の COS の分解における、微生物による同位体分別の把握に繋がる。

そこで、第 4 章では、COSase 及び *T. thioparus* THI115 株の COS 分解における、硫黄の同位体分別及びメカニズムの解明を目的とした。

以上の結果を基に、第 5 章では総合考察を行なった。



Table 1-1. Comparison of enzyme kinetics of COS degradation between COSase and enzymes harboring COS degrading activity.

| Enzyme                       | Organism  | $k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) <sup>a</sup> | $K_m$ ( $\mu\text{M}$ ) | $k_{\text{cat}} / K_m$<br>( $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$ ) <sup>a</sup> | Reference  |
|------------------------------|---|---|-------------------------|--|--|
| COSase                       | <i>Thiobacillus thioparus</i><br>TH1115                       | 29  | 60                      | $4.8 \times 10^5$  | This study   |
| CS <sub>2</sub><br>hydrolase | <i>Acidianus</i> sp. A1-3                                     | 113   | 22                      | $5.1 \times 10^{6b}$   | Smeulders <i>et al.</i> , 2011                                       |
| CS <sub>2</sub><br>hydrolase | <i>Acidithiobacillus</i><br><i>thiooxidans</i> S1p            | $51^b$  | 74                      | $6.9 \times 10^5$  | Smeulders <i>et al.</i> , 2013                                       |
| CS <sub>2</sub><br>hydrolase | <i>Acidithiobacillus</i><br><i>thiooxidans</i> G8             | $140^b$   | 14                      | $1.0 \times 10^7$  | Smeulders <i>et al.</i> , 2013                                       |
| $\beta$ -CA                  | <i>Pisum sativum</i>  | 23  | 39                      | $6.0 \times 10^{5b}$   | Protoschill-Krebs <i>et al.</i> ,<br>1996; Ogée <i>et al.</i> , 2016 |
| $\alpha$ -CA                 | <i>Bos taurus</i>   | 41  | $1.9 \times 10^3$       | $2.2 \times 10^4$  | Haritos and Dojchinov, 2005  |
| Nitrogenase                  | <i>Azotobacter vinelandii</i>                                 | $2.0 \times 10^{-2c}$                             | $3.1 \times 10^3$       | $52^b$   | Seefeldt <i>et al.</i> , 1995  |
| CODH                         | <i>Rhodospirillum</i><br><i>rubrum</i> ATCC11170 <sup>T</sup> | 0.52  | 2.2                     | $2.4 \times 10^{5b}$   | Ensign, 1995   |
| RuBisCO                      | <i>Rhodospirillum</i><br><i>rubrum</i>                        | 6.3   | $5.6 \times 10^3$       | $1.1 \times 10^3$  | Lorimer and Pierce, 1989   |
| RuBisCO                      | <i>Spinacia oleracea</i>                                      | 3.8   | $1.8 \times 10^3$       | $2.2 \times 10^3$  | Lorimer and Pierce, 1989   |

<sup>a</sup>Calculated per active center.

<sup>b</sup>Calculated based on reference.

<sup>c</sup>Recalculated  $k_{\text{cat}}$  value based on  $K_m$  and  $V_{\text{max}}$ . Molecular weight is 32,000 of iron protein component of nitrogenase (Seefeldt *et al.*, 1992).

Table 1-2. Comparison of COS degrading enzyme kinetics between COS degradation and the natural substrate degradation.<sup>a</sup>

| Enzyme                   | Organism   | COS                          |                       |  |  | Natural substrate <sup>b</sup> |                       |  |  |
|--------------------------|--|------------------------------|-----------------------|--|--|--------------------------------|-----------------------|--|--|
|                          |  | $k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> ) | $K_m$ (μM)            | $k_{cat} / K_m$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ) | $V_{max}$ (μmol mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) | $k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )   | $K_m$ (μM)            | $k_{cat} / K_m$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ) | $V_{max}$ (μmol mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) |
| α-CA <sup>c</sup>        | <i>Bos taurus</i>                                      | 41                           | 1.9 × 10 <sup>3</sup> | 2.2 × 10 <sup>4</sup>                              |  | 1.0 × 10 <sup>6</sup>          | 1.2 × 10 <sup>4</sup> | 8.3 × 10 <sup>7</sup>                              |  |
| Nitrogenase <sup>d</sup> | <i>Azotobacter vinelandii</i>                          | 2.0 × 10 <sup>-2</sup>       | 3.1 × 10 <sup>3</sup> | 52   | 3.7 × 10 <sup>-2</sup>                               | 4.2                            | 80                    | 1.0 × 10 <sup>5</sup>                              | 7.9  |
| RuBisCO <sup>e</sup>     | <i>Rhodospirillum rubrum</i>                           | 6.3                          | 5.6 × 10 <sup>3</sup> | 1.1 × 10 <sup>3</sup>                              |  | 5.9                            | 84                    | 7.0 × 10 <sup>5</sup>                              |  |
| RuBisCO <sup>e</sup>     | <i>Spinacia oleracea</i>                               | 3.8                          | 1.8 × 10 <sup>3</sup> | 2.2 × 10 <sup>3</sup>                              |  | 2.9                            | 10                    | 2.9 × 10 <sup>5</sup>                              |  |
| CODH <sup>f</sup>        | <i>Rhodospirillum rubrum</i><br>ATCC11170 <sup>T</sup> | 0.52                         | 2.2                   | 2.4 × 10 <sup>5</sup>                              | 0.51   | 8 × 10 <sup>3</sup>            | 3.1 × 10 <sup>3</sup> | 2.5 × 10 <sup>6</sup>                              | 7.7 × 10 <sup>3</sup>                                |

<sup>a</sup>Calculated per active center.

<sup>b</sup>CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and CO for α-CA, nitrogenase, RuBisCO and CODH, respectively.

<sup>c</sup>Haritos and Dojchinov (2005).

<sup>d</sup>Seefeldt *et al.* (1995). Recalculated  $k_{cat}$  value based on  $V_{max}$  value for COS, and calculated  $k_{cat} / K_m$  value based on  $k_{cat}$  value and  $K_m$  value. Calculated  $V_{max}$  value based on  $k_{cat}$  value for N<sub>2</sub>. Molecular weight is 32,000 of iron protein component of nitrogenase (Seefeldt *et al.*, 1992).

<sup>e</sup>Lorimer and Pierce (1989) and Badger and Andrews (1987).

<sup>f</sup>Data from Ensign (1995) and Ensign and Ludden (1991). Calculated  $k_{cat} / K_m$  value based on  $k_{cat}$  value and  $K_m$  value.

1 CGCCGCTCGT CGACCGGAAT CTCGGGTCG GCACGGCACA GCAGGATGTC GGGCTGGATG CCGATCTCGC GCAGCTCCTT CACGCTGTGC 90  
91 TGGGTCGGCT TGGTCTTCAG CTCGCCGGCG GTCGGGATAT AGGGCAGCAG GGTGAGATGG ATGAAGCAGG TGTTCTTCGG GCCGTCCTCG 180  
181 AAGCTCATCT GCGGATCGC TTCCAGGAAG GGCAGCGATT CGATGTCGCC GACGGTGCCG CCGATCTCGA CCAGCGCCAC GTCGGCGCCC 270  
271 GGGGCGCCCT CCGGATCGA CAGCTTGATC TCGTCGGTGA TGTGCGGAAT GACCTGCACC GTGCCGCCA GGTAGTCGCC GCGCCGTTCC 360  
361 TTGTCGATCA CCGACTTGTA GATCTGGCCG GTGGTGAAGT TGTGCGCCG GCTCATGCGC GCGCTGGAAA AGCGTTCGTA GTGACCCAGG 450  
451 TCGAGGTCGG TTTCCGGCCG GTCGTGGTG ACGAACACCT CGCGTGCTG GAACGGGCTC ATCGTTCCGG GGTGACGTT GATGTAGGGA 540  
541 TCGAGCTTCA AGAGGGTGAC GCGGATGCCG CCGGATTCGA GCAGCGCAGC GAGCGAGGCG GAGGCGATCC CTTTCCGAG GGAAGAAACC 630  
631 ACTCCGCGCG TGACAAACAC GACTTCTGTC ATGTCGTATG CCGGGGCGGG TGATGACGGA TTCTACTCCA TCGTCAAAGT CCGCTCAATG 720  
721 ACACGGCGCC CCGCGCCCG CGCCGGCGCG GCGCGCTCCG GGATTGACTG TCCGGCGCCG CGAACTATAA ACTTTCGGCG CCGGGCGTAC 810  
811 CCAGGCTTGA AAGAGCGTC CCGGCTCATC CGTCCCTCC CCCGCAGGAG ATGAAACATG GAAAAGTCGA ACACCGACGC GCTGCTCGAA 900  
  
M E K S N T D A L L E  
901 AACAAACGGC TTTATGCTGG CGGGCAGGCA ACGCACAGGC CCGGCCATCC CGGAATGCAG CCCATCCAGC CGTCGCGGCG GGTGCGCGTG 990  
N N R L Y A G G Q A T H R P G H P G M Q P I Q P S R R V A V  
991 GTCGCCTGCA TGGACGCCG CCTCGACGTC GAGGATCTGC TGGGCTGCA GACCGGCGAG GCGCACATCA TCCGCAACGC GGGCGCGTG 1080  
V A C M D A R L D V E D L L G L Q T G E A H I I R N A G G V  
1081 ATCAACGAGG ATGCGATCCG CTGCCTGATC ATTTGACACC ATCTGCTGAA CACCCACGAG ATCATCCTCG TCCACCACAC CCGCTGCGGC 1170  
I N E D A I R C L I I S H H L L N T H E I I L V H H T R C G  
1171 ATGTCGCGCT TCACCGACGA CCTGCTCCGG GCCCGCTGG AAGCGATGC GGGCGCGGAA AAGCTGATCG GGCAGGCCAC CCGCCGCGCC 1260  
M L A F T D D L L R A G L E G D A A A E K L I G Q A T G R A  
1261 TTCGTACGCG CCGGCAAGGC CTCGGCCAGC CCGGCCGCT TCCAGGCTTT CCGCGGCCG CCGGAGCCGC TGGACGCGCC GCGCAGCGAC 1350  
F V S A G K A S A S P A A F Q A F R G P P E P L D A P R S D  
1351 GCGAGCACGG AACGCATCGC GCGGACGTC AGACGCGGCC TCTCCATCAT CCTCAATCAC CCGTGGCTGC CGACCGCCGG GCCGGACGG 1440  
A S T E R I A A D V R R G L S I I L N H P W L P T A G P D A  
1441 ATCACCGTGC GCGGCTTCAT CTACGACGTC GATACCGGCC GGCTGGAGGA AGTGAGCTAC CCGGGGCCGA TGGGCGGCTT CCGCTAGCCC 1530  
I T V R G F I Y D V D T G R L E E V S Y P G P M G G F G \*  
1531 CTGTTGACGC TAGGGCCGCA CCGCTCGAT CAGGAGGCGC ACGCCGCGCG CGTCGACCGC GACGTCGCGC AGCTCGCCTT CCAGATCGCC 1620  
1621 GGCCGCCGCC GCGGGCCCGC CGGATTCGA GACGCGCGCG ACCAGTTCA CCCGTTGCTG GCGGACAGC GTGTTGCCGG GATTATCGC 1710  
1711 GCGCGCTCG TCCAGCGTGA AATCCAGCG CAGGTCGCCC GCCCGCGCGG GATCGCCGC GACCGCGGG CCGCCGCGCG CAGCGCGGGC 1800  
1801 GAAGACGAAG AGCACGTCGT CCGCGCCGAG TTGCGCACGC AGGGCGGGCG CGACGTCGAA CCGG 1864

Fig. 1-1. Nucleotide sequence of the COSase gene of *T. thioparus* THI115. The deduced amino acid sequence is shown. The putative Shine-Dalgarno sequence is underlined.

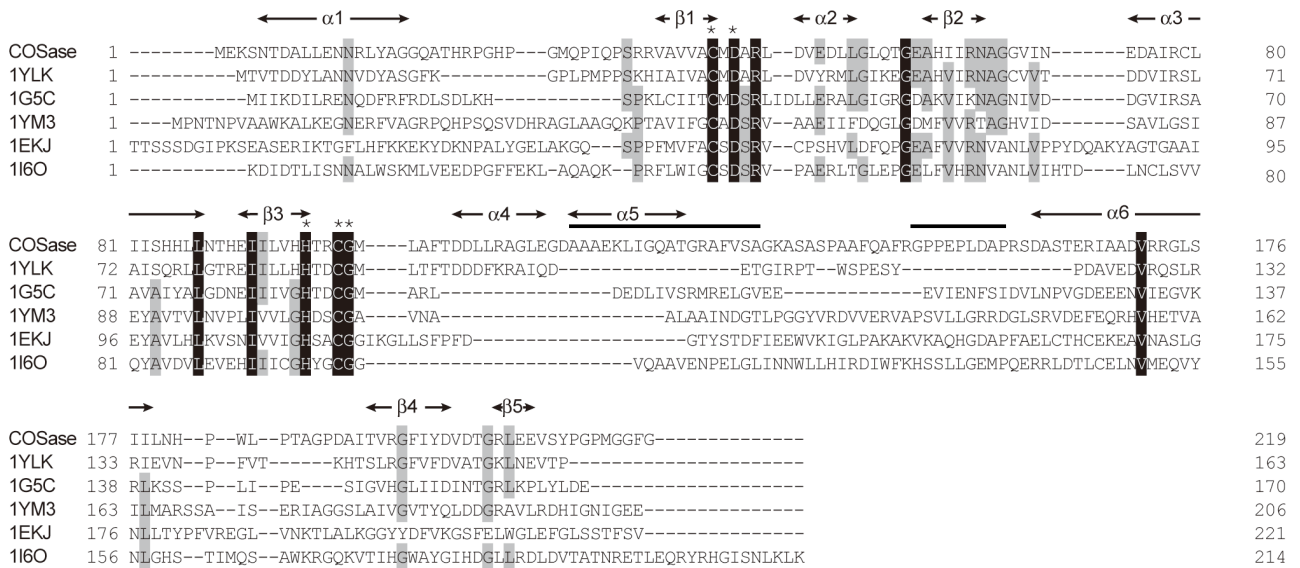


Fig. 1-2. Alignment of amino acid sequences of COSase of *T. thioparus* THI115 and  $\beta$ -CA of some bacteria. COSase and each  $\beta$ -CA are aligned using TopMatch (Sippl and Wiederstein, 2008), and the alignments are shown using GENETYX-MAC ver. 14 (GENETYX). The residues that are identical in all sequences and identical in more than 50% of six sequences are boxed in black and gray backgrounds, respectively. The secondary structure and characteristic regions of COSase are shown by arrows and bars above the sequence, respectively. The zinc binding residues (Cys44, His97 and Cys100) and the residues (Asp46 and Gly101) that stabilize the water molecule in the fourth coordination site of COSase are marked by asterisks. The species, clade and PDB accession number of each sequence are as follows: *Mycobacterium tuberculosis*, clade D, 1YLK; *Methanobacterium thermoautotrophicum*, clade D, 1G5C; *Mycobacterium tuberculosis*, clade C, 1YM3; *Pisum sativum*, clade B, 1EKJ; and *Escherichia coli*, clade A, 1I6O.

## 第 2 章 COSase の酵素学的な性質及び結晶構造解析

### 2-1 COSase の精製

#### 2-1-1 はじめに

コークス廃液中には、フェノール類、アンモニア、シアン化物が高濃度に含まれる。この内、有毒なシアン化物は、コークスガスの脱硫の際に得られる硫黄を、高温/アルカリ性条件下で反応させることで、より毒性の低い  $\text{SCN}^-$  に変換される。その後、 $\text{SCN}^-$  はさらに、活性汚泥法による処理で分解される。当研究室では、この活性汚泥から  $\text{SCN}^-$  を唯一のエネルギー源として生育する、化学合成無機独立栄養細菌 *T. thioparus* THI115 株 (NBRC 105750) を分離した (Katayama *et al.*, 1992)。 $\text{SCN}^-$  の生物による分解は、COS とアンモニアに分解される経路と、シアン酸イオン ( $\text{CNO}^-$ ) と  $\text{H}_2\text{S}$  に分解される経路の 2 つが知られている (Katayama *et al.*, 1992; Sorokin *et al.*, 2001)。*T. thioparus* THI115 株は、前者の経路により  $\text{SCN}^-$  の分解を行ない、この初発反応を触媒する酵素として、新規酵素である SCNase が精製された (Katayama *et al.*, 1992)。SCNase は、アミノ酸配列の比較により、nitrile hydratase に相同性を示したが、nitrile hydratase 活性は検出されず、 $\text{SCN}^-$  の分解を特異的に行なう酵素であることが明らかとなっており (Katayama *et al.*, 1998)、新規酵素番号 EC 3.5.5.8 も付与されている (<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/5/5/8.html>)。

*T. thioparus* THI115 株は、SCNase によって生じた COS を、さらに  $\text{H}_2\text{S}$  と  $\text{CO}_2$  に分解し、硫黄画分は、最終的に硫酸にまで酸化され、その過程でエネルギーを獲得する (Katayama *et al.*, 1993; Kim and Katayama, 2000)。このことから、 $\text{SCN}^-$  を初発物質とする代謝経路の 2 番目のステップである、COS の分解に関わる酵素の精製が次に試みられ、COS 分解酵素 (COSase) が精製された (齋藤, 2003; 長畑, 2003)。その際、75 g のペレットから 750  $\mu\text{g}$  の COSase が精製された。当初、齋藤 (2003)、長畑 (2003) は、Lowry 法によるタンパク質量に基づき、精製した COSase 量を 3.1 mg としていた。しかし、その COSase の酵素標品に含まれる Tris が、Lowry 法による比色定量の妨害物質であることが考慮されていなかったため、本来の値よりも高く見積もっていたことが予想された。そこで、COSase の酵素溶液と同じ濃度及び pH の Tris 溶液を用いて、検量線を作成し、補正したところ、酵素量は 750  $\mu\text{g}$  となったことを記しておく。COSase の酵素学的な性質を明らかにするには、さらに多くの酵素を必要とするため、再度 *T. thioparus* THI115 株の菌体から精製することとした。これまでの精製は、オープンカラムを用いて行なっていたが、今回は効率的に精製することを目指し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、精製を試みた (2-1-2-3~2-1-2-4)。また、齋藤 (2003)、長畑 (2003) による精製 COSase 標品を用いた N 末端アミノ酸配列の解析、その配列に基づいて COSase のクローニング (長畑, 2003)、さらに、大腸菌を用いた COSase (組換え型 COSase) の大量発現及び精製が行なわれている (小川, 2005)。そこで今回の精製では、COS 分解活性ではなく、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を用いた組換え型 COSase とのゲル上のタンパク質のバンドの比較により、*T. thioparus* THI115 株から

COSase (野生型 COSase) を精製することにした。

## 2-1-2 材料と方法

### 2-1-2-1 *T. thioparus* THI115 株の培養と集菌

無機塩培地である mTC 培地に、生育基質として 10 mM チオシアン酸カリウム (KSCN) を加えた mTC10 培地 (Table 2-1) を用いて、*T. thioparus* THI115 株を培養した。培養は暗所、120 rpm、30 °C で回転振盪した。添加したチオシアネートが、すべて分解されたことを確認した後、8,000 × g、4 °C で 30 分遠心することで集菌した。50 mM Tris-HCl (pH 8.5) を用いて 1 回洗浄後、ペレットを -80 °C で保存した。

### 2-1-2-2 SCN<sup>-</sup>の定量

Kim and Katayama (2000) の方法を参考に行なった。培養液を 21,500 × g、4 °C で 3 分間遠心し、上清を回収した。その上清 50 μL を、純水 3.95 mL、10% (w/v) Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 0.2 mL、5 M HNO<sub>3</sub> 0.2 mL を入れた試験管に加え、よく混合し、Abs. 420 nm を測定した。SCN<sup>-</sup>量は、KSCN を用いて作成した検量線から求めた。

### 2-1-2-3 粗抽出液の調製

凍結保存しておいた細胞のペレット (約 6 g) に対し、約 100 mL の 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) を用いて細胞を懸濁後、50 mL 容ポリプロピレンチューブ 3 本に分け、氷冷しながら超音波破碎 (TOMY UD-201、OUTPUT6、DUTY50) を 1 分ずつ、1 分間の間を置きながら、約 10 回行ない、菌体を破碎した。その後、25,000 × g、4 °C で 30 分間遠心し、遠心上清を粗抽出液とした。

### 2-1-2-4 カラムクロマトグラフィーによる COSase の精製

5 種類のカラムを用いて、COSase の精製を行なった。用いた担体は、強陰イオン交換体である TOYOPEARL SuperQ-650 (東ソー)、フェニル基をリガンドにもつ RESOURCE PHE (GE ヘルスケア)、フェニル基より疎水性が高いブチル基をリガンドに持つ TOYOPEARL Butyl-650 (東ソー)、ゲルろ過用担体である TSKgel G3000SW<sub>XL</sub> (東ソー)、強陰イオン交換体である Mono Q 5/50 GL (GE ヘルスケア) であり、この順にカラム操作を行なった。

#### 2-1-2-4-1 TOYOPEARL SuperQ-650 カラムクロマトグラフィー

50 mM Tris-HCl (pH 8.5) で平衡化した TOYOPEARL SuperQ 15 mL (カラム内径 1.5 cm、ゲルの高さ 8.5 cm) に、粗抽出液 108 mL を流速 3 mL min<sup>-1</sup> でロードした。280 nm の吸光度が下がるまで、50 mM Tris-HCl (pH 8.5) で洗浄後、50 mM、100 mM、及び 150 mM NaCl の 3 段階の塩濃度の 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) でタンパク質を溶出させた。各塩濃度による溶出は、280 nm の吸光度が下がるまで行なった。流速は 2 mL min<sup>-1</sup> で行なった。

#### 2-1-2-4-2 RESOURCE PHE カラムクロマトグラフィー

SDS-PAGE で COSase の存在が確認された画分 (50 mM NaCl で溶出した前半 40 mL 及び 100 mM NaCl で溶出した 43 mL) に、最終濃度が 20%になるように硫酸アンモニウムを加えた。13.5%硫酸アンモニウムを含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) で平衡化した RESOURCE PHE 1 mL に、試料を流速 3 mL min<sup>-1</sup> でロードした。13.5%から 0%硫酸アンモニウムを含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) のグラジエント (30 mL) により、タンパク質を溶出した。流速は 1.5 mL min<sup>-1</sup>で行ない、フラクションコレクター (3 mL fraction<sup>-1</sup>) を用いて回収した。

#### 2-1-2-4-3 TOYOPEARL Butyl-650 カラムクロマトグラフィー

COSase 画分に最終濃度が 30%になるように硫酸アンモニウムを加え、30%硫酸アンモニウムを含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) で平衡化した TOYOPEARL Butyl-650 50 mL (カラム内径 2.0 cm、ゲルの高さ 16 cm) に、流速 3 mL min<sup>-1</sup>でロードした。30%から 0%硫酸アンモニウムを含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) のグラジエント (200 mL) により、タンパク質を溶出した。流速は 3.0 mL min<sup>-1</sup>で行ない、フラクションコレクター (5 mL fraction<sup>-1</sup>) を用いて回収した。

#### 2-1-2-4-4 ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

COSase 画分 (25 mL) は、Centriprep Ultracel YM-30 (Millipore) を用いて 15,000 × g、4 °C で遠心し、1.27 mL まで濃縮した。150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 6.8) で平衡化したゲルろ過カラム TSKgel G3000SW<sub>XL</sub> (内径 7.8 mm、ゲルの高さ 30 cm) に、100 μL の濃縮した試料をロードし、溶出した。流速は 0.5 mL min<sup>-1</sup>で行なった。溶出液の回収は、280 nm の吸光度を参考にして行なった。

#### 2-1-2-4-5 Mono Q 5/50 GL カラムクロマトグラフィー

COSase 画分 (8.5 mL) を 50 mM Tris-HCl (pH8.5) で 10 倍希釈し、塩濃度を 15 mM に下げた。50 mM Tris-HCl (pH 8.5) で平衡化した Mono Q 5/50 GL 1 mL にロードした。0 mM から 350 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) のグラジエント (40 mL) により、タンパク質を溶出した。流速は 1 mL min<sup>-1</sup>で行ない、フラクションコレクター (2 mL fraction<sup>-1</sup>) を用いて回収した。

#### 2-1-2-5 SDS-PAGE による COSase の確認

分離ゲル (12.5%ポリアクリルアミド、373 mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.1% SDS からなる溶液 17.1 mL に過硫酸アンモニウム 10 mg、*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine 10 μL を加えた) 及び濃縮ゲル (3%ポリアクリルアミド、125 mM Tris-HCl (pH 6.8)、0.1% SDS からなる溶液 10 mL に過硫酸アンモニウム 15 mg、*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine 20 μL を加えた) を用いて、ポリアクリルアミドゲルを作成した。泳



動槽 (AE-6220 型、ATTO) にセットし、泳動バッファー (25 mM Tris-HCl, 0.192 mM グリシン、0.1% SDS) を加えた。マーカーには、Bio-Rad の SDS-PAGE Standards、Broad Range を使用した。サンプルに 1 / 4 倍量の 5 × サンプルバッファー (50%グリセリン、25% 2-メルカプトエタノール、5% SDS、0.05% BPB) を加え、100 °C、5 分加熱変性後、ウェルにアプライした。濃縮ゲル中は 15 mA、分離ゲル中は 30 mA で泳動した。染色液 (28.6%メタノール、14.3%酢酸、クーマシーブリリアントブルー R-250 (35.7 mg L<sup>-1</sup>)) に浸し、ゆるやかに振盪させて染色後、脱色液 (38.5%メタノール、15.4%酢酸) に浸し、さらに振盪させ脱色した。

#### 2-1-2-6 タンパク定量

タンパク定量は、Lowry 法 (Lowry *et al.*, 1951) により行なった。検量線は、ウシ血清アルブミン (heat shock fraction、Sigma-Aldrich) を用いて作成した。

### 2-1-3 結果

培地に添加した 10 mM チオシアネートを完全に分解した培養液 10 mL を、90 mL の mTC10 培地を入れた 500 mL 容坂口フラスコ 8 本に接種し、前培養とした。チオシアネートを完全に分解したことを確認後、直ちに、その培養液 90 mL を 800 mL の mTC10 培地を入れた 3 L 容坂口フラスコ 8 本に、それぞれ接種し、本培養を行なった。約 5 日間の好氣的培養後、集菌して 5.88 g 湿重の菌体を得た。超音波破碎し、遠心後の上清 108 mL を粗抽出液とした。

TOYOPEARL SuperQ-650 カラムクロマトグラフィーにより、50 mM、100 mM、及び 150 mM NaCl による溶出画分として、それぞれ 70 mL (前半の溶出画分 40 mL と後半の溶出画分 30 mL)、43 mL、及び 45 mL を得た。各画分の SDS-PAGE の結果 (Fig. 2-1) から、50 mM NaCl による溶出画分の前半 40 mL と、100 mM NaCl による溶出画分で、COSase のバンドが明らかに確認された。そこで、これらの画分を、別々に RESOURCE PHE カラムクロマトグラフィーで分画した。予備実験では、13.5%硫酸アンモニウム存在下で COSase は、このカラムへ吸着されることが予想されたが、前者のサンプルを用いて SDS-PAGE を行なったところ、COSase のバンドは、全ての画分で確認できなかった (Fig. 2-2)。そのため、後者のサンプルも同様に素通りした画分に COSase が存在すると考え、両方の素通りした画分を 1 つにまとめ、さらに TOYOPEARL Butyl-650 カラムクロマトグラフィーで分画した。各フラクションの SDS-PAGE の結果 (Fig. 2-3) から、フラクション No. 34~No. 38 で濃い COSase バンドが確認され、それらのフラクションを回収し、以降の試料とした。

ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる精製では、1 回当たりにロードする溶液量を出来るだけ少量にすることがより良い分離に繋がる。そこで、今回はロードする量を 100  $\mu$ L とした。25 mL の TOYOPEARL Butyl-650 カラムクロマトグラフィにより回収した酵素溶液を限外濾過を行なうことで 1.27 mL に濃縮後、100  $\mu$ L ずつゲルろ過カラムで分離した。280 nm の吸光度が最も高い、ゲルろ過カラムから 21 分付近に溶出するタンパク質が COSase であると予想され、SDS-PAGE からも COSase のバンドとして検出された (Fig. 2-4)。しかし、この他にも薄いバンドが数多く検出されたので、さらに Mono Q カラムクロマトグラフィーを行なった。

MonoQ カラムクロマトグラフィーのフラクションの SDS-PAGE の結果 (Fig. 2-5) から、フラクション No. 9、10、11 では、COSase のバンドがメインバンドとして検出された。Fig. 2-1~Fig. 2-3 では、組換え型 COSase は 1 本のバンドとして検出されたのに対し、Fig. 2-5 では、97 k 付近にバンドが検出された。その他のレーンでも同様のバンドが存在することから、5  $\times$  サンプルバッファーに夾雑タンパク質が混入している可能性があった。そのため、本実験では、このようなバンドは後から混入した夾雑タンパク質によるものと考えたことにした。こうして、バンドがほぼ 1 本であったフラクション No. 10 の画分で COSase が精製されたと見なし、以降の実験には、このフラクションだけを使用した。フラクション No. 10 のタンパク質量は、67  $\mu$ g in 2 mL であった。また、Fig. 2-5 の COSase のバンド強度を目視で比べると、No. 9 と No. 10 は同等、No. 11 は No. 10 の 1/3 程度であった。そのため、これらのフラクシ

ンを合わせた COSase 量は、およそ 160  $\mu\text{g}$  となる。

#### 2-1-4 考察

これまでの COSase の精製では、オープンカラム (DEAE Sephacel, DEAE Sephadex A-50, Hydroxyapatite Bio-Gel HTP Gel, Q Sepharose high performance, Phenyl Sepharose CL-4B の計 5 種類) を用いて行なっていたため、精製が完了するまで、長期間必要であった (齋藤, 2003; 長畑, 2003)。その際は、75 g のペレットから 750  $\mu$ g の COSase が得られた。今回は、6 g のペレットから 67  $\mu$ g の COSase が得られたため、COSase 精製の収量はほぼ変わらなかったものの、HPLC を用いたことで精製に要する時間が 3 日に短縮された。

疎水性相互作用クロマトグラフィーとして用いた RESOURCE PHE では、吸着されなかったため、今回は、さらに疎水性の強い TOYOPEARL Butyl-650 を用いた。そのため、今後精製する際は、RESOURCE PHE を省いて行なうことが可能と考えられる。また、今回は、MonoQ のフラクション No. 10 のみを最終精製品としたが、フラクション No. 9 と 11 にも COSase がかなり存在していた。これらは、ゲルろ過カラムや MonoQ カラムに再度かけることで精製でき、収量を増やすことも可能と考えられる。また、MonoQ カラムとゲル濾過カラムにかける順番を逆にする 것도、COSase の精製に有効であるかもしれない。

精製過程の COSase のロスが、どの程度かは不明であるが、ロスがないものと仮定すると、ペレット中に COSase は 0.0027% 存在することになる。齋藤 (2003)、長畑 (2003) は、75 g のペレットをフレンチプレスで菌体破碎し、その遠心上清である粗抽出液中のタンパク質が、2740 mg であることを明らかにした。このタンパク質は、可溶性タンパク質と考えられることから、ペレットの 3.7% が可溶性タンパク質であるとすると、可溶性タンパク質の 0.07% が COSase であると見積もられる。アミノ酸配列において、COSase と相同性の高い  $\beta$ -CA に関しては、パセリとホウレンソウの葉に含まれる可溶性タンパク質の 1~2% が、 $\beta$ -CA であることが知られている (Tobin, 1970; Okabe *et al.*, 1984)。COSase は、*T. thioparus* THI115 株のエネルギーを獲得する反応経路に関わる酵素、一方、パセリとホウレンソウの  $\beta$ -CA は、RuBisCO へ CO<sub>2</sub> を供給する酵素である。そのため、両酵素とも重要ではあるが、生理的意義は異なり、単純に比較はできないものの、COSase は、 $\beta$ -CA よりかなり低い含有率であるといえる。ただし、0.07% という値が、*T. thioparus* THI115 株の生育に影響を及ぼすかどうかは、COSase の COS 分解活性によって決まるため、以降に行なった酵素学的な性質を明らかにすることは重要である。

Table 2-1. Composition of mTC10 medium.

|  |                         |
|--|-------------------------|
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$   | $0.5 \text{ g L}^{-1}$  |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   | $0.2 \text{ g L}^{-1}$  |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  | $0.05 \text{ g L}^{-1}$ |
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  | $0.01 \text{ g L}^{-1}$ |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  | $0.01 \text{ g L}^{-1}$ |
| Trace metal solution   | 10 mL                   |
| KSCN   | 10 mM                   |
| pH   | 7.0                     |
| Composition of trace metal solution ( $\text{mg L}^{-1}$ )   |                         |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 8; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 4;  |                         |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 4; $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 4; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 4; |                         |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 4  |                         |

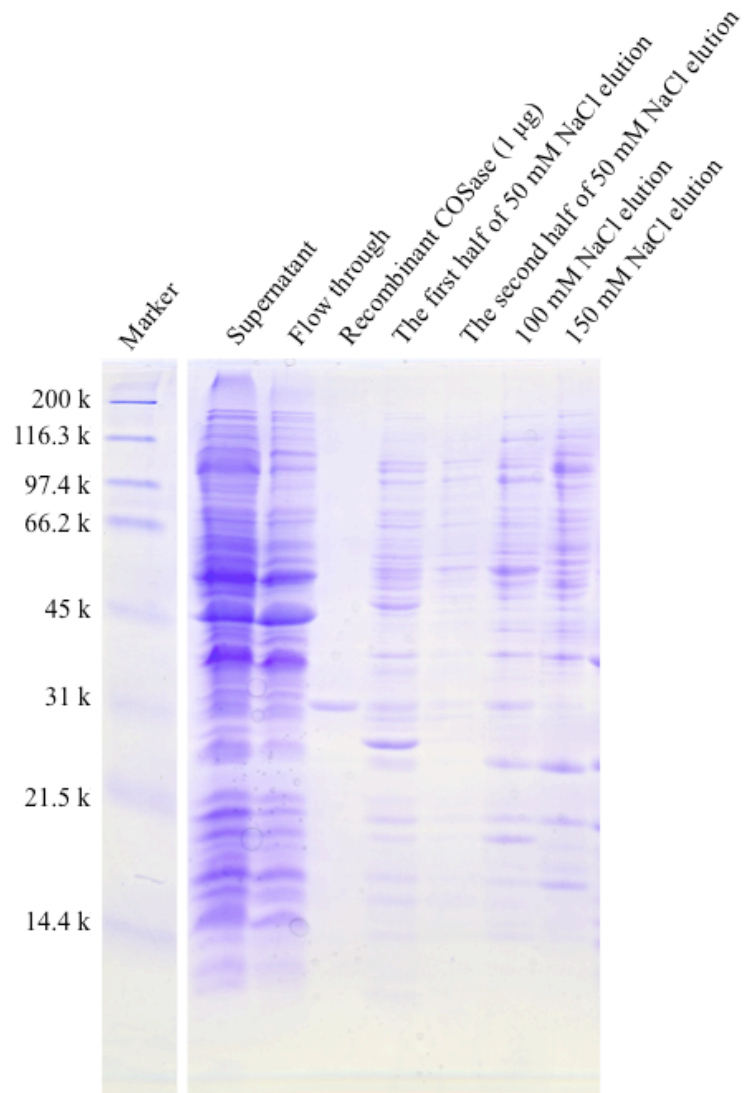


Fig. 2-1. SDS-PAGE (12.5%) of TOYOPEARL SuperQ-650 column chromatography of COSase. Crude extract was loaded and eluted with 50, 100, 150 mM NaCl. Elution volume was 40 mL of the first half of elution and 30 mL of the second half with 50 mM NaCl, 43 mL with 100 mM NaCl, 45 mL with 150 mM NaCl. Fifteen microliter from the sample was loaded on SDS-PAGE.

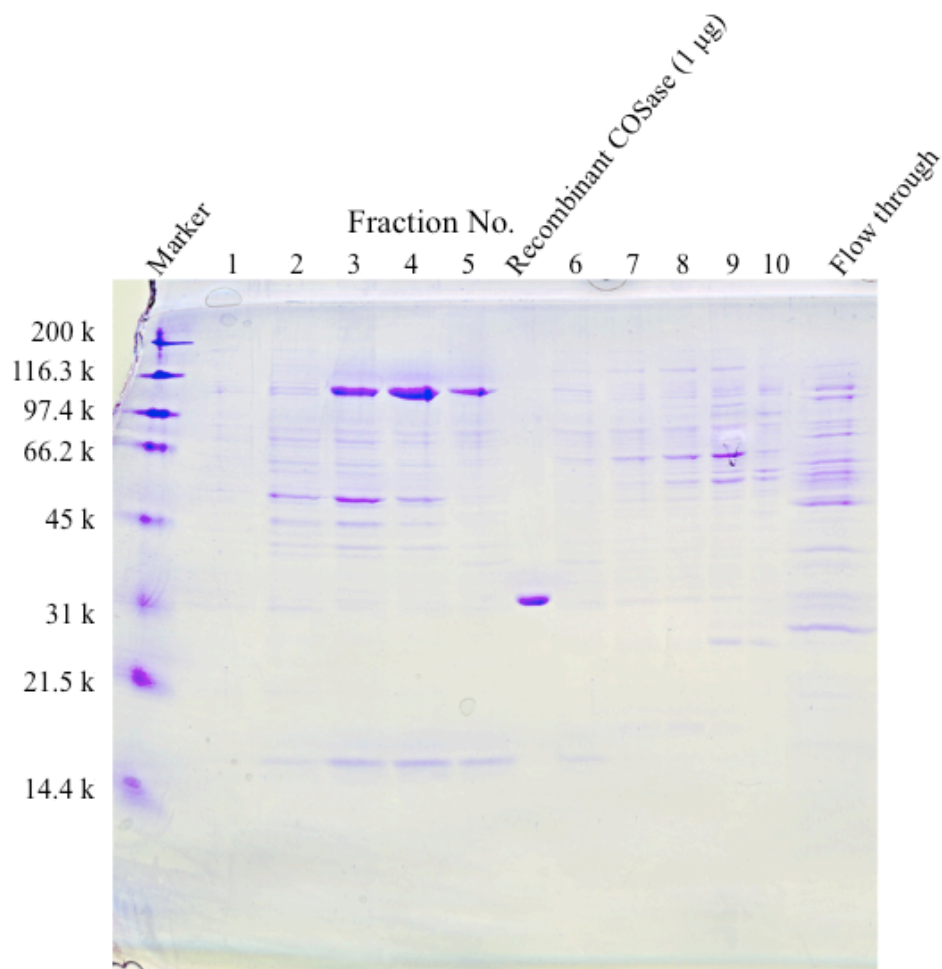


Fig. 2-2. SDS-PAGE (12.5%) of RESOURCE PHE column chromatography of COSase. The former elute by 50 mM NaCl from TOYOPEARL SuperQ-650 column chromatography was loaded and eluted with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  from 30% to 0% (total volume 30 mL). Fifteen microliter from each fraction was loaded on SDS-PAGE.

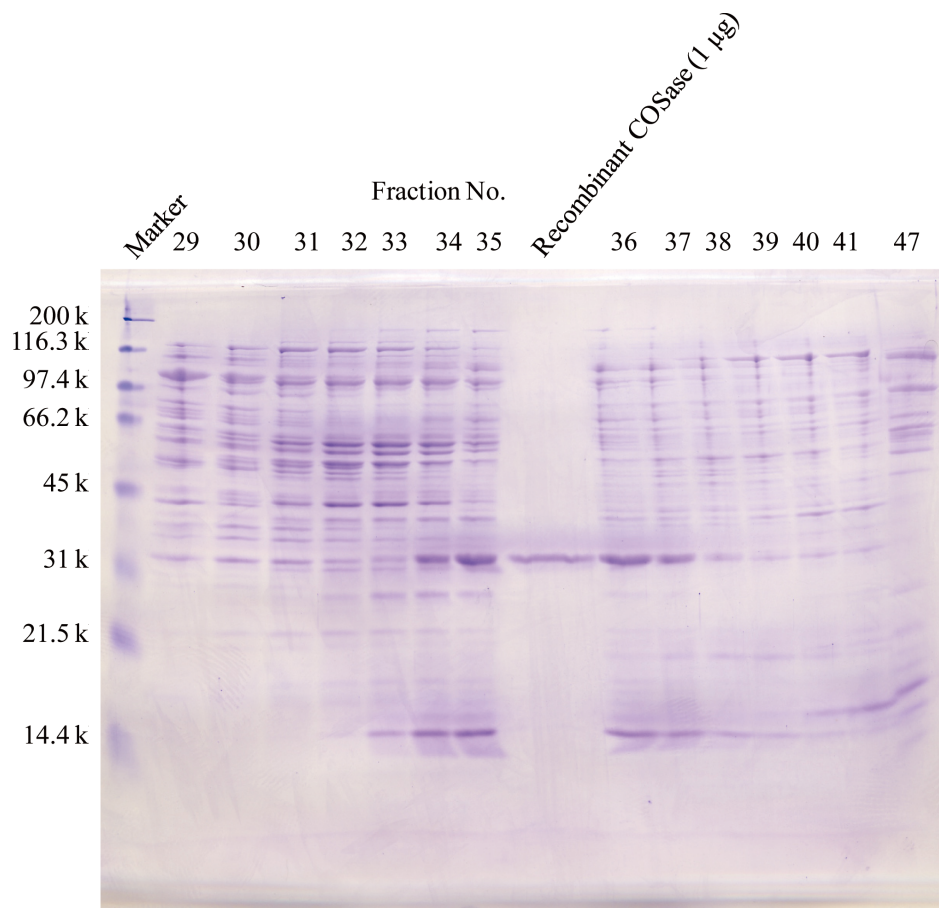


Fig. 2-3. SDS-PAGE (12.5%) of TOYOPEARL Butyl-650 column chromatography of COSase. Flow through from RESOURCE PHE column chromatography was loaded and eluted with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  from 30% to 0% (total volume 200 mL). Fifteen microliter from each fraction was loaded on SDS-PAGE.



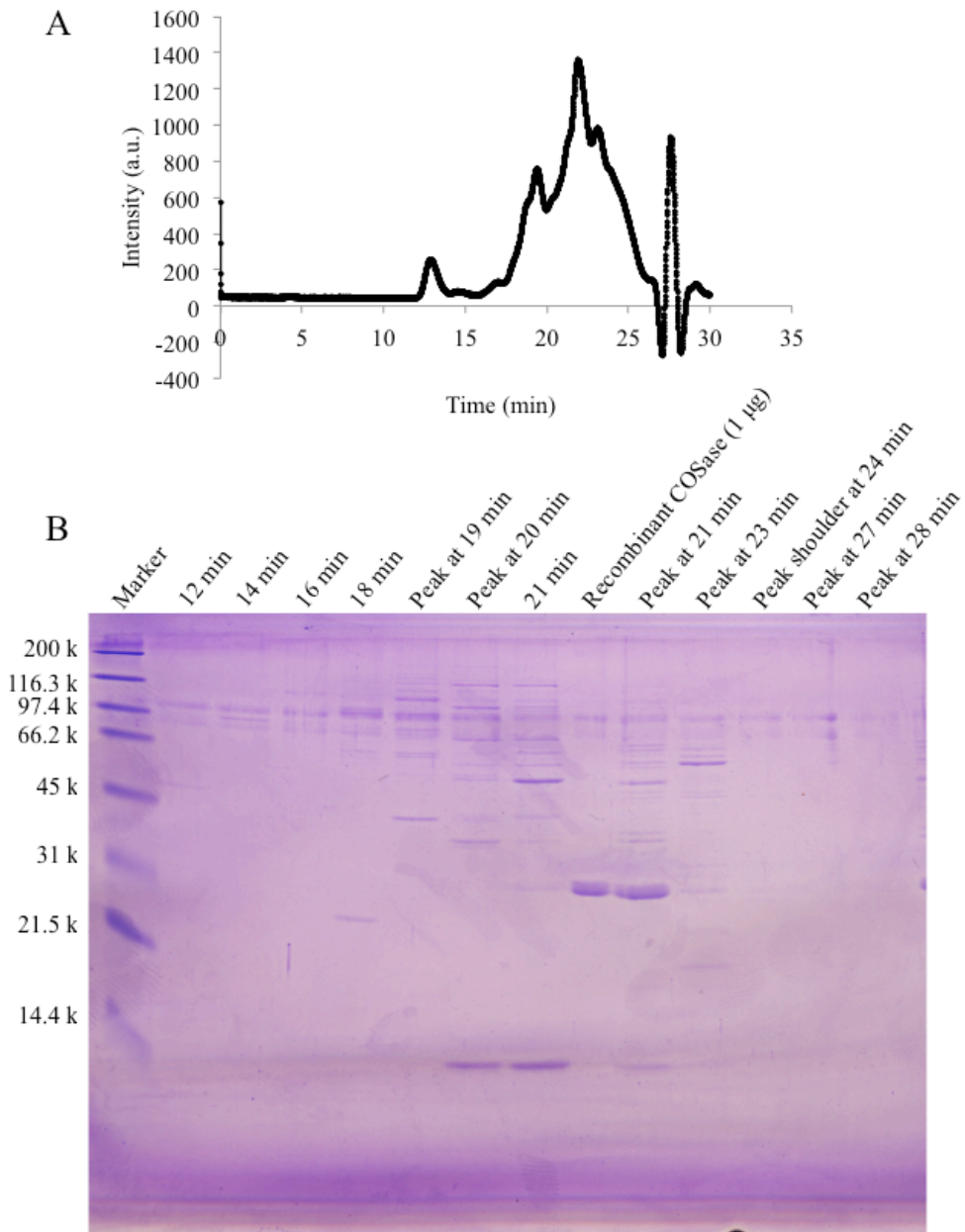


Fig. 2-4. TSK-GEL G3000 column chromatography of COSase. (A) A plot of the arbitrary unit at 280 nm versus the elution time. (B) SDS-PAGE (12.5%). The elute from TOYOPEARL Butyl-650 column chromatography was loaded and eluted. Fifteen microliter from each fraction was loaded on SDS-PAGE.

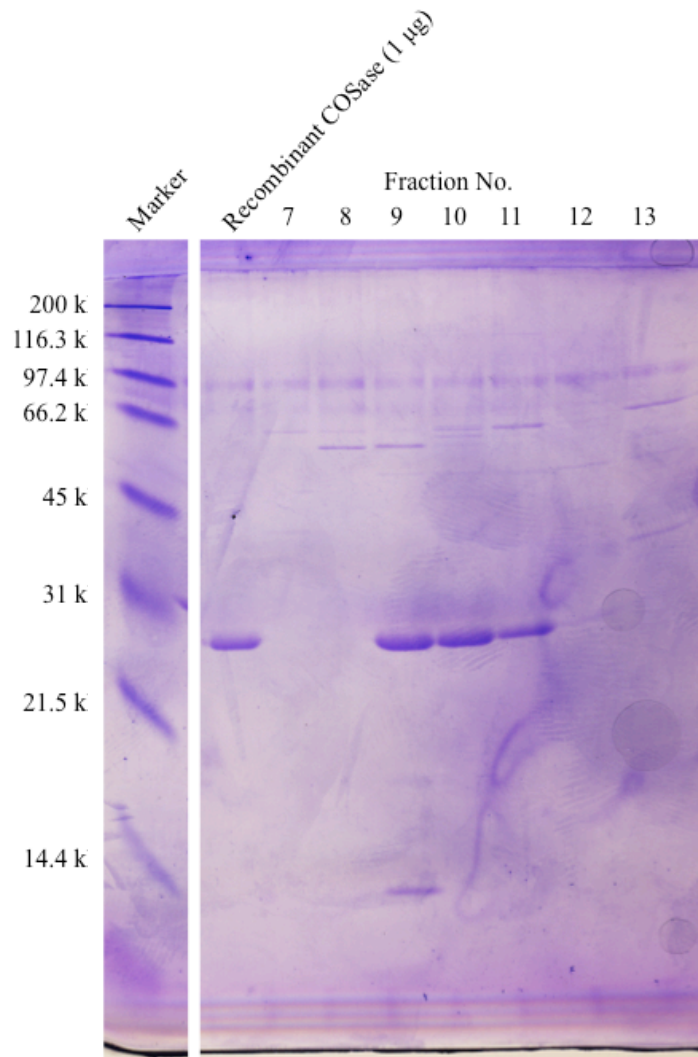
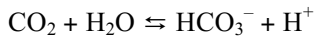


Fig. 2-5. SDS-PAGE (12.5%) of MonoQ 5/50 GL column chromatography of COSase. The elute from TSK-GEL G3000 column chromatography was loaded and eluted with NaCl from 0 to 350 mM. Fifteen microliter from each fraction was loaded on SDS-PAGE.

## 2-2 COSase の COS、CO<sub>2</sub>、CS<sub>2</sub> 分解活性、及び *T. thioparus* THI115 株と COSase による大気濃度 COS に対する分解活性

### 2-2-1 はじめに

第1章で述べたように、COSase のアミノ酸配列は、β-CA に高い相同性がある。CA は、下記に示すように、可逆的に CO<sub>2</sub> を水和して炭酸水素イオン (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) を生成する反応を触媒する。



CA は、1933 年に動物 (ウシ) の赤血球から初めて精製され、動物における CA の主要な役割は、血液中に存在する HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> を CO<sub>2</sub> に変換し、それを肺から排出することであると示された (Meldrum and Roughton, 1933)。さらに、1939 年には、植物 (ムラサキツメクサ、コウヤワラビ、ヒメゴボウ) に CA 活性が確認され (Neish, 1939)、大気からの CO<sub>2</sub> の取り込みや、RuBisCO への CO<sub>2</sub> の供給を促進することが明らかになった (Shiraiwa and Miyachi, 1979; Hatch and Burnell, 1990)。一方、原核生物においては、細菌 (*Neisseria sicca*) の CA は、1972 年、古細菌 (*Methanosarcina thermophila*) の CA は、1994 年に初めて報告されている (Adler *et al.*, 1972、Brundell *et al.*, 1972、Alber and Ferry, 1994)。動物や植物では、上記のように、CA が呼吸や光合成などの重要な反応を触媒することから、必須の酵素であることが知られている。高濃度の CO<sub>2</sub> 条件下で生育する一部の細菌などで、CA を持たない生物がいるものの (Nishida *et al.*, 2009; Ueda *et al.*, 2012)、ほとんどの真核生物や原核生物において、ゲノム解析やウエスタンブロットによる抗原抗体反応により、CA の存在が明らかになっている (Hewett-Emmett and Tashian, 1996; Smith *et al.*, 1999; Smith and Ferry, 2000)。しかし、光合成細菌では、光合成反応速度の促進に CA が寄与していると考えられているが、その他の微生物において、CA が生体内でどのような作用を及ぼしているのかは明確にされていない (Badger and Price, 1989; Smith and Ferry, 2000)。

動物の CA については、特に早い時期から研究が行なわれてきているが、調べられている限り、全ての動物の CA は α-CA に分類され、COSase や β-CA とはアミノ酸配列や全体的な結晶構造が異なる。その働きに関しては、呼吸への関与だけではなく、pH の恒常性など、様々な重要な生理機能に関与することが知られ、他のクラスの CA と比べても格段に研究が進んでいるといえる。その過程で α-CA は、acetaldehyde の水和、*p*-nitrophenyl acetate、1-fluoro-2,4-dinitrobenzene、2-hydroxy-5-nitro-α-toluenesulfonic acid sultone、*p*-nitrophenyl phosphate の加水分解反応も触媒することが明らかとなった (Pocker and Meany, 1965; Pocker and Stone, 1965; Henkart *et al.*, 1968; Kaiser and Lo, 1969; Pullan and Noltmann, 1985)。

COS に対する反応性については、α-CA (ウシの CA) と β-CA (エンドウマメの CA) の両者で、COS も加水分解することが報告されている (Haritos and Dojchinov, 2005; Protoschill-Krebs *et al.*, 1996)。ウシの CA は、COSase とはアミノ酸配列の相同性がなく、COS 分解活性が低いのにに対して、COSase と相同性のあるエンドウマメの CA は、高い COS 分解活性を持つ (Table 1-1) (Protoschill-Krebs *et al.*, 1996; Haritos and Dojchinov, 2005; Ogée *et al.*, 2016)。さらに、β-CA と相同性があるにもかかわらず、CA 活性を示さない CS<sub>2</sub> hydrolase も COS を分解する (Smeulders *et al.*, 2011, 2013)。多くの細菌の CA は、β-CA に分類さ

れることから、土壌に生息する細菌にも、同様の酵素を含むものが多く存在することが予想され、その意味では、大気に微量に存在する COS の消失過程において、これらの酵素が関与している可能性が考えられる。このため、 $\beta$ -CA に相同性の高い COSase のカイネティクスを明らかにし、既知の COS 分解酵素と比較することにした。

大気微量成分のような、極めて低い濃度の物質に関する微生物による分解や酵素反応は、検証が難しく、研究例も乏しい (Conrad, 1996)。COS の場合、1-2 に記したように、多様な分類群に属する生物で COS 分解能が明らかになっているが、対流圏の COS 濃度 (およそ 500 pptv) の分解能を調べた研究は、限られている (Kato *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Kusumi *et al.*, 2011; Masaki *et al.*, 2016)。これまでに、土壌から分離された細菌に関しては、*Williamsia* 属、*Cupriavidus* 属、*Mycobacterium* 属の細菌で、高濃度の COS の分解が報告されているが、この中で、500 pptv 前後の COS の分解が確認されたのは、*Mycobacterium* 属の細菌だけであった (Kato *et al.*, 2008)。一方、土壌から分離された真菌に関しては、*Scytalidium* 属、*Trichoderma* 属、*Beauveria* 属の子嚢菌の計 7 菌株が 500 pptv 前後の COS の分解能を示した (Masaki *et al.*, 2016)。また、アンコール遺跡の劣化した砂岩表面から分離された真菌、*Fusarium solani* THIF01 株でも、500 pptv 前後の COS の分解が確認されている (Li *et al.*, 2010)。これらの結果は、土壌環境における COS の取り込みにおいて、細菌や真菌の一部が寄与していることを示す。一方、*Mycobacterium* 属に属する *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株は、ゲノム配列が決定されており、 $\beta$ -CA にアノテーションされる配列が、3 つ (Rv1284, Rv3273, Rv3588c) 存在することが確認されている (Cole *et al.*, 1998)。この中で、Rv3273 を除く Rv1284 と Rv3588c は、生長に必須であり、飢餓条件下では、特に Rv1284 の転写活性が、14 倍高くなることが知られている (Sasseti and Rubin, 2003; Sasseti and Rubin, 2003; Betts *et al.*, 2002)。また、これら 3 つの CA は、クローニングが行なわれ、酵素の精製もなされており、CA 活性があることも明らかとなっている (Covarrubias *et al.*, 2005; Minakuchi *et al.*, 2009; Nishimori *et al.*, 2009)。このようなことから、*Mycobacterium* 属細菌の  $\beta$ -CA と COSase の関連、ならびに  $\beta$ -CA においても、大気濃度の COS 分解活性のあることが予想されるが、精製された  $\beta$ -CA に COS 分解活性があるか、また、CA が、大気濃度の COS を分解できるかどうかは調べられていない。本研究では、下記に示すとおり、COSase の COS に対する  $K_m$  値が、60  $\mu$ M であることを明らかにしたが、これは、気相の濃度が 3,300 ppmv であるときの水相の濃度に相当する。この濃度は、大気中の COS 濃度の  $6.6 \times 10^6$  倍に相当する。このため、大気レベルの COS の取り込み反応を問題とする場合、実際の環境とはかけ離れた COS 濃度条件下で、カイネティクスを求めていることになる。COSase や、これに相同性の高い酵素タンパク質が、土壌環境に生息する微生物による COS の消失源として寄与するならば、大気中の COS 濃度でも、活性が検出されるはずである。そこで、大気濃度の COS に対する分解活性についても、*T. thioparus* THI115 株の菌体並びに COSase に対して測定することにした。

## 2-2-2 材料と方法

### 2-2-2-1 COS の定量

COS は、炎光光度検出器 (FPD) を装備したガスクロマトグラフ (GC-FPD) (GC-14B、島津製作所) に、反応容器の気相を注入して測定した。ガスクロマトグラフの条件は、Table 2-2 に示した。検量線作成のため、10.5%の COS 標準気体 (Balance gas: N<sub>2</sub>、日酸 TANAKA) をガスタイトマイクロシリンジで採取し、N<sub>2</sub> (99.999%、市村酸素) 置換した 102 mL 容捕集瓶に加えて希釈後、GC-FPD に注入した。2080 ppmv の COS 標準気体 (Balance gas: N<sub>2</sub>、日酸 TANAKA) を用いる場合は、希釈せずに注入した。得られたピーク高の平方根と、注入した COS 量から検量線を作成した。

### 2-2-2-2 ガスクロマトグラフによる H<sub>2</sub>S の定量

H<sub>2</sub>S は、2-2-2-1 に記載した方法で COS と同時に定量できるため、GC-FPD に気相を注入して定量した。検量線作成のため、H<sub>2</sub>S 標準気体 (2000 ppmv、Balance gas: N<sub>2</sub>、島津サイエンス東日本) をガスタイトマイクロシリンジで 1 mL 採取し、N<sub>2</sub> (99.999%、市村酸素) 置換した 102 mL 容捕集瓶に入れ、19.6 ppmv に希釈した。20、50、100、300、及び 500  $\mu$ L を各 3 連で GC-FPD に導入し、得られたピーク高の平方根と、注入した H<sub>2</sub>S 量から検量線を作成した。

### 2-2-2-3 COSase の活性測定 (ストイキオメトリーの測定)

COSase による酵素反応において、硫黄画分のストイキオメトリーを求めた。COS と H<sub>2</sub>S の定量は、GC-FPD を用いて行なった。

反応には、4.9 mL 容褐色バイアル瓶 (SVG-3、日電理化硝子) を用いた。まず、このバイアル瓶にブチルゴム栓で栓をし、そこに注射針 (針径 0.5 mm、長さ 23 mm、皮下針 1/3、星盛堂医療器工業) を 2 本刺した。片方の注射針を介して 2080 ppmv の COS 標準気体を 3 分間、0.4 kg cm<sup>-2</sup> の流速で通気し、容器内を COS で満たした。酵素反応によって生成された H<sub>2</sub>S を、発生量の少ない反応初期から定量することを可能にするため、前もって 2000 ppmv H<sub>2</sub>S 380  $\mu$ L を、このバイアル瓶に添加した。COSase 0.066  $\mu$ g を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) 200  $\mu$ L をここへ添加し、30 °C で静置し、25 分間反応させた。酵素溶液の添加直後は、気相の濃度が安定しないため、添加 5 分後から測定を開始し、その後、5 分毎に気相を採取し、ガスクロマトグラフへ注入し、COS と H<sub>2</sub>S を定量した。

### 2-2-2-4 バイアル瓶全体の COS 及び H<sub>2</sub>S 量の換算

GC-FPD を用いた COS と H<sub>2</sub>S の定量によって、気相中に存在する、これらの気体の定量はできるが、水相中の定量はできない。また、2-2-2-6 に記載する  $K_m$  と  $V_{max}$  については、メチレンブルー法により水相中の H<sub>2</sub>S の定量を実施したため、気相中の H<sub>2</sub>S 量を求めることはできない。しかし、COSase の活性を知るためには、気相と水相の両方を合わせた量として求める必要がある。そこで、ヘンリーの定数を

基にして換算を行なった。Wilhelm *et al.* (1977) によると、30 °C 下でのヘンリーの定数は、COS が 0.018 M atm<sup>-1</sup>、H<sub>2</sub>S が 0.092 M atm<sup>-1</sup> である。COS は、異なる pH 間でヘンリーの定数の変化はない (Elliott and Rowland, 1989)。一方、H<sub>2</sub>S は、pH が高くなるにつれてヘンリーの定数の値が大きくなり、その値は次のような計算で求めることができる (De Bruyn *et al.*, 1995; Dean, 1999)。

$$H(1 + K_a [H^+]^{-1})$$

ここで、 $H$  はヘンリーの定数 0.092 M atm<sup>-1</sup>、 $K_a$  は平衡定数  $1.26 \times 10^{-7}$ 、 $[H^+]$  は水素イオン濃度  $3.16 \times 10^{-9}$  であるため、30 °C、pH 8.5 下の H<sub>2</sub>S のヘンリーの定数は、3.76 M atm<sup>-1</sup> になる。

例えば、気相が 2000 ppmv の COS の場合、水相に溶解している COS は、 $0.018 \times (2000 / 10^6) = 3.6 \times 10^{-5}$  M となる。2-2-2-3 の実験で、気相の COS が 2000 ppmv であるときのバイアル瓶全体の COS 量は、次のようになる。バイアル瓶の気相の体積は、4.7 mL、30 °C における気体の体積は、1 mol が 24.9 L であるので、2000 ppmv の気相の COS は、 $(2000 / 10^6) \times (0.0047 / 24.9) = 3.8 \times 10^{-7}$  mol、つまり 380 nmol となる。一方、水相 (酵素溶液) は 200 μL なので、 $3.6 \times 10^{-5} \times (200 / 10^6) = 7.2 \times 10^{-9}$  mol、つまり 7.2 nmol となる。したがって、バイアル瓶全体の COS は、380 + 7.2 = 387.2 nmol となる。

上記の例のように、ヘンリーの定数を基にして換算し、バイアル瓶全体の COS と H<sub>2</sub>S の量から、酵素活性を求めた。

#### 2-2-2-5 メチレンブルー法による H<sub>2</sub>S の定量

COSase の  $K_m$  や  $V_{max}$  を求めるには、極めて高濃度 (数%) の COS を用いる必要がある。そのため、2-2-2-2 に記載した GC-FPD による H<sub>2</sub>S の定量法を用いて、H<sub>2</sub>S の定量を行なおうとすると、COS のピークと生成した、H<sub>2</sub>S のピークが重なってしまい、H<sub>2</sub>S を正しく定量できない。また、重なりを防ぐために、希釈を行なってからガスクロマトグラフに注入すると、H<sub>2</sub>S 量が検出限界値以下になり、定量できない。このため、H<sub>2</sub>S の定量は、GC-FPD を用いて行なうのではなく、Chae and Tabatabai (1983) の方法を参考に、メチレンブルーによる比色法で行なうことにした。

H<sub>2</sub>S の検量線は、2-2-2-6 に記載した COSase 活性測定の方法と同じように行なった。ただし、10.5% COS の代わりに、①H<sub>2</sub>S 標準気体 (2,000 ppmv) のボンベから直接バイアル瓶に置換、または②102 mL 容捕集瓶に移した 2,000 ppmv H<sub>2</sub>S を、ガスタイトマイクロシリンジを用いて 2.4、12、25、又は 60 μL 採取してバイアル瓶に添加し、その後、50 mM Tris-HCl (pH 8.5) 200 μL を加えた。10 分後に、H<sub>2</sub>S が水相と気相で平衡化しているものと見なし、下記に記載した採取量の水相を、ガスタイトマイクロシリンジで採取した。直ちに、H<sub>2</sub>S 比色定量用に調製した溶液 (上記①の場合、50 mM Tris-HCl (pH 8.5) 2000~1975 μL (2000 μL から下記に示すシリンジ採取量を差し引いた量)、6 mM *N,N*-Dimethyl-*p*-phenylenediamine sulfate in 7.2 M HCl 1 mL、60 mM FeCl<sub>3</sub> in 1.2 M HCl 1 mL を含む試験管、上記②の場合、6 mM *N,N*-Dimethyl-*p*-phenylenediamine sulfate in 7.2 M HCl 75 μL、60 mM FeCl<sub>3</sub> in 1.2 M HCl 75 μL を含む 1.5 mL 容マイクロチューブ) に加え、10 秒間ボルテックスし、30 °C、30 分間インキュベート後に、Abs. 665 nm

を測定した。上記①の場合は、ガスタイトマイクロシリンジの採取量を 0、1、5、10、25  $\mu\text{L}$  ( $\text{H}_2\text{S}$  量に換算すると 0~37.72 nmol に相当) に変えることで、上記②の場合は、250  $\mu\text{L}$  容ガスタイトマイクロシリンジを用いて採取量を 150  $\mu\text{L}$  とし、バイアル瓶に注入する  $\text{H}_2\text{S}$  量を、0、2.4、12、25、60  $\mu\text{L}$  ( $\text{H}_2\text{S}$  量に換算すると 0~2.771 nmol に相当) に変えることで検量線を作成した。

#### 2-2-2-6 COSase の活性測定 ( $K_m$ 及び $V_{\max}$ の決定)

4.9 mL 容褐色バイアル瓶 (SVG-3、日電理化硝子) にブチルゴム栓で栓をし、COS を加えた。COS 濃度を 10.5% に調整する際は、注射針 (針径 0.5 mm、長さ 23 mm、皮下針 1/3、星盛堂医療器工業) を 2 本刺し、片方の注射針を介して 10.5% の COS 標準気体 (Balance gas:  $\text{N}_2$ 、日酸 TANAKA) を 3 分間、0.4  $\text{kg cm}^{-2}$  の流速で通気した。それ以外の濃度の COS に調整する際は、バイアル瓶を COS ではなく、 $\text{N}_2$  ガス (99.999%、市村酸素) で通気し、10.5% COS を入れた 102 mL 容捕集瓶 (ジューエルサイエンス) からガスタイトマイクロシリンジで採取し、バイアル瓶に加えた。酵素液を加える前に、COS の初期濃度をガスクロマトグラフで測定した。組換え型 COSase 0.066  $\mu\text{g}$  を含む、50 mM Tris-HCl (pH 8.5) 200  $\mu\text{L}$  を加え、30  $^\circ\text{C}$  で静置し、20 分間反応後、溶解している  $\text{H}_2\text{S}$  量を測定するため、水相の一部をガスタイトマイクロシリンジで採取し、2-2-2-5 に記載したメチレンブルー法による定量を行なった。

#### 2-2-2-7 COSase の CA 活性の測定

CA 活性測定法には、①反応溶液の pH の変化に基づき活性を求める方法 (Wilbur and Anderson, 1948)、②stopped-flow spectrophotometry を用いて、反応液の pH 変化によって生じる indicator の色の变化から活性を求める方法 (Khalifah, 1971)、③安定同位体  $^{18}\text{O}$  でラベルした  $\text{C}^{18}\text{O}_2$  を用いて、反応によって生じる  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  を検出する方法 (Silverman, 1982) などがある。初めに、比較的簡単に測定できる①の方法により、活性測定を行なった。その結果、活性が見られなかったため、検出感度が高く、CA 活性の初速度を測定できる②の方法を行なった。

##### ①反応溶液の pH の変化に基づき活性を求める方法

初めに、比較的簡単に測定できる上記①の方法により、活性を求めることにした。活性は、Sigma quality control test procedure (シグマ アルドリッチ) に記載の方法によって測定した。初めに、20 mM Tris sulfate, pH 8.3 (25  $^\circ\text{C}$ ) からなる 3 mL と、50 mM Tris-HCl, pH 8.5 (30  $^\circ\text{C}$ ) からなる酵素溶液 50  $\mu\text{L}$  を、氷水中に置いたバイアル瓶 (高さ 4.5 cm、内径 1.5 cm) に加え、攪拌子 (長さ 1 cm) で攪拌しながら、pH 電極 (pH メーター F-52、pH 電極 9618S-10D、堀場製作所) をできる限り底の方に配置して pH を測定し続けた。 $\text{CO}_2$  飽和水は、ブチルゴム栓をした 13 mL 容バイアル瓶 (SVG-12、日電理化硝子) に純水を満たし、氷水中に置き、 $\text{CO}_2$  ガスを 0.5  $\text{L min}^{-1}$  の流速でカテラン針 (ゲージ 20G (0.90 mm)、長さ 70 mm、テルモ) を通して、15 分以上通気して調製した。得られた  $\text{CO}_2$  飽和水 2 mL を、バイアル瓶に加えて反応を開始さ

せた。pH8.3 から pH6.3 への変化に要した時間を測定し、活性は、unit として表記した。unit は、 $(T_{\text{Blank, avg}} - T_{\text{Enzyme, avg}}) (T_{\text{Enzyme, avg}})^{-1}$  で計算され、 $T_{\text{Blank, avg}}$  と  $T_{\text{Enzyme, avg}}$  は、それぞれ酵素無しの系及び酵素有りの系で測定した時の、pH8.3 から pH6.3 への変化に要した時間 (秒) である。

②stopped-flow spectrophotometry を用いて、反応液の pH 変化によって生じる indicator の色の変化から活性を求める方法

酵素溶液は、50 mM HEPES-NaOH、200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、pH 7.5 (25 °C) で透析した。用いる酵素溶液と、その 1 / 10 倍量の 2 mM phenol red を含む 50 mM HEPES-NaOH、200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、pH 7.5 (25 °C) を混合した。一方、CO<sub>2</sub> 飽和水は、上記の①と同様の方法により調製した。Stopped-flow spectrophotometry (SX-20、Applied Photophysics) により、タンパク質量で 4 μg の COSase を含む酵素液 10 μL と、CO<sub>2</sub> 飽和水 10 μL を混合して、25 °C 下で反応させ、Abs. 578 nm を測定した。Abs. 578 nm の変化と水素イオン量との関係は、酵素液と CO<sub>2</sub> 飽和水の代わりに、HCl を終濃度で 0、1、2、5、及び 10 mM になるように調製した反応液の Abs. 578 nm から、検量線を作成し、求めた。

#### 2-2-2-8 COSase の CS<sub>2</sub> hydrolase 活性の測定

ブチルゴム栓をした 4.9 mL 容褐色バイアル瓶に、CS<sub>2</sub> を加えた。CS<sub>2</sub> 濃度を 1.02% に調整する際は、注射針 (針径 0.5 mm、長さ 23 mm、皮下針 1/3、星盛堂医療器工業) をブチルゴム栓に 2 本刺し、片方の注射針を介して CS<sub>2</sub> 標準気体 (1.02%、Balance gas: N<sub>2</sub>、日酸 TANAKA) を 3 分間、レギュレーターを 0.05 MPa にして通気した。組換え型 COSase 0.066 μg を含む、50 mM Tris-HCl (pH 8.5) 200 μL を加え、30 °C、20 分反応させた後、GC-FPD へ気相を注入し、発生する COS と H<sub>2</sub>S を定量した。Staudinger and Roberts (2001) による計算では、30 °C 下の CS<sub>2</sub> のヘンリーの定数は、0.0470 M atm<sup>-1</sup> であり、ここから計算すると、初期 CS<sub>2</sub> 濃度は 460 μM に相当する。

#### 2-2-2-9 SCN<sup>-</sup> 添加時の COSase の活性測定

SCN<sup>-</sup> が、COSase の阻害剤であるかを明らかにするため、NaSCN を添加した酵素溶液 (COSase 0.066 μg を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) 200 μL) を調製した。4.9 mL 容褐色バイアル瓶 (SVG-3、日電理化硝子) にブチルゴム栓で栓をし、注射針 (針径 0.5 mm、長さ 23 mm、皮下針 1/3、星盛堂医療器工業) を 2 本刺した。片方の注射針を介して N<sub>2</sub> ガス (99.999%、市村酸素) を通気して気相を置換後、102 mL 容捕集瓶 (ジーエルサイエンス) に充填した、10.5% の COS 標準気体 (Balance gas: N<sub>2</sub>、日酸 TANAKA) をガスタイトマイクロシリンジで採取し、バイアル瓶に加えた。これにより、バイアル瓶内の気相の COS 濃度を 1050 ppmv にした。2-2-2-3 に記載の方法と同じように、H<sub>2</sub>S 及び上記の酵素溶液を添加して活性測定を行なった。



### 2-2-2-10 大気濃度の COS の定量

1,2,3-Tris (2-cyanoethoxy) propane を、5%の濃度でコーティングした Uniport B 60/80 (ジーエルサイエンス) を充填した濃縮管 (U字管 S、島津製作所) を液体酸素下で 5 分冷却し、そこに気体を注入することで、その中に含まれる COS などの気体を濃縮管にトラップした。加熱導入装置 (FLS-1、島津製作所) を用いて、濃縮管を 100 °C まで加熱し、トラップされた COS を GC-FPD に導入した。ガスクロマトグラフの条件は、Table 2-3 に示した。検量線作成のため、1,960 ppmv または 2,080 ppmv の COS 標準気体 (Balance gas: N<sub>2</sub>、日酸 TANAKA) を、ガスタイトマイクロシリンジで採取し、N<sub>2</sub> 置換した 102 mL 容捕集瓶に加えて希釈後、濃縮管に注入した。得られたピーク高の平方根と、注入した COS 量から検量線を作成した。

### 2-2-2-11 *T. thioparus* THI115 株の大気濃度 COS の分解

2-1-2-1 で記載した方法と同様に、*T. thioparus* THI115 株を培養した。培地に添加したチオシアネートが分解されたことを確認後、13,000 × g、4 °C で 20 分間遠心することで集菌した。mTC (*T. thioparus* THI115 株の培養に用いた mTC10 培地から KSCN を除いた組成) を用いて、3 回洗浄した。mTC に再懸濁後、元の培養液に換算して 10 mL に相当する菌液を、ガラス繊維フィルター (GF-75、保持粒子径 0.3 μm、アドバンテック) 上にトラップさせた。菌体の乾燥を防ぐために、濾紙 (GF/C、circle 90 mm φ Glass microfiber filter、ワットマン) を 3 枚重ねたものを mTC 4 mL で湿らせ、内径 9.3 cm のガラスシャーレ (蓋は除く) に置いた。その上に、菌体をトラップさせたガラス繊維フィルターを重ねた。シャーレは蓋をせず、1 端を裁断した 5 L 容アルミニウムバッグ (AAK-5、ジーエルサイエンス) に入れ、裁断した部分をクリップ (A-75、280 mm、三菱ガス化学) で密封し、バッグ内に空気を充填した。以上の操作は、全てクリーンベンチ内で行なった。ブチル W 栓 (W-12、太陽興業) で栓したスリーブを通して、バッグ内の気相 300 mL を 50 mL 容シリンジ (テルモ) を用いて、経時的に採取し、2-2-2-10 の方法で濃縮後に COS の定量を行なった。

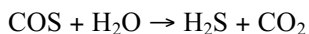
### 2-2-2-12 COSase の大気濃度の COS 分解

2-2-2-11 の方法と同じように、5 L 容アルミニウムバッグに、何も加えていない内径 8.5 cm のガラスシャーレ (蓋は除く) を置き、密閉クリップで密封した。50 mL 容シリンジ (テルモ) を用いて、バッグ内の空気を出来る限り吸引後、N<sub>2</sub> ガス (99.999%、市村酸素) を流量計を参考にしながら、およそ 3.7 L 注入した。2,080 ppmv の COS 標準気体 (Balance gas: N<sub>2</sub>、日酸 TANAKA) を、ガスタイトマイクロシリンジで採取し、N<sub>2</sub> 置換した 102 mL 容捕集瓶に加えて希釈した。その捕集瓶からガスタイトマイクロシリンジを用いて、ブチル W 栓 (W-12、太陽興業) で栓したスリーブを通して、アルミニウムバッグ内に注入することで、およそ 500 pptv の COS を含む気相となるように調整した。COSase 10 μg を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) 10 mL を、10 mL 容シリンジ (テルモ) を用いて計りとり、スリーブを通してシャ

ーレ内に注入した。酵素溶液の添加直後は、気相の濃度が安定しないため、添加 10 分後から経時的にバッグ内の気相 300 mL を採取し、2-2-2-10 の方法で濃縮後に COS の定量を行なった。

### 2-2-3 結果

Fig. 2-6 に示すように、COSase は COS 20 nmol を 20 分間で分解し、それに伴い、ほぼ等量に相当する 23 nmol の H<sub>2</sub>S を生成した。このことから、COSase による酵素反応は、以下の反応式で表された。



この結果、COSase は、加水分解酵素であることが明らかになり、COS 加水分解酵素 (COS hydrolase) と呼ぶこととした。また、*T. thioparus* THI115 株から精製された COSase (野生型 COSase) と、大腸菌で発現させた COSase (組換え型 COSase) の活性は、それぞれ 17  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ 、18  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  で、ほぼ等しい値を示した。そのため、野生型 COSase と組換え型 COSase は、同じものと考え、以降は、組換え型 COSase を用いて実験を行なうことにした。

COSase の kinetics は、Michaelis-Menten 型の活性を示し、 $K_m$  は 60  $\mu\text{M}$ 、 $V_{\max}$  は 74  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ 、本酵素の活性発現の基本となるダイマー当たりで計算した  $k_{\text{cat}}$  は 58  $\text{s}^{-1}$ 、同じく  $k_{\text{cat}} / K_m$  は  $9.6 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  であった (Fig. 2-7)。

反応溶液の pH の変化に基づく方法で CA 活性を求めたところ、COSase 有りの反応系は、酵素無しの系と同じクロマトグラムを示し、この方法では活性が認められなかった (Fig. 2-8)。そこで、stopped-flow spectrophotometry による CA 活性の測定を行なった。その際、CO<sub>2</sub> 飽和水を混合したためと思われる pH の変化が、反応開始 0 秒から、およそ 0.1 秒の間で生じたことから、その影響を避けるために、反応開始後、0.2 秒から 0.5 秒の間の Abs. 578 nm の変化に基づき、活性を求めた (Fig. 2-9)。17 mM の CO<sub>2</sub> 濃度下で測定された COSase の CO<sub>2</sub> 水和活性 (CA 活性) は、24  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ 、ダイマー当たりで計算した turnover number は、19  $\text{s}^{-1}$  であった。

COSase の CS<sub>2</sub> hydrolase 活性を調べるために、460  $\mu\text{M}$  CS<sub>2</sub> 存在下で解析を行なったところ、3.9  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  の反応速度で CS<sub>2</sub> は H<sub>2</sub>S に分解された。一方、CS<sub>2</sub> hydrolase は、 $\text{CS}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{COS} + \text{H}_2\text{S}$  と  $\text{COS} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{S} + \text{CO}_2$  の反応を触媒するため、COS は、CS<sub>2</sub> 分解の中間体であるが、COSase による CS<sub>2</sub> 分解中の COS の生成速度は、0.1  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  以下であることが確認された。

COS 分解活性は、1 mM の NaSCN では阻害が見られず、10 mM、100 mM の NaSCN により、活性はそれぞれ 70%、20%に減少した。

*T. thioparus* THI115 株による大気濃度の COS 分解実験は、クリーンベンチ内の空気を、ろ過などの操作を加えずに、そのまま用いて行なった。初期 COS 濃度は、600 pptv であったが、6 時間後には、それが 350 pptv になり、さらに 25 時間後には、検出限界値 (280 pptv) 以下にまで減少した (Fig. 2-10)。菌体を加えずに、mTC 培地のみで実験を行なったコントロールでは、COS 濃度の上昇が見られたが、さらにこの mTC 培地も加えなかった系では、COS の変化は全く見られなかった。したがって、mTC 培地から、COS がわずかに発生しているものと判断した。

COSase を用いて、同様に大気濃度の COS に対する活性を測定した。その結果、高濃度の COS 分解実験の際に用いる COSase 量と比べて、大量の COSase を用いる必要はあったものの、COSase は 26 pmol

$\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  の反応速度で COS を分解した (Fig. 2-11)。

#### 2-2-4 考察

COSase の分解に関わる酵素は Table 1-1 に示すように、いくつか知られているが、COSase は、CA や CS<sub>2</sub> hydrolase と同じ反応式で表される COS 分解を示した。CS<sub>2</sub> hydrolase はホモヘキサデカマー、COSase 及び β-CA はホモテトラマーであり、オリゴマー構造は異なるが、活性部位当たりの  $k_{\text{cat}}/K_m$  を比較すると、COSase、CS<sub>2</sub> hydrolase、β-CA は、それぞれ  $4.8 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 、 $6.0 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 、 $6.9 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  となる。CS<sub>2</sub> hydrolase の  $k_{\text{cat}}/K_m$  はこれらの酵素間で最も高い。これは、COSase の活性測定は、反応容器を静置した状態で行なっているのに対して、CS<sub>2</sub> hydrolase の場合は、スターラーで攪拌しており、酵素への基質の供給が促進されている可能性が考えられる。このような、測定方法の違いが、これらの酵素の  $k_{\text{cat}}/K_m$  の値に影響を及ぼしたものと考えられる。いずれにしても、既知の COS 分解活性の認められている酵素 (Table 1-1) と比べても、COSase の COS 分解活性は、明らかに高い部類に入るといえる。

*T. thioparus* THI115 株において、SCN<sup>-</sup>を唯一のエネルギー源として生育させたときの、代謝経路の最初のステップは、SCNase によって触媒される。SCNase の  $K_m$  及び  $V_{\text{max}}$  は、~11 mM、及び~0.056  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  であり (Katayama *et al.*, 1992)、COSase の  $K_m$  60  $\mu\text{M}$ 、 $V_{\text{max}}$  74  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  よりもかなり低い活性を示す。そのため、2-1-4 に記載したように、COSase の含有量が、*T. thioparus* THI115 株の可溶性タンパク質の 0.07%であったとしても、SCNase による分解によって生じた COS の大部分は、COSase によって分解されるものと予想される。

下記の 2-3 で明らかにした、SCN<sup>-</sup>複合体の COSase の結晶構造において、SCN<sup>-</sup>は、構造的に COS のアナログ化合物であり、活性部位に存在した。また、CA は、SCN<sup>-</sup>を含む陰イオン化合物によって阻害されることが知られ (De Simone and Supuran, 2012)、例えば、細菌の β-CA (*Streptococcus pneumoniae* 及び *Salmonella typhimurium*) の CO<sub>2</sub> 水和活性における SCN<sup>-</sup>の阻害定数は、0.38~0.93 mM である (Burghout *et al.*, 2011; Vullo *et al.*, 2011)。そのため、COSase の COS 分解活性に与える SCN<sup>-</sup>の影響は小さく、SCN<sup>-</sup>は、弱い阻害剤であることが明らかになった。

COSase は、アミノ酸配列の比較の結果、CA と高い相同性があるにもかかわらず、CA 活性をほとんど示さなかった。これまでに知られている CA の中で最も高い相同性を示す、*Mycobacterium tuberculosis* の β-CA Rv1284 で確認されている CO<sub>2</sub> 水和活性は、 $k_{\text{cat}}$  が  $3.9 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  である (Minakuchi *et al.*, 2009)。COSase の CA 活性はきわめて低いため、基質濃度を変えることによる活性測定ができず、17 mM の CO<sub>2</sub> における turnover rate は、 $19 \text{ s}^{-1}$  と求められたものの、 $k_{\text{cat}}$  を決めることは出来なかった。*Mycobacterium tuberculosis* の β-CA Rv1284 の  $K_m$  は、11 mM であるので、COSase も同程度と仮定しても、 $k_{\text{cat}}$  は  $30 \text{ s}^{-1}$  程度にしかならない。COSase と同じく、β-CA に相同性がある CS<sub>2</sub> hydrolase は、CA 活性がないと報告されている (Smeulders *et al.*, 2011)。COS 分解活性と CO<sub>2</sub> 水和活性に関して、COSase と CS<sub>2</sub> hydrolase は、ほぼ同じ特徴を有しているといえる。

460  $\mu\text{M}$  の  $\text{CS}_2$  存在下で、COSase の  $\text{CS}_2$  加水分解活性は、 $3.9 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  の反応速度であった。一方、 $\text{CS}_2$  hydrolase では、おおよそ  $30 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  の活性を示すことから (Smeulders *et al.*, 2011)、これに比べて7.7倍低い活性となった。 $\text{CS}_2$  hydrolase における  $\text{CS}_2$  加水分解活性と COS 加水分解活性では、 $k_{\text{cat}}/K_m$  が、それぞれ  $7.3 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 、 $8.2 \times 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  であり、後者の活性の方が高い。COSase の  $\text{CS}_2$  加水分解活性については、本研究では詳しく調べてはいないが、COS の生成は、測定中にほとんど見られなかった。これは、 $\text{CS}_2$  hydrolase と同じように、COS 加水分解活性の方が高く、反応中間体として生成された COS は、直ちに  $\text{H}_2\text{S}$  に分解されたことによるものと思われる。

以上より、COSase、 $\beta$ -CA、 $\text{CS}_2$  hydrolase は、互いに異なる基質特異性を示すことが明らかになった (Table 2-4)。これらの基質特異性のメカニズムの解明には、互いの結晶構造を比較することが重要である。そこで、COSase の結晶構造を明らかにすることにした (2章第3節)。

*T. thioparus*、*T. neapolitanus*、*T. denitrificans* のような好中性 (neutrophilic) の *Thiobacillus* 属細菌は、土壤によっては  $1\text{g}$  の生土当たり、おおよそ  $10^5$  のオーダーで生息するため (Chapman, 1990)、*T. thioparus* は、土壤中に豊富に存在することが推測される。*T. thioparus* THI115 株は、大気濃度の COS を分解することが可能であったことから、*T. thioparus* は、土壤における COS の消失源のひとつとして機能していることが考えられる。また、本菌から得られた COSase の  $K_m$   $60 \mu\text{M}$  は、気相が  $3,300 \text{ ppmv}$  時の水相の濃度に相当し、大気濃度下の水相の COS 濃度と比べて極めて高い。しかしながら、COSase においても、大気濃度の COS を分解したことから、COSase が、*T. thioparus* THI115 株の大気濃度 COS の分解反応を触媒しているものと思われる。

Table 2-2. Conditions of GC-FPD.

|                  |                |                                   |
|------------------|----------------|-----------------------------------|
| Column           |                | long, 2 m; inner diameter, 3.0 mm |
| Packing material |                | Sunpak-S (Shimadzu)               |
| Carrier          |                | N <sub>2</sub>                    |
| Temperature of   | Injector       | 190 °C                            |
|                  | Column         | 190 °C                            |
|                  | Detector       | 190 °C                            |
| Flow Rate of     | N <sub>2</sub> | 100 mL min <sup>-1</sup>          |
|                  | H <sub>2</sub> | 28 mL min <sup>-1</sup>           |
|                  | Air            | 22 mL min <sup>-1</sup>           |

Table 2-3. Conditions of GC-FPD for ambient COS degradation analysis.

|                  |                |                                   |
|------------------|----------------|-----------------------------------|
| Column           |                | long, 2 m; inner diameter, 3.0 mm |
| Packing material |                | Porapak QS (50-80 mesh, Waters)   |
| Carrier          |                | N <sub>2</sub>                    |
| Temperature of   | Injector       | 150 °C                            |
|                  | Column         | 110 °C                            |
|                  | Detector       | 150 °C                            |
| Flow Rate of     | N <sub>2</sub> | 43 mL min <sup>-1</sup>           |
|                  | H <sub>2</sub> | 40 mL min <sup>-1</sup>           |
|                  | Air            | 31 mL min <sup>-1</sup>           |

Table 2-4. Comparison of substrate specificity among COSase,  $\beta$ -CA, and CS<sub>2</sub> hydrolase.<sup>a</sup>

| Enzyme                       | Organism                                | COS<br>hydrolysis<br>$k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> ) | CO <sub>2</sub><br>hydration<br>$k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> ) | CS <sub>2</sub><br>hydrolysis<br>(mmol mg <sup>-1</sup><br>min <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup> | Reference  |
|------------------------------|---|--|---|---|--|
| COSase                       | <i>Thiobacillus thioparus</i><br>THI115 | 29   | < 10 <sup>2</sup>   | 3.9   | This study   |
| $\beta$ -CA                  | <i>Pisum sativum</i>                    | 23   | 4 × 10 <sup>5</sup>   | ND  | Protoschill-Krebs <i>et al.</i> ,<br>1996; Ogée <i>et al.</i> , 2016 |
| CS <sub>2</sub><br>hydrolase | <i>Acidianus</i> sp. A1-3               | 113  | 0   | ~30   | Smeulders <i>et al.</i> , 2011                                       |

<sup>a</sup>Calculated per active center.

<sup>b</sup>The activity at a CS<sub>2</sub> concentration of 460  $\mu$ M.

ND, not determined.



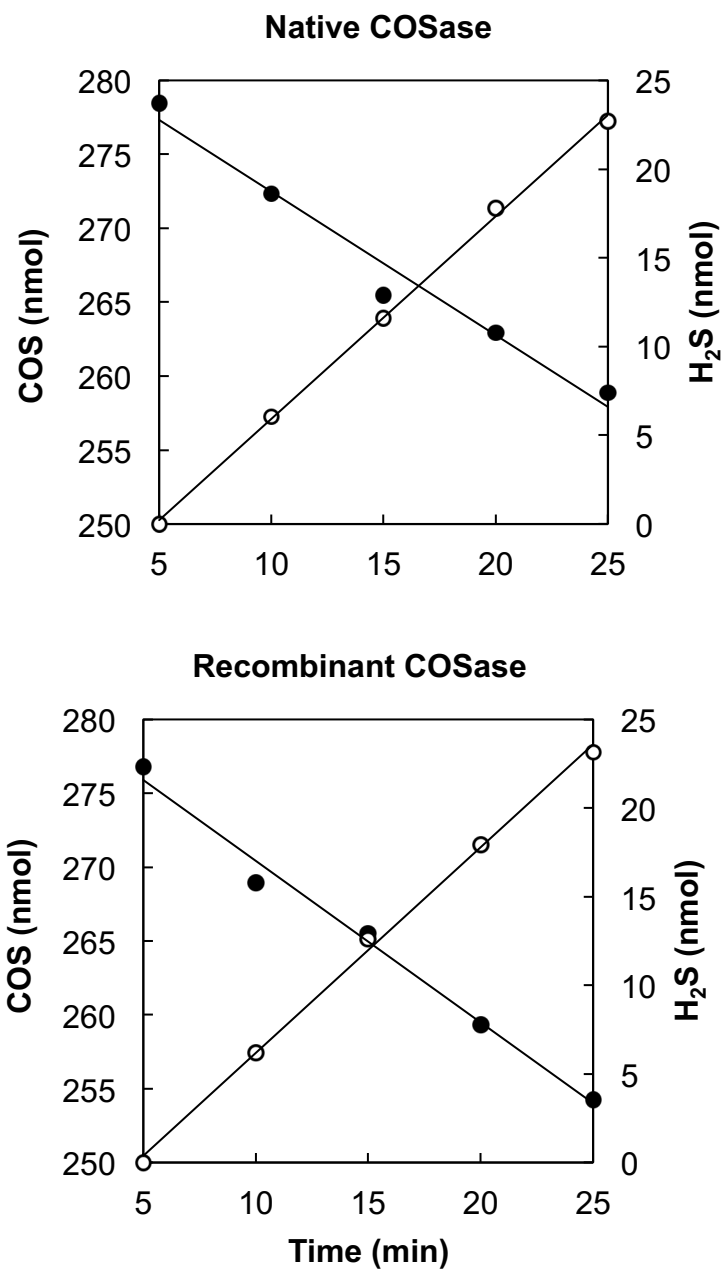


Fig. 2-6. Time course of COS (●) degradation and H<sub>2</sub>S (○) production by COSase. COSase (0.066 μg) was injected into a vial (4.9 mL) filled with 320 nmol COS and 20 nmol H<sub>2</sub>S. Because addition of the enzyme solution into the vial caused disturbance of COS and H<sub>2</sub>S concentrations, the sampling of the headspace gas was started 5 min after the addition of the enzyme.

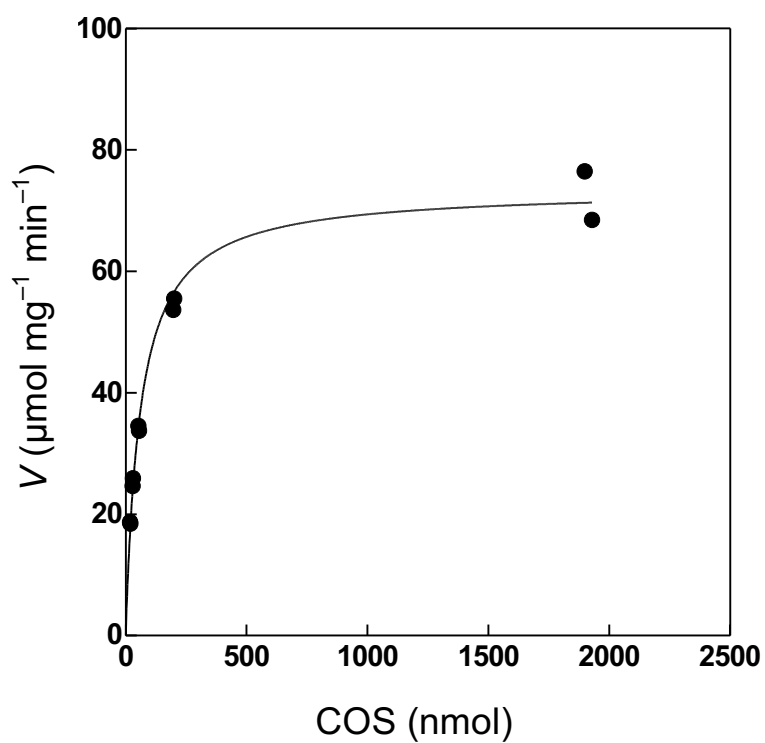


Fig. 2-7. Michaelis-Menten kinetics of COSase.  $K_m$  and  $V_{max}$  that were calculated based to nonlinear regression using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, California, U.S.A.) were 60  $\mu\text{M}$  and 74  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ , respectively.

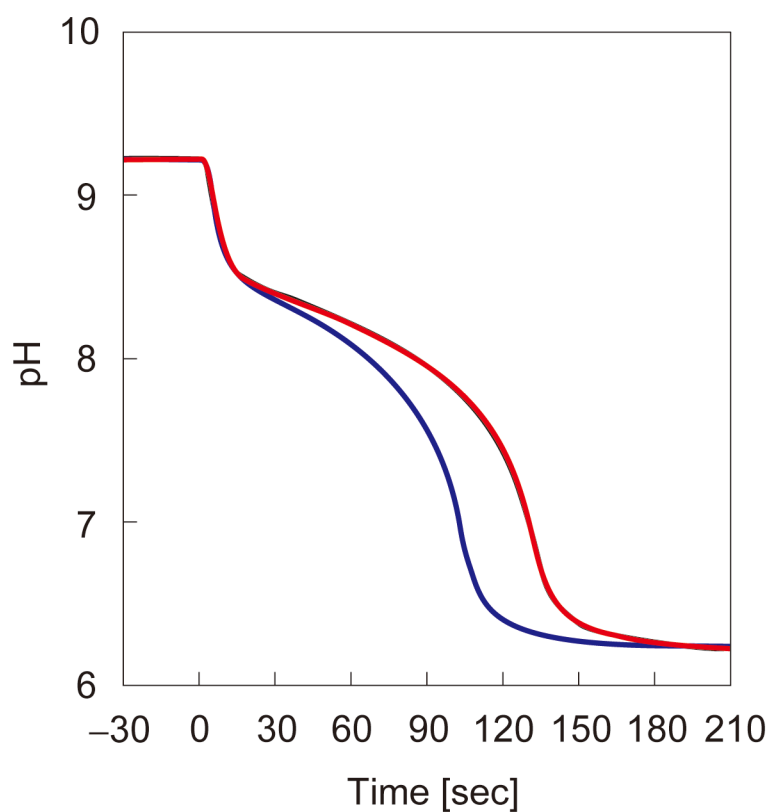


Fig. 2-8. Chromatogram of the CA activity of COSase and bovine CA. The reaction was initiated by adding CO<sub>2</sub>-saturated water at 0 sec. The chromatogram of COSase (9.0 mg; red) was superimposed with a non-enzymatic reaction (black) and showed a slow decrease in pH. On the other hand, bovine CA ( $9.0 \times 10^{-2}$  mg; blue) decreased the pH of the reaction mixture faster than COSase with an activity of  $3.6 \times 10^3$  units mg<sup>-1</sup>. The experiment was performed in triplicate.

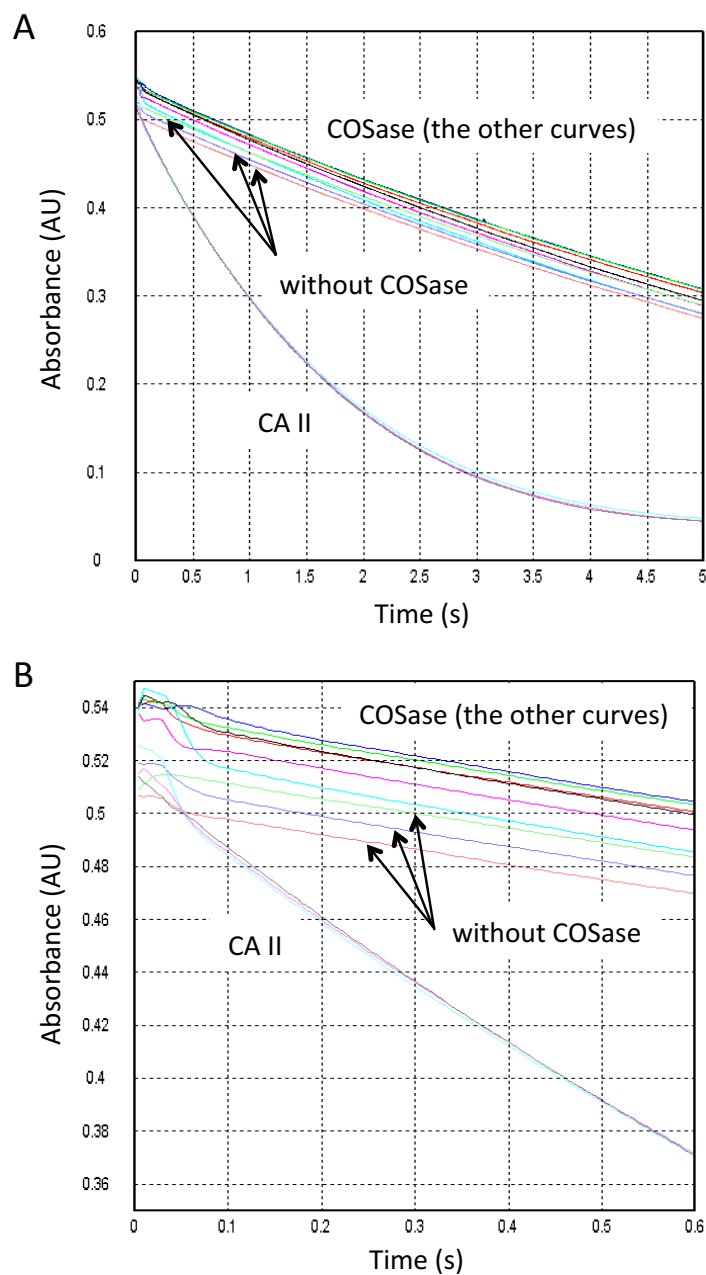


Fig. 2-9. Absorbance change at 578 nm after mixing CO<sub>2</sub> saturated water. (B) shows the enlarged figure of (A) for clarity. COSase (3960 ng) solution contained 50 mM HEPES-NaOH, 0.2 mM phenol red and 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.5 at 25 °C. The COSase solution and CO<sub>2</sub>-saturated water were mixed 1:1 at 25 °C, and the absorbance at 578 nm was measured (n = 6). A control without COSase was measured in order to monitor the non-enzymatic absorbance change (n = 3). To avoid the disturbance of the absorbance by the mixing itself, the activity was estimated based on the absorbance change from 0.2 s to 0.5 s. To check whether the measurement by stopped-flow spectrophotometry was correctly performed, the activity of carbonic anhydrase II (From human, C6165, Sigma-Aldrich) (10 ng) was determined (n = 3) and the  $k_{cat}$  was  $2.3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  under the experimental conditions.

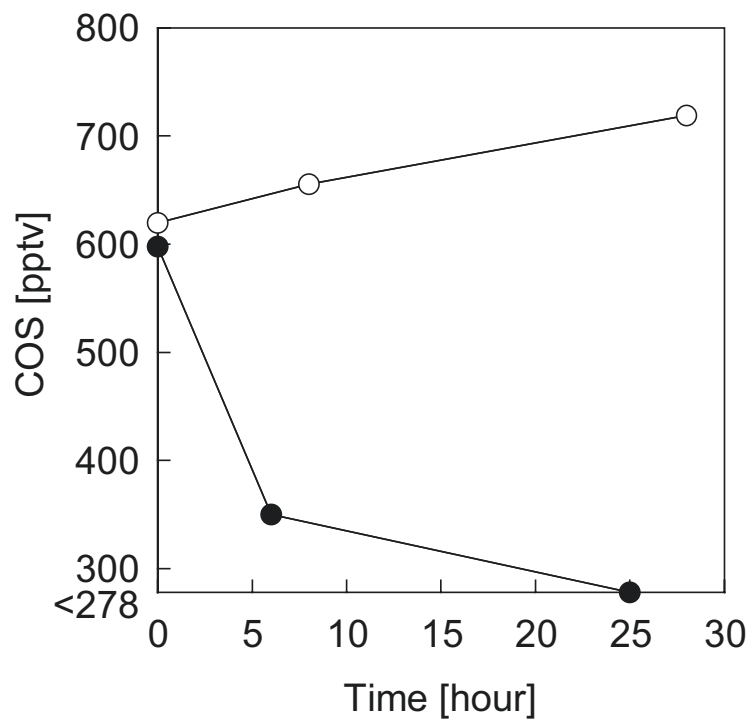


Fig. 2-10. Degradation of ambient level COS by whole cells. Symbols: ●, with cells; ○, without cell. Cells in a 10 mL of culture containing fully grown *T. thioparus* THI115 were put in a Petri dish and then placed in a gas-sampling bag (approximately 3 L).

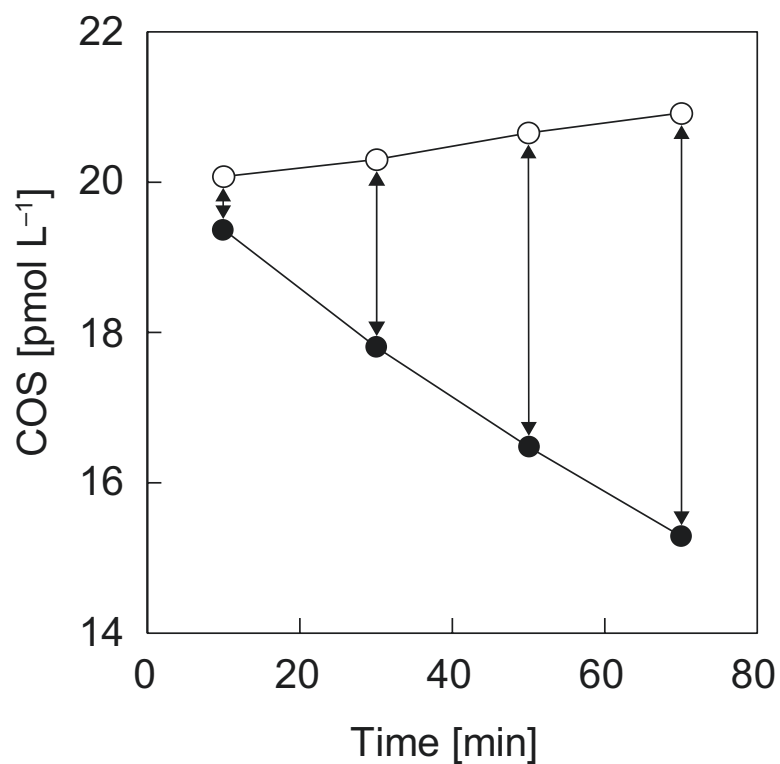


Fig. 2-11. Degradation of ambient level of COS by recombinant COSase. Symbols: ●, with COSase; ○, without COSase. The reaction was started by adding the reaction mixture containing 10  $\mu\text{g}$  of COSase to a gas-sampling bag as described in the text. The volume of the introduced nitrogen gas that contained 510 pptv (20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) of COS was 3.7 L. The amounts of COS hydrolyzed by COSase was calculated based on the difference between the concentration with and without COSase (indicated by the arrows).

## 2-3 COSase の結晶構造

### 2-3-1 はじめに

様々な生物から得られた CA のアミノ酸配列の比較研究によって、 $\alpha$ -CA と  $\beta$ -CA は、それぞれ全く異なる配列を有し、収斂進化により、互いに同じ反応を触媒する酵素になったと考えられている (Hewett-Emmett and Tashian, 1996; Smith *et al.*, 1999)。 $\beta$ -CA に関しては、2000 年にエンドウマメの  $\beta$ -CA の結晶構造が明らかにされているが、特に活性中心については、構造においても  $\alpha$ -CA との類似が見られることが明らかとなっている (Kimber and Pai, 2000)。さらに、 $\alpha$ -CA と同様に、サブユニット当たり 1 原子の亜鉛を配位する金属酵素であることが示された。これまでに報告されている  $\beta$ -CA は、ダイマー、テトラマー、及びオクタマー (Strop *et al.*, 2001; Covarrubias *et al.*, 2006; Mitsuhashi *et al.*, 2000; Cronk *et al.*, 2006; Kimber and Pai, 2000) のものがあるが、基本的な構造単位はダイマーまたは、ダイマー様の構造である。活性中心にある亜鉛原子には、2 つのシステインと 1 つのメチオニンが配位し、第 4 配位子の位置には水分子が存在する。

$\beta$ -CA と相同性が高いにもかかわらず、CA 活性が検出されていない  $\text{CS}_2$  hydrolase においても、結晶構造が明らかにされている (Smeulders *et al.*, 2011)。それによると、CA 活性がない理由としては、酵素表面から活性中心に向かう経路 (トンネル) が狭く、また疎水性がより高くなっているため、より親水性である  $\text{CO}_2$  の水和活性が見られないという可能性を提案している。COSase はテトラマーで、アミノ酸配列では、 $\beta$ -CA に高い相同性を示したのであるが、CA 活性はほとんど検出されず、しかも  $\text{CS}_2$  hydrolase と同じような COS 分解活性を有する。そのため、酵素活性における  $\beta$ -CA との明瞭な差異を酵素タンパク質の高次構造の面からも明らかにするため、COSase の結晶構造解析を行なった。

## 2-3-2 材料と方法

### 2-3-2-1 COSase の結晶化

結晶化には、組換え型 COSase を使用した。6 mg mL<sup>-1</sup>にまで濃縮した COSase 1.2 μL を用い、20 °C でハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行なった。1.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2 M NaCl, 30% glycerol, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5 の組成のリザーバー溶液を 1.2 μL 用いた。COSase とリザーバー溶液をカバーガラス上で混合し、シリコングリースにより密封した。COSase の基質に構造上類似した化合物として、SCN<sup>-</sup> の複合体の結晶も作製し、比較を行なった。SCN<sup>-</sup> の複合体の結晶化は、結晶を含むドロップに終濃度が 0.01 M NaSCN になるように添加して行なった。

### 2-3-2-2 X 線回析

X 線解析は、つくば市の高エネルギー加速器研究機構物質構造化学研究所の放射光科学研究施設にある、BL-5A 及び BL-6A ビームラインで行なった。95 K の低温窒素ガスを用いて結晶を凍結して、ADSC/CCD detector system (ADSC Quantum 315r と Quantum 4R) を使い、回析データを収集した。回析強度の計算や補正及び回析データのマーキングは、プログラム HKL2000 を用いて行なった (Otwinowski and Minor, 1997)。

### 2-3-2-3 構造決定及び構造精密化

COSase の初期位相の決定は、すでに結晶構造が明らかになっており、しかももっとも高い相同性を示す *Mycobacterium tuberculosis* の β-CA Rv1284 の構造の一部 [Protein Data Bank (PDB) code 1YLK, 23-99 残基] を使い、プログラム Molrep (Vagin and Teplyakov, 1997) で分子置換法により行なった。SCN<sup>-</sup> 複合体に関しては、ここで得られた COSase の構造を基に解析を行なった。さらに、REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997) を用いて、全体的な構造の精密化を行なった後、COOT (Emsley and Cowtan, 2004) により構造モデルの構築、SHELXL (Sheldrick, 2008) により精密化を行なった。このようにして構築できた構造モデルの妥当性を示す数値として、実験で得られた回析の反射強度と構造モデルから計算される反射強度から、Table 2-5 の注釈 c に記載した計算により *R*-factor (*R*) を求めた。その結果、*R* 値は COSase で 0.135、SCN<sup>-</sup> 複合体で 0.156 となり、通常のタンパク質結晶構造で得られる 10~20%程度であった。さらに、両反射強度間の overfitting を避けるために、5%の回析データを上記の精密化に用いず、実験で得られた回析の反射強度と、この 5%の回析データの反射強度から *R*-factor (*R*<sub>free</sub>) を求めたところ (Brünger, 1992)、COSase で 0.170、SCN<sup>-</sup> 複合体で 0.204 となり、通常考えられている *R*<sub>free</sub> 値 (*R* 値の+5%程度) となった。したがって、得られた COSase の構造モデルは、よく精密化された妥当な構造と考えられた。日本蛋白質構造データバンクに、COSase は 3VQJ、SCN<sup>-</sup> 複合体は 3VRK として登録した。



### 2-3-3 結果

Table 2-5 に X 線回析データと構造精密化の結果を示す。COSase は 1.20 Å、COSase の SCN<sup>-</sup>複合体は 1.33 Å の分解能で、それらの結晶構造を決定した。基質が結合した状態の結晶構造を解析するために、COS とサイズと構造において類似している SCN<sup>-</sup>を使用した。互いの構造間の根平均二乗分散 (RMSD) は、213 残基の $\alpha$ 位の C に関して 0.16 Å、全ての原子に関して 0.38 Å であり、ほぼ同じ結晶構造を示した。そこで以下は、SCN<sup>-</sup>複合体を用いて得られた結晶構造解析の結果を述べることにする。

COSase のサブユニット構造は、5 本の  $\beta$  ストランドからなる  $\beta$  シート ( $\beta$ 1- $\beta$ 5) と、6 本の  $\alpha$  ヘリックスにより構成される  $\alpha/\beta$  構造を形成した (Fig. 2-11、2-12)。活性部位は、他の  $\beta$ -CA の場合と同様に、ダイマー構造を形成することで成り立っており、 $\alpha$ 2、 $\beta$ 2、 $\beta$ 3 の部分で主に相互作用し、相互作用に関わる表面積は、サブユニット当たり $\sim 3,420 \text{ \AA}^2$ であった (Fig. 2-13)。一方、ダイマー構造と比べて、テトラマー構造の形成のためのダイマー同士の相互作用は弱く、サブユニット当たり  $960 \text{ \AA}^2$ であった (Fig. 2-14)。

活性部位は、ダイマー構造を形成するモノマー間の境界に位置し、溶媒からは隔離されていた。中心金属である亜鉛には、システイン 44 とシステイン 100 の硫黄原子と、ヒスチジン 97 の窒素原子が配位し、亜鉛の第 4 配座には水分子が配位していた (Fig. 2-15)。それぞれの配位距離は、2.28 Å (Zn-S $\gamma$  (Cys44))、2.04 Å (Zn-N $\epsilon$  (His97))、2.31 Å (Zn-S $\gamma$  (Cys100)) で、水分子とは 2.08 Å であった。水分子は、アスパラギン酸 46 のカルボキシレート基と 2.59 Å の距離で水素結合し、安定化していた。SCN<sup>-</sup>分子は、2 つの水分子 [亜鉛に配位する水分子とヒスチジン 63' (ダイマー構造における、もう片方のサブユニットのヒスチジン 63) と水素結合した水分子] と、それぞれ 3.00 Å、3.01 Å の距離で水素結合していた。さらに、SCN<sup>-</sup>分子は、近傍の 9 つのアミノ酸とも相互作用しており、小さく、疎水性の高い触媒部位ポケットの形状に合致した (Table 2-6)。

$\beta$ -CA は、活性部位近傍で保存されているアミノ酸の種類によって、plant タイプと Cab タイプに分けられる (Kimber and Pai, 2000)。前者のタイプでは、グルタミン、フェニルアラニン、チロシンが保存されており、後者は他のアミノ酸となる。COSase の場合、活性部位近傍に存在するアミノ酸は、イソロイシン 33、ヒスチジン 63、イロソイシン 82 であることから、Cab タイプに分類される。類似した構造を検索するプログラム DALI を行なったところ、*Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -CA Rv1284 (PDB code 1YLK) と *Methanobacterium thermoautotrophicum*  $\beta$ -CA (PDB code 1G5C) がヒットした。これらの  $\beta$ -CA と COSase の 146 残基の $\alpha$ 位の C を比較したところ、RMSD が、それぞれ 1.2 Å、1.4 Å となり、類似した結晶構造であることが分かった (Holm *et al.*, 2008; Covarrubias *et al.*, 2005; Strop *et al.*, 2001)。これらの  $\beta$ -CA も Cab タイプに分類されることから、COSase は、plant タイプよりも Cab タイプと近い関係にあると考えられた。しかし、COSase の $\alpha$ 5 と、それに続くループ (グリシン 129 からアラニン 135) は、COSase に特異的に見られる構造であり、Cab タイプの  $\beta$ -CA では、これまでに見つかっていない。さらに、 $\alpha$ 6 の N 末端側のループ (グリシン 150 からプロリン 158) も、COSase でのみ見られた (Fig. 1-2)。

これまでに、SCN<sup>-</sup>複合体として、*Mycobacterium tuberculosis* β-CA Rv1284 と Rv3588c の構造が明らかになっている (Covarrubias *et al.*, 2005; Covarrubias *et al.*, 2006)。両者は、活性中心における SCN<sup>-</sup>の配向が異なり、Rv3588c においては、亜鉛に SCN<sup>-</sup>が配位する。COSase は、Cab タイプである *Mycobacterium tuberculosis* β-CA Rv1284 とほぼ同じ位置に SCN<sup>-</sup>が存在していた。

CS<sub>2</sub> hydrolase も、COSase の構造と類似する。しかし、活性中心や基質の経路に関するアミノ酸について見てみると、COSase ではアラニン 38、イソロイシン 33'、ロイシン 87'であるが、CS<sub>2</sub> hydrolase では異なり、グルタミン酸 38、アルギニン 20'、フェニルアラニン 78'であった (Fig. 2-16)。

#### 2-3-4 考察

基質特異性で差異があるものの、COSase、 $\beta$ -CA、そしてCS<sub>2</sub> hydrolase は、アミノ酸配列において相同性が見られるだけでなく、結晶構造の上からも類似性を示し、それは特に、活性中心近傍において顕著であった。このことは、これらの酵素では、似たような触媒機構によって反応が進行している可能性を示す。これまでに、 $\beta$ -CA のCO<sub>2</sub>水和、CS<sub>2</sub> hydrolase のCS<sub>2</sub>加水分解に関して、触媒機構が提案されている (Rowlett, 2010; Smeulders *et al.*, 2011)。また、 $\alpha$ -CA の亜鉛は、 $\beta$ -CA とは異なり、3つのヒスチジンのイミダゾール基とヒドロキシイオンが配位する。この3つのイミダゾール基、ヒドロキシイオン及び亜鉛によるモデル化合物においては、COS に関する触媒機構も提案されている (Schenk *et al.*, 2004; Notni *et al.*, 2007)。 $\alpha$ -CA と  $\beta$ -CA は、アミノ酸配列の上では相同性を持たないが、活性中心近傍の構造は類似していることから、これらを総合的に判断すると、COSase も、これまでに知られている酵素と同じようなステップを介して、COS を分解していると考えられる。そこで、Schenk *et al.* (2004)、Notni *et al.* (2007) により示された触媒機構を基に、Fig. 2-17 に示すような COSase の触媒機構を提案する。最初のステップは、亜鉛に配位したヒドロキシイオンが、COS の炭素原子に求核攻撃する。これにより、ヒドロキシ基の酸素と COS の硫黄原子が、共に亜鉛と結合した中間体を経て、酸素が放出され、CO<sub>2</sub> が生成される。その後、亜鉛に配位した硫黄は、溶媒中の水分子と反応し、H<sub>2</sub>S が生成され、活性中心は元の状態に戻る。

COSase と  $\beta$ -CA の活性中心の構造は類似していた (Fig. 2-16)。中でも、Cab タイプとの類似度は高く、*Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -CA Rv1284 に対してはほぼ一致した。Cab タイプの  $\beta$ -CA (*Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -CA Rv1284 と *Methanobacterium thermoautotrophicum* の  $\beta$ -CA) は、 $k_{cat}/K_m$  が、それぞれ  $3.7 \times 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 、 $5.9 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  であり、高いCO<sub>2</sub>水和活性を示す。したがって、COSase がCO<sub>2</sub>水和活性をほとんど持たない理由を、活性中心に帰すことはできない (Covarrubias *et al.*, 2005; Strop *et al.*, 2001; Minakuchi *et al.*, 2009; Smith and Ferry, 1999)。そのため、基質の進入、反応生成物の退出経路について、CAVER を用いて推定した (Petřek *et al.*, 2006)。その結果、 $\beta$ -CA は経路の幅が広いのに対して、COSase は狭く、この違いが、基質特異性の違いの要因である可能性が示された (Fig. 2-18)。また、COSase では、 $\alpha 5$  ヘリックスや  $\alpha 6$  ヘリックスの N 末端側のループ (グリシン 150 からプロリン 158) により、基質や反応生成物の経路が狭くなるだけでなく、疎水性においても高くなることが予想される。それ故、この経路のサイズは、COS や反応生成物である H<sub>2</sub>S と CO<sub>2</sub> が通過することは可能であるが、CO<sub>2</sub> 水和の生成物である HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> に対しては狭すぎる。また、COS や H<sub>2</sub>S と比べて、親水性である CO<sub>2</sub> は、疎水性の経路を通りにくいと考えられる。そのため、CO<sub>2</sub> の水和活性をほとんど示さなかった可能性がある。一方、CS<sub>2</sub> hydrolase は、CO<sub>2</sub> 水和活性を持たないが、Fig. 2-18 から分かる通り、基質経路が狭い。これは COSase とは異なり、隣接するサブユニットの構造によって、この部分が狭くなっており、その結果、COSase と同様に基質経路は狭く、疎水性になっている (Smeulders *et al.*, 2011)。したがって、COSase と CS<sub>2</sub>

hydrolase は共に、基質経路のサイズと疎水性によって、それぞれの基質特異性が決定されていると思われる。

Table 2-5. Data collection and refinement statistics.

|                           | COSase                     | COSase / thiocyanate       |
|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Temperature (K)           | 95                         | 95                         |
| Resolution (Å)            | 1.20                       | 1.33                       |
| No. of measured refs.     | 560,892                    | 703,987                    |
| No. of unique refs.       | 67,414                     | 49,976                     |
| $R_{\text{merge}}^a$      | 0.063 (0.315) <sup>b</sup> | 0.054 (0.334) <sup>b</sup> |
| $I_o / \sigma(I_o)$       | 35.6 (7.6) <sup>b</sup>    | 60.6 (10.9) <sup>b</sup>   |
| Completeness (%)          | 99.8 (100) <sup>b</sup>    | 99.9 (100) <sup>b</sup>    |
| Space group               | <i>I</i> 422               | <i>I</i> 422               |
| Cell dimensions           |                            |                            |
| $a = b$ (Å)               | 90.239                     | 90.307                     |
| $c$ (Å)                   | 104.98                     | 105.13                     |
| Structure Refinement      |                            |                            |
| Resolution range (Å)      | 10.0 – 1.20                | 10.0 – 1.33                |
| No. of refs.              | 63,916                     | 47,313                     |
| Completeness (%)          | 94.8                       | 95.0                       |
| $R^c$                     | 0.135                      | 0.156                      |
| $R_{\text{free}}^d$       | 0.170                      | 0.204                      |
| r.m.s.d. bond lengths (Å) | 0.013                      | 0.012                      |
| r.m.s.d. bond angles (°)  | 2.1                        | 2.1                        |
| No. of protein atoms      | 1634                       | 1599                       |
| No. of solvent atoms      | 256                        | 155                        |
| No. of ligand atoms       | 2                          | 5                          |

<sup>a</sup> $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$ , where  $I_i(hkl)$  is the  $i^{\text{th}}$  intensity measurement of reflection  $hkl$ , including symmetry related reflections, and  $\langle I(hkl) \rangle$  is its average.

<sup>b</sup>The values for the highest resolution shell are given in parentheses, <sup>b</sup>(1.20-1.24 Å resolution for wild-type COSase, 1.33-1.38 Å resolution for COSase / thiocyanate).

<sup>c</sup> $R = \sum_{hkl} (|F_o| - |F_c|) / \sum_{hkl} |F_o|$ .

<sup>d</sup> $R_{\text{free}}$  was calculated on 5 % of the data omitted randomly.

Table 2-6. Intermolecular interaction between COSase and thiocyanate molecule in the catalytic site.

| Residue | COSase              |      | thiocyanate | distance (Å) |
|---------|---------------------|------|-------------|--------------|
|         | Atom in the residue | Atom | Atom        |              |
| Cys44   | S $\gamma$          | S    | S           | 3.89         |
| Met45   | C $\epsilon$        | C    | C           | 3.68         |
| Met45   | C $\gamma$          | C    | C           | 3.90         |
| Asp46   | C $\alpha$          | N    | N           | 3.34         |
| Ala68   | C $\beta$           | S    | S           | 3.99         |
| Met102  | S $\delta$          | S    | S           | 3.81         |
| Ile33'  | C $\delta$ 1        | N    | N           | 4.33         |
| His63'  | N $\epsilon$ 2      | N    | N           | 3.03         |
| Leu67'  | C $\delta$ 1        | N    | N           | 3.44         |
| Ile82'  | C $\gamma$ 2        | S    | S           | 4.18         |

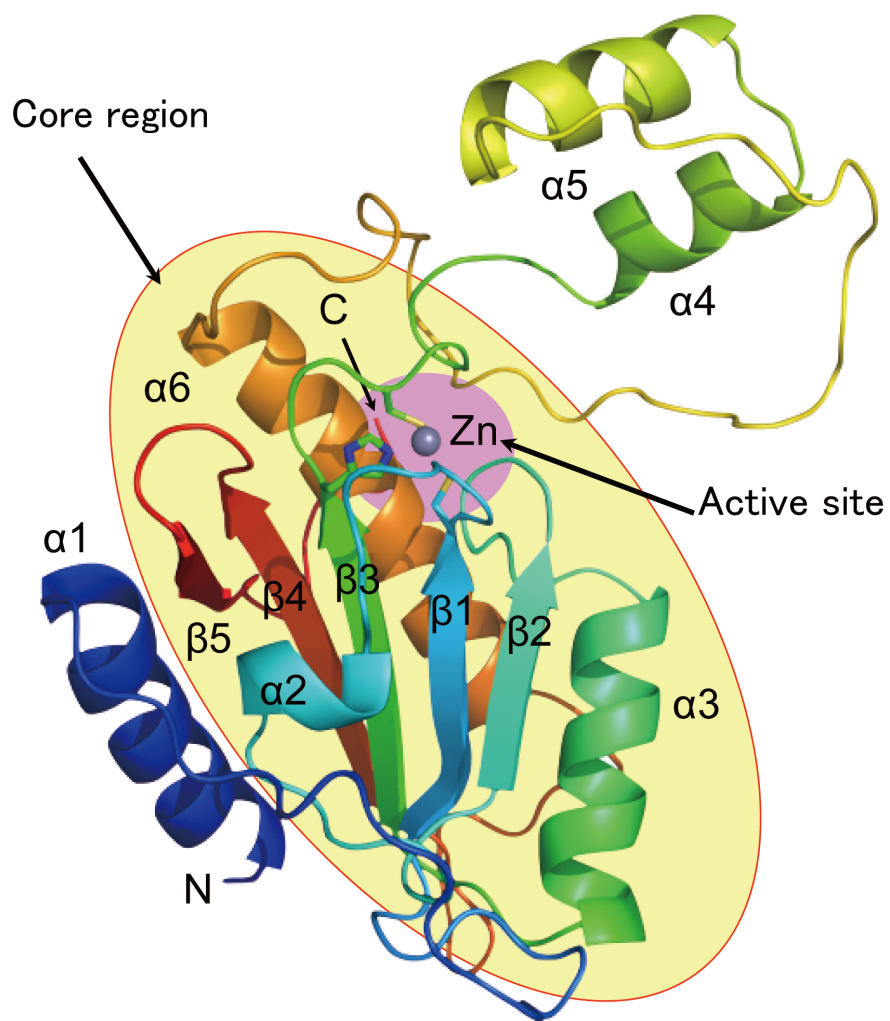


Fig. 2-11. The ribbon diagram of the subunit structure of COSase. Subunit is colored blue to red from the N to the C terminus. The zinc ion in the catalytic site is indicated as dark gray sphere.

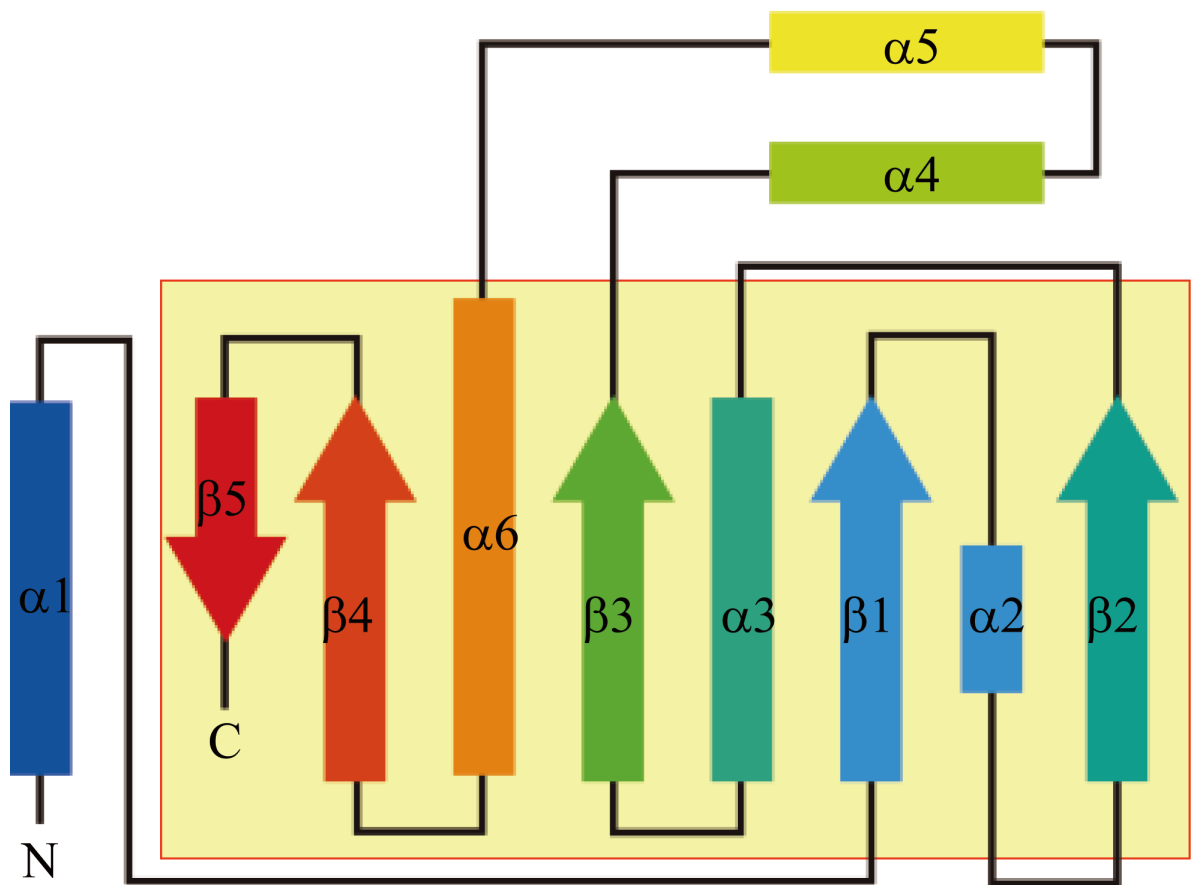


Fig. 2-12. The topology diagram of the subunit structure of COSase. The core region is boxed in yellow background.



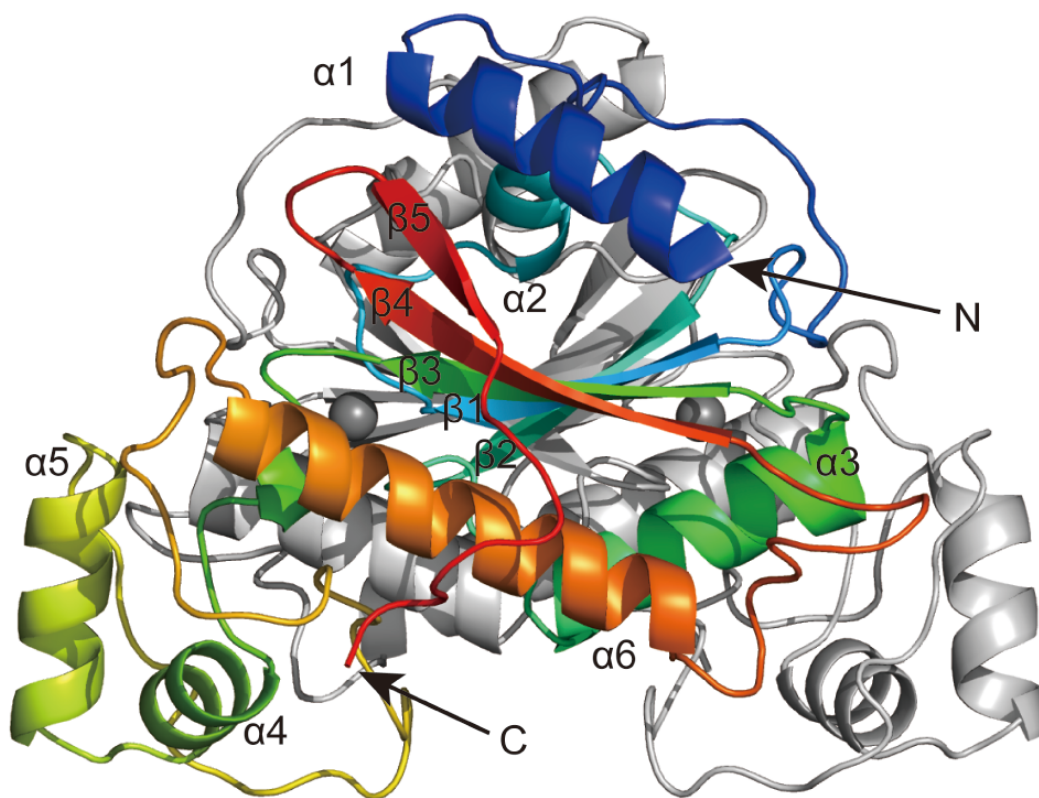


Fig. 2-13. The ribbon diagram of the dimer structure. One subunit is colored blue to red from the N to the C terminus, and the other one is shown in gray. The zinc ions in the catalytic site are indicated as dark gray spheres.

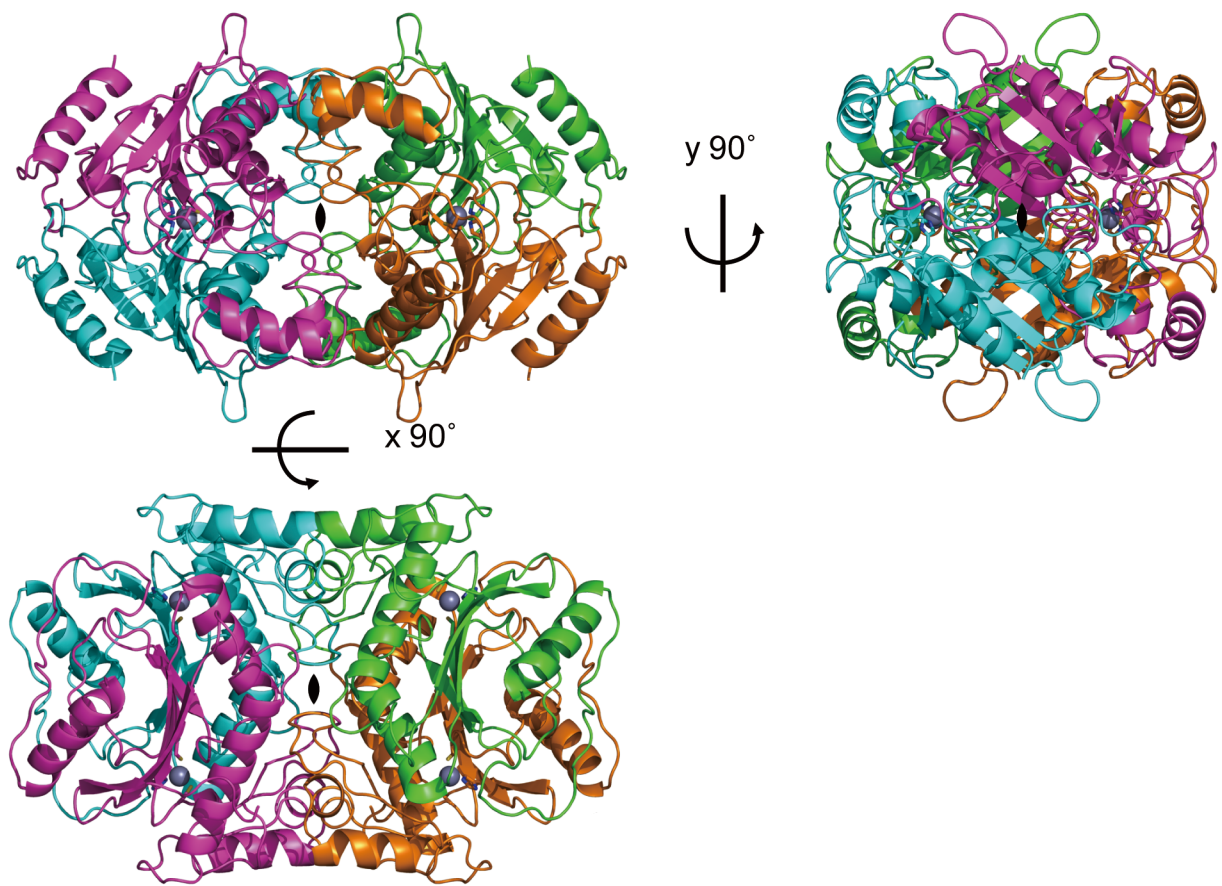


Fig. 2-14. The ribbon diagram of native COSase. Each subunit is represented by different colors. The zinc ions in the catalytic site are indicated as dark gray spheres.

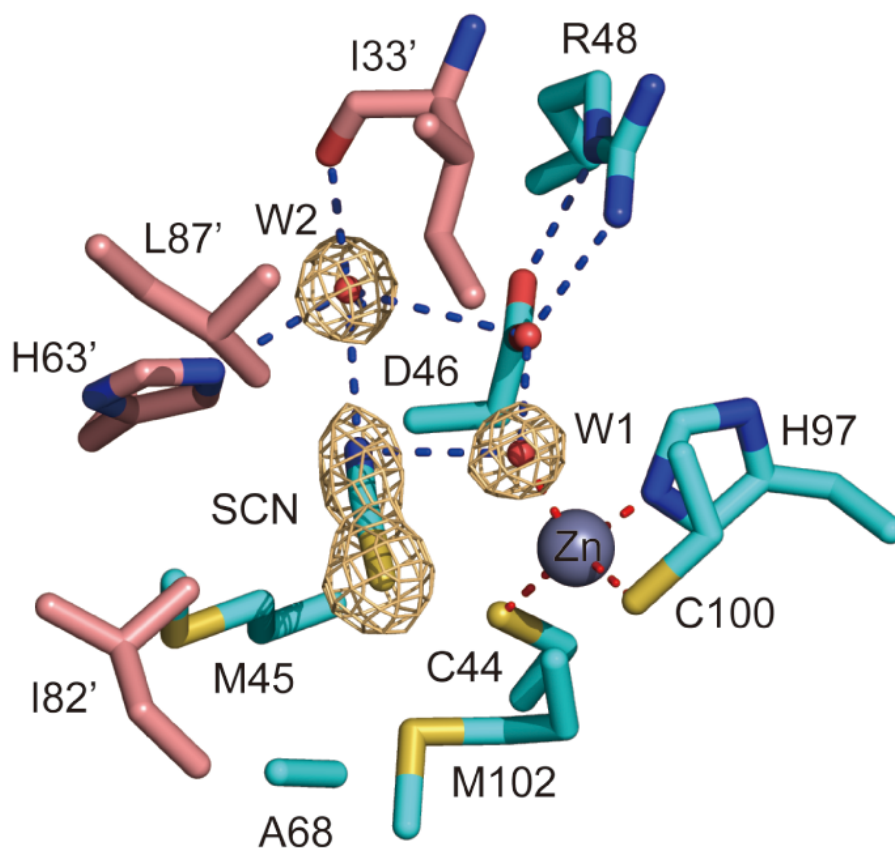


Fig. 2-15. The catalytic site of COSase complex with  $\text{SCN}^-$ . The residues originating from one subunit are shown in cyan and those from the other in pink. The OMIT electron density map ( $5\sigma$ ) for the  $\text{SCN}^-$  and surrounding water molecules are colored orange. The zinc ion (dark gray sphere) is coordinated by two cysteine, one histidine residues and a water molecule (red sphere). Interactions between the zinc ion and its ligands are shown as red broken lines. Blue broken lines indicate the hydrogen bonds. Nitrogen, oxygen and sulfur atoms are shown in blue, red and yellow, respectively.

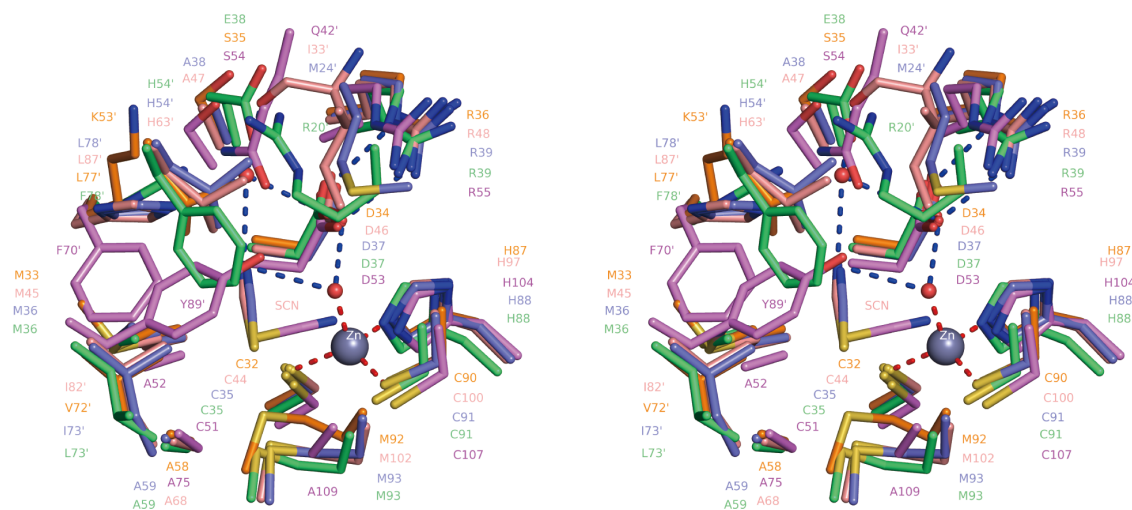


Fig. 2-16. Overlay of the catalytic sites of COSase (pink), the *Mycobacterium tuberculosis* β-CA Rv1284 (blue), the *Mycobacterium tuberculosis* β-CA Rv3588c (purple), the *Methanobacterium thermoautotrophicum* β-CA (orange) and the *Acidianus* sp. A1-3 CS<sub>2</sub> hydrolase (green). The zinc ion and water molecules in COSase are represented as gray and red spheres, respectively. Interactions between the zinc ion and its ligands are shown as red broken lines. Blue broken lines indicate the hydrogen bonds. Nitrogen, oxygen and sulfur atoms are shown in blue, red and yellow, respectively.

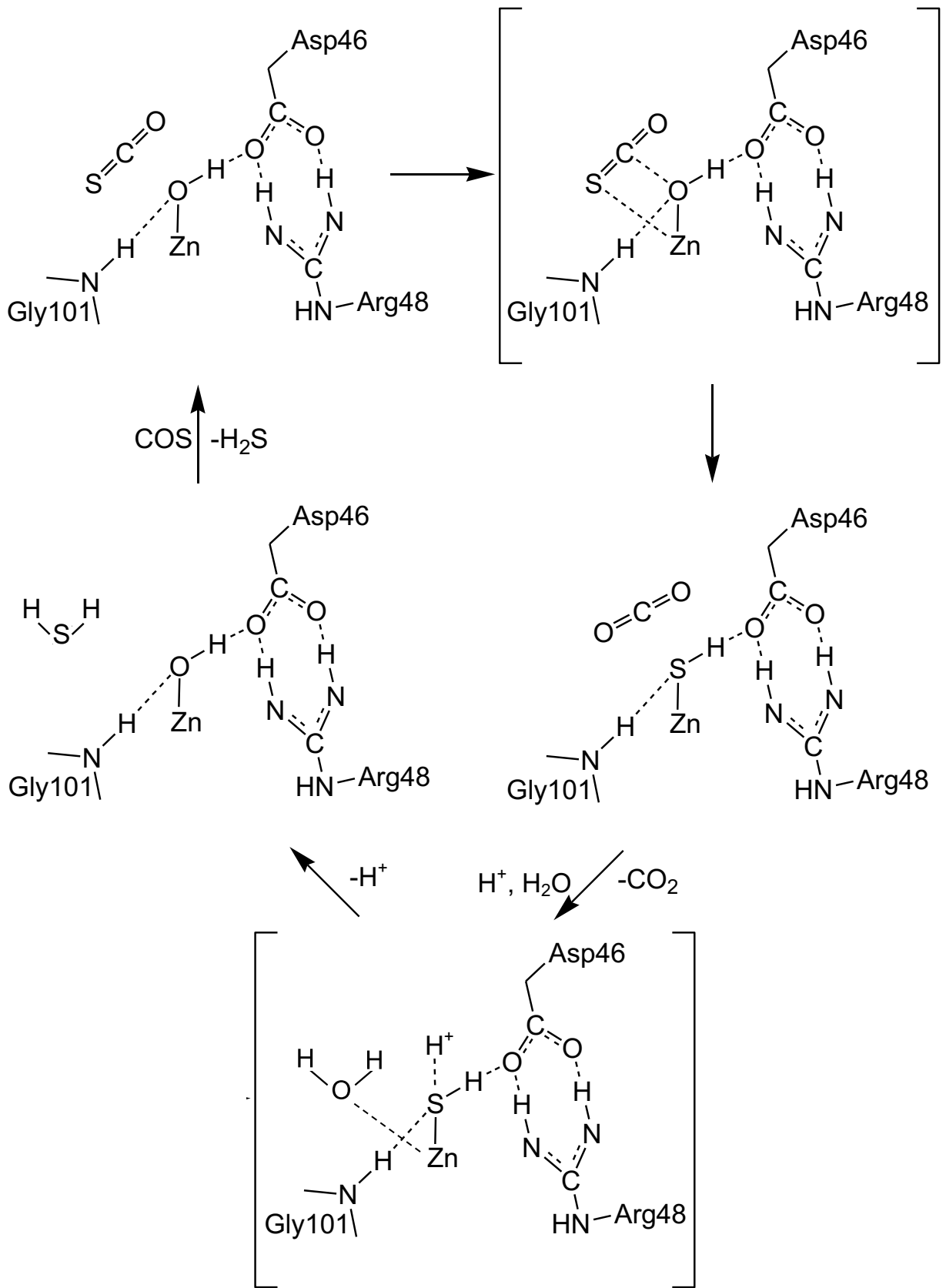


Fig. 2-17. Proposed reaction mechanism of CO<sub>2</sub>Sase.

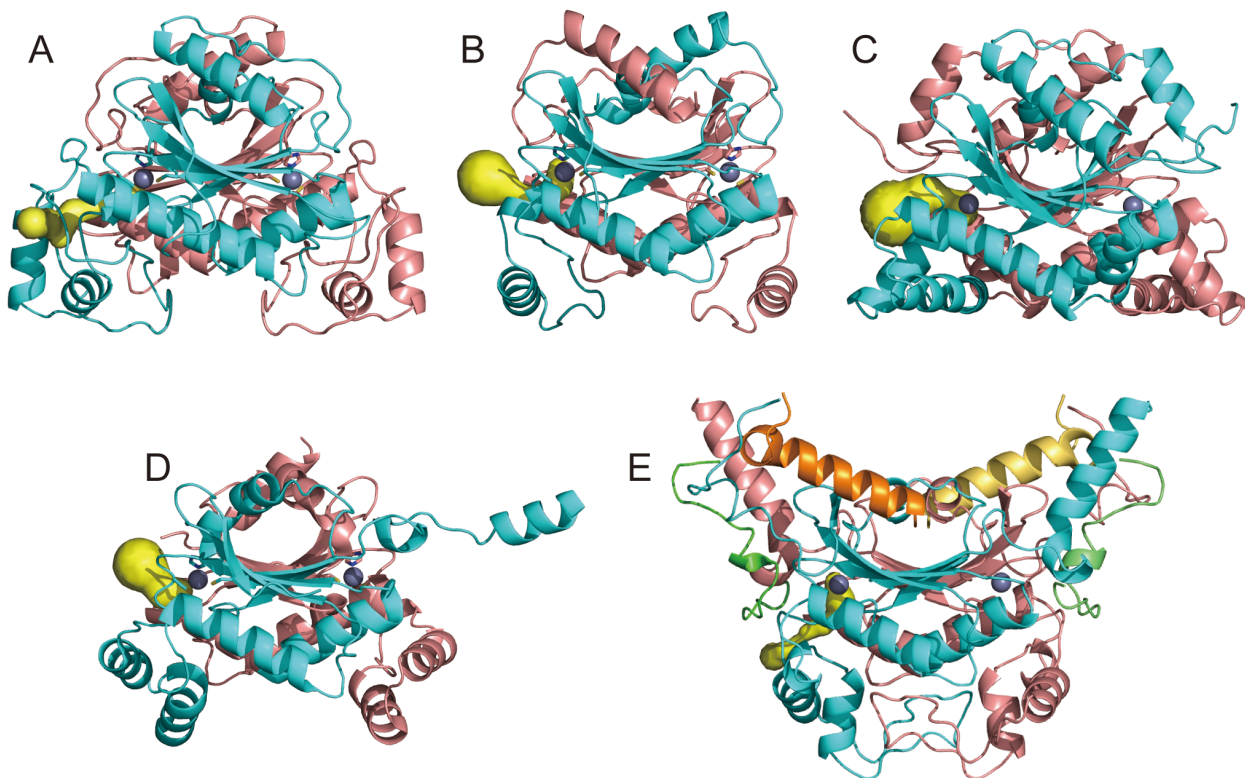


Fig. 2-18. The possible substrate tunnels (yellow) from the active site to the surrounding solvent calculated using CAVER: (A) COSase, (B) the *Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -CA Rv1284, (C) the *Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -CA Rv3588c (tetrameric form), (D) the *Methanobacterium thermoautotrophicum*  $\beta$ -CA, and (E) the CS<sub>2</sub> hydrolase from the *Acidianus* sp. A1-3. One subunit is shown in cyan and the other in pink. Dark orange and green parts in (E) correspond to the N- and C-terminals of the adjacent subunit and light orange and green ones represent those of the opposite subunit. Dark gray spheres represent the zinc ions in the active sites.

### 第3章 放線菌のCOS分解とCOSaseを含む $\beta$ -CAのclade D遺伝子の検出

#### 3-1 はじめに

対流圏のCOSの主要な消失源として、土壌は、植物に次いで重要と見なされている (Launois *et al.*, 2015)。さらに、オートクレーブ処理をした土壌や、CAに対する特異的阻害剤を添加した土壌では、COS分解が阻害されるため、COSの分解は土壌微生物によるものであり、さらに、これはCOS分解微生物が保持しているCAに起因すると考えられている (Kesselmeier *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2002)。これまで明らかにされたCOS分解微生物は、1-2に記載したように、多様な分類群にまたがって存在しているものの、その数は少なく、微生物全般にCOS分解活性があるかどうかは明らかではない。さらに、これらの研究のほとんどは、大気濃度と比べて非常に高い、ppmvオーダーのCOSを用いており、大気濃度のCOSを用いた研究は極めて少ない (Kato *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Kusumi *et al.*, 2011)。Kato *et al.* (2008) の研究によると、土壌から分離された従属栄養性の7株のCOS分解細菌の内、*Mycobacterium* spp. 4菌株は、大気濃度のCOSを分解するが、*Williamsia* sp. 1菌株及び*Cupriavidus* spp. 2菌株は、分解しなかった。この結果は、用いた細菌数は限られるものの、土壌中に存在する*Mycobacterium*属を含む放線菌は、大気濃度COSの分解能を保持している可能性を示す。放線菌は、土壌中の微生物の中で、真菌に次ぐバイオマスとして存在するため (Islam and Wright, 2005)、そのCOS分解能を調べることは、COSの消失源としての土壌のCOS分解の詳細を把握するために重要である。

一方、微生物のCOS分解酵素のうち、高い分解活性を持つ酵素として*T. thioparus* THI115株のCOSase、*Acidianus* sp. A1-3株や*Acidithiobacillus thiooxidans* S1p株及びG8株のCS<sub>2</sub> hydrolaseが挙げられる (Table 1-1)。これらの酵素は、アミノ酸配列やX線結晶構造解析から、 $\beta$ -CAのclade Dに分類される $\beta$ -CAの酵素ファミリーとして考えられる (2章; Smeulders *et al.*, 2011, 2013)。さらに、植物の $\beta$ -CAは、clade Bに分類され、高い分解活性のあることが知られている (Protoschill-Krebs *et al.*, 1996; Ogée *et al.*, 2016)。これらの知見は、微生物の $\beta$ -CAのCOS分解活性が調べられていないものの、COS分解活性があることを示唆する。そのため、高いCOS分解活性を持つ微生物は、 $\beta$ -CAの酵素ファミリーに分類される酵素を保持している可能性が高い。

本研究では、放線菌 (Actinobacteria綱) のほぼ全ての亜目 (suborder) を網羅する様々な細菌、及び土壌からKato *et al.* (2008) が分離したCOS分解細菌、及びKatayama *et al.*, (1993) が分離した*T. thioparus* THI115株のCOS分解活性を細菌間で比較した。さらに、土壌から分離したCOS分解細菌に関して、COSaseをコードする遺伝子が存在するかを調べた。



## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 細菌及び培養条件

Table 3-1 に記した細菌を実験に供した。このうち Actinobacteria 綱には、10 の亜目が存在するが (Stackebrandt *et al.*, 1997)、培養の容易さから、Actinomycineae と Glycomycineae 亜目を除く 8 亜目に属する細菌 20 菌株を選び、菌株保存機関 [独立行政法人製品評価技術基盤機構 Biological Resource Center (NBRC)、国立研究開発法人理化学研究所 Japan Collection of Microorganisms (JCM)] から分譲された菌株を使用した。その他は、我々の研究室で、Katayama *et al.* (1993) が分離した *T. thioparus* THI115 株、及び Kato *et al.* (2008) が分離した従属栄養性の COS 分解細菌 8 菌株である。

培養条件は、菌種によって異なるが、特に記載しない限り、*T. thioparus* THI115 株を除いて、PYG (polypeptone-yeast extract-glucose) 液体培地を用いた。PYG 液体培地の組成 (g/L) は、ポリペプトン (日本製薬) 2.0、Bacto yeast extract (Difco) 1.0、グルコース 0.5、pH 7.2 とした。絶対独立栄養性細菌の *T. thioparus* THI115 株の培養は、2-1-2-1 に記した mTC10 培地 (ただし、pH 7.2 に変更した) を用いた。120 rpm、30 °C で往復振盪することで、好氣的に培養を行なった。

### 3-2-2 30 ppmv COS の分解実験

従属栄養性の細菌は、PYG 平板培地からシングルコロニーを 1 白金耳採取し、試験管 (長さ 20 cm、内径 2 cm) に入れた 10 mL の PYG 液体培地に接種した。定常期になるまで培養 (3~17 日間) 後、5,000 × g、20 °C で 15 分間遠心し、集菌した。25 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.2) で菌体を 2 回洗浄後、同バッファー 10 mL で懸濁した。試験管 (長さ 20 cm、内径 2 cm) に移し、ブチル W 栓 (W-21、太陽興業) で蓋をした。10.3% の COS 標準気体 (Balance gas: N<sub>2</sub>、日酸 TANAKA) を、ガスタイトマイクロシリンジで試験管の気相 40 mL に添加し、気相の COS 濃度を 30 ppmv にした。添加直後は、COS 濃度が安定しないため、添加 10 分後から 120 rpm、30 °C で往復振盪しつつ、経時的に気相を採取し、2-2-2-1 に記載の方法で、GC-FPD によって COS 濃度を測定した。ただし、Kato *et al.* (2008) が分離した従属栄養性の COS 分解細菌の中で、*Williamsia* sp. THI410 株については、COS 分解中に生じる H<sub>2</sub>S により、クロマトグラム上の COS のピークと H<sub>2</sub>S のピークが重なり、COS 濃度を測定出来なかった。そのため、Kato *et al.* (2008) が分離した 8 菌株と *T. thioparus* THI115 株の実験では、COS のピーク時に H<sub>2</sub>S のピークが重ならない β,β'-oxydipropionitrile (Chromosorb W AW-DMCS, ジーエルサイエンス) にカラムを変更し、GC 条件もカラム温度を 40 °C、キャリアーガスの流速を 17 mL min<sup>-1</sup> に変更して、COS の濃度測定を行なった。

分解実験の終了後、菌体の全有機炭素 (TOC) を、3-2-4 に記載した方法により測定した。COS 分解反応は、指数近似曲線  $C(t) = C_0 e^{-kt}$  として近似され、速度定数  $k$  (h<sup>-1</sup>) を求めた。ここで、 $C(t)$  は、 $t$  (h) における COS の濃度を示し、 $C_0$  は COS の初期濃度を示す。菌株間の COS 分解活性の比較は、TOC 当たりの  $k$  を算出して行なった。*T. thioparus* THI115 株は、9.9 mL の mTC10 培地に、定常期の菌液 0.1 mL を



接種して、定常期になるまで7日間培養した。本菌の定常期の菌密度は低いため、試験管5本で培養を行ない、菌液を1つにまとめて、上記と同じように集菌以降の操作を行なった。

### 3-2-3 大気濃度のCOS分解実験

実験は、PYG液体培地、又はPYG寒天培地を用いて培養した菌体を用いた。PYG液体培地を使った実験では、シングルコロニー1白金耳を試験管(長さ16 cm、内径1.5 cm)に入れた、10 mL PYG液体培地に接種した。3~7日間振盪培養し、目視で定常期に成長したことを確認後、3-2-2に記載の方法と同じようにして集菌、菌体洗浄、再懸濁を行なった。菌液は、ガラス繊維濾紙(GF-75、保持粒子径0.3 μm、アドバンテック)で濾過した。乾燥を防ぐため、オートクレーブ滅菌した溶液[1L当たり5%(w/v)ケイ酸ナトリウム5.5 mL、1 Mリン酸二水素カリウム6.0 mLを含む溶液]5.5 mLを入れたシャーレに、菌体を濾過した濾紙を置いた。シャーレは蓋をせず、1端を裁断した5 L容アルミニウムバッグ(AAK-5、ジューエルサイエンス)に入れ、裁断した部分をクリップ(A-75、280 mm、三菱ガス化学)で密封し、バッグ内に空気を充填した。ブチルW栓(W-12、太陽興業)で栓したスリーブを通して、バッグ内の気相300 mLを50 mL容シリンジ(テルモ)を用いて、経時的に採取し、2-2-2-10の方法で濃縮後にCOSの定量を行なった。

PYG寒天培地を使った実験では、PYG寒天培地又は10倍希釈したPYG寒天培地からなる平板培地に、シングルコロニーを1白金耳接種した。3~7日間培養し、目視で定常期に成長したことを確認後、シャーレの蓋を外して、5L容アルミニウムバッグに入れ、上記と同じように大気濃度のCOSの分解実験を行なった。

### 3-2-4 TOCの定量

TOCは、湿式酸化-赤外線ガス分析計によって測定した(Seto and Tange, 1980)。COS分解実験終了後、菌液を側室付フラスコの酸化槽へ移した。10 mLのmilli-Q水でCOS分解実験に用いた試験管を洗浄し、追加した(この操作を2回行なった)。酸化槽にリン酸1 mLを添加し、バーナーでおよそ2分間加熱することで無機炭酸を除去した。流水にフラスコを浸して、体温程度まで試料温度を下げた後、過硫酸カリウム5 gを酸化槽に、100 g L<sup>-1</sup>硝酸銀溶液1 mLをフラスコの側室に加え、蓋をした。ソーダ石灰に通気させて、CO<sub>2</sub>を除去した空気を、1 mL min<sup>-1</sup>でフラスコに通気しつつ、排気される空気は、CaCl<sub>2</sub>を充填した乾燥管による水蒸気の除去を経て、非分散形赤外線ガス分析計(ZRH、富士電機)に導入した。ベースラインが安定した後、フラスコを傾けて側室内の硝酸銀溶液を酸化槽へ移し、直ちにバーナーで加熱し沸騰させた。硝酸銀によって過硫酸カリウムによる酸化が促進され、菌体のTOC由来の二酸化炭素が発生する。この二酸化炭素を、非分散形赤外線ガス分析計で測定した。グルコース溶液(炭素量として0~3 mg-C)を用いて同様の操作を行ない、そのピークの面積から検量線を作成してTOCを求めた。

### 3-2-5 COSase と $\beta$ -CA のアミノ酸配列の保存領域をコードする塩基配列の検出

Kato *et al.* (2008) が土壌から分離した、COS 分解細菌 (*Mycobacterium* spp. THI401~THI405 株、*Streptomyces* sp. THI408 株、*Williamsia* sp. THI410 株、*Cupriavidus* spp. THI414 株、THI415 株の 9 菌株) の mTC スラント培地上に生えた菌体の 1 白金耳を、500 mL 容坂口フラスコに入れた、100 mL の PYG 液体培地に接種し、培養した。目視で定常期に達したことを確認後、ゲノム DNA をアイソプラント (ニッポンジーン) を用いて精製した。

PCR による COSase 遺伝子の検出に用いる縮重プライマーは、COSase に特異的なプライマーが理想だが、COSase は、*T. thioparus* THI115 株以外の生物で、その存在が明らかになっていないため、どの領域が特異的なのか判断できない。そのため、本実験では、COSase と  $\beta$ -CA 間でよく保存されたアミノ酸領域 [Fig. 1-2、Fig. 3-2 に示される、COSase の結晶構造の  $\beta$ 1 領域の一部を含むアミノ酸配列 (VACMDAR)、及び  $\beta$ 3 領域の一部を含むアミノ酸配列 (HTRCGML)] に基づいて縮重プライマーを設計し、5'-GTNGCNTGYATGGAYGCNMG-3'及び 5'-ARCATNCCRCANCKNGTRTG-3'とした。そのため、COSase と  $\beta$ -CA のどちらも検出される可能性がある。PCR は、Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (サーモフィッシャーサイエンティフィック) の説明書を参考にし、反応溶液は 1 × HF buffer、200  $\mu$ M dNTPs、フォワードプライマー、リバープライマー各 2  $\mu$ M、鋳型 DNA 10 ng、Phusion DNA Polymerase 0.004 U で、Milli-Q 水で計 20  $\mu$ L とした。PCR 反応条件は、98 °C、30 秒→98 °C、10 秒、60 °C、30 秒、72 °C、30 秒を 25 サイクル→72 °C、10 分とした。PCR 産物は、2%アガロースゲル電気泳動で分離し、COSase に基づいて 185 bp 付近の断片を切り出し、illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE ヘルスケア) を用いて抽出した。切り出した DNA 断片は、pGEM-T Easy Vector System I (プロメガ) を用いてベクターへ挿入し、コンピテントセル XL10-Gold (アジレント・テクノロジー) に形質転換して導入した。ブルーホワイトセレクションにより、インサートの存在を確認したコロニーを LB 培地で培養後、DNA 自動分離装置 (PI-50 $\alpha$ 、クラボウ) により、プラスミドを抽出した。制限酵素 *Eco*RI によるインサートの確認、及び PCR による増幅を確認できたプラスミドを用いて、キャピラリーシーケンサー (3500 Genetic Analyzer、サーモフィッシャーサイエンティフィック) により、塩基配列を決定した (巻末 補足情報 Table S1)。COSase と  $\beta$ -CA 遺伝子の保存領域を含む塩基配列は、日本 DNA データバンクに登録した (アクセッション番号は *Mycobacterium* spp. THI401~THI405 株が LC127314~LC127318、*Williamsia* sp. THI410 株が LC127319 である)。

### 3-3 結果

#### 30 ppmv の COS 分解

Table 3-1 に示すとおり、*Spirillospora albida* NBRC 12248<sup>T</sup> 株、*Skermania piniformis* NBRC 15059<sup>T</sup> 株、*Micromonospora chalcea* NBRC 13503<sup>T</sup> 株を除く、17 菌株の放線菌で、COS 分解活性のあることが明らかとなった。コントロールとして行なった無菌区の実験では、COS の化学的な加水分解のため (Ferm, 1957; Elliott *et al.*, 1989)、速度定数  $0.027 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$  ( $n = 6$ ) で COS が減少した。そのため、本研究では、 $0.04 \text{ h}^{-1}$  以上の速度定数で COS を分解する細菌を、COS 分解細菌と定めた。*Corynebacterium ammoniagenes* JCM 1305<sup>T</sup> 株の COS 分解は、反応開始後 9 時間目以降は、指数近似曲線にフィットしなかったため、5 時間目までの COS 分解から速度定数を求めた。TOC 当たりの速度定数で、菌体間の COS 分解活性を比較すると、菌株保存機関から分譲された菌株の中では、*Dietzia maris* NBRC 15801<sup>T</sup> 株 ( $6.19 \pm 5.68 \text{ h}^{-1}$ ) が、最も高い活性を示した (Table 3-1)。土壌から分離した COS 分解細菌 8 菌株の中で比較すると、放線菌は、 $\beta$ -プロテオバクテリアに属する *Cupriavidus* sp. THI415 株よりも高い活性を示した。放線菌の中では、*Streptomyces* sp. THI408 株は低い活性であったが、これは培養中にフロックを形成したため、高い分解活性を示す菌体の割合が少なくなった可能性が考えられた。COS 分解がエネルギーを得るために必須である、*T. thioparus* THI115 株の活性は高い値を示した。

#### 大気濃度の COS 分解

PYG 液体培地を用いた *Streptomyces ambofaciens* NBRC 12836<sup>T</sup> 株の実験では、2 日間で COS が、およそ 500 pptv から 1300 pptv へ上昇した。無菌区においても、およそ 1400 pptv へ上昇し、大気濃度の COS 分解を評価する上では、PYG 培地を実験に用いることはできないと考えられた。この上昇は、酵母エキスに含まれると考えられる、グルタチオンやシステインなどのような、有機硫黄化合物に由来する可能性がある (Flöck *et al.*, 1997)。そのため、液体培地を用いた培養後に、その菌液を濾過し、培地成分を取り除いた後に、大気濃度 COS の分解実験を行なった。その結果、菌株保存機関から分譲された 20 菌株中、*Dietzia maris* NBRC 15801<sup>T</sup> 株のみに大気濃度 COS の分解活性が確認された。

COS 分解には、栄養培地のような有機物の存在が必要である可能性も考え、TOC 当たりの 30 ppmv COS の高い分解活性を示した 12 菌株を選び、10 倍希釈した PYG 液体培地を用いて、大気濃度 COS の分解実験を行なった。その結果、Fig. 3-1 に示すように、*Dietzia maris* NBRC 15801<sup>T</sup> 株と *Streptomyces ambofaciens* NBRC 12836<sup>T</sup> 株は明らかに COS を分解した。*Rhodococcus rhodochrous* JCM 2158 株、*Gordonia bronchialis* NBRC 16047<sup>T</sup> 株及び *Nocardioides albus* NBRC 13917<sup>T</sup> 株は、無菌区と比べて COS 濃度は低いものの、初期 COS 濃度よりは高くなり、 $t$  検定により有意な差は、コントロールとの間で得られなかった ( $P > 0.05$ )。対照的に、*Geodermatophilus obscurus* NBRC 13315<sup>T</sup> 株と *Amycolatopsis orientalis* NBRC 12806<sup>T</sup> 株では、COS の細胞外への発生が見られた。

## COSase と $\beta$ -CA のアミノ酸配列の保存領域をコードする塩基配列の検出

*Mycobacterium* spp. THI401、THI402、THI403、THI404、及び THI405、*Williamsia* sp. THI410 の菌株において、期待される 185 bp の PCR 産物が得られ、その DNA の塩基配列 (プライマー領域を除いた 145 bp) を決定し、相同性検索を行なったところ、 $\beta$ -CA に最も高い相同性があることが判明した (Fig. 3-2)。その一方で、いくつかのポジティブクローンでは、COSase や  $\beta$ -CA とは明らかに異なる配列も検出されたことから、本実験に用いたプライマーの特異性は低いと考えられた。*Streptomyces* sp. THI408 株では、アガロースゲル電気泳動で期待される 185 bp のバンドが得られなかった。*Cupriavidus* spp. THI414 株、THI415 株では、185 bp 付近のバンドが得られたが、塩基配列を明らかにした各 12 個のポジティブクローン中に COSase や  $\beta$ -CA の配列はなく、相同性検索したところ、全く異なるタンパク質 (lipase、cellulose synthase、lauroyl acyltransferase、DNA gyrase、*Tursiops truncatus* の ankyrin repeat and SOCS box protein 16 と予測されるタンパク質、*Klebsiella* 属細菌の hypothetical protein) をコードする塩基配列に高い相同性を示した。本実験では、*Streptomyces* sp. THI408 株と *Cupriavidus* spp. THI414 株、THI415 株では、COSase と  $\beta$ -CA の配列は得られなかったが、プライマーの特異性の低さや PCR 条件の影響も考えられるため、これらの酵素が存在する可能性はまだ否定できないと考えられる。

### 3-4 考察

菌株保存機関から分譲された放線菌の 20 菌株中 17 菌株は、30 ppmv COS の分解活性があるものの、30 ppmv COS の高い分解活性を示した 12 菌株のうち、大気濃度の COS に対して明らかな分解活性を示したのは、2 菌株のみであった。*Streptomyces ambofaciens* NBRC 12836<sup>T</sup> 株の大気濃度 COS の分解実験では、培養条件など (PYG 培地の組成や濾過) によって分解活性が異なったことから、細菌の生理条件に影響を及ぼす様々な因子が、COS 分解活性に影響するものと考えられた。植物 (Kesselmeier and Merk, 1993) や土壌 (Lehmann and Conrad, 1996; Kesselmeier *et al.*, 1999; Conrad and Meuser, 2000) では、COS の吸収と発生が見かけ上起こらない COS 濃度、つまり補償点があることが知られている。そのため、本実験の結果から、細菌においても、同じような補償点や COS 分解の閾値が、大気濃度の COS と 30 ppmv COS の間に存在する可能性がある。

いくつかの土壌や根圏では、COS の発生が知られており (Melillo and Steudler, 1989; Kanda, Tsuruta and Minami, 1992, 1995; Liu *et al.*, 2010; Whelan *et al.*, 2013; Maseyk *et al.*, 2014; Whelan and Rhew, 2015; Whelan *et al.*, 2016)、土壌では局所的に COS が、大気濃度より高い箇所があると考えられることから、大気濃度の COS 分解活性がない細菌も、COS の主要な消失源である土壌で、COS 分解に寄与する可能性がある。

*Geodermatophilus obscurus* NBRC 13315<sup>T</sup> 株及び *Amycolatopsis orientalis* NBRC 12806<sup>T</sup> 株は、大気濃度の COS 分解実験時に COS の発生が見られた。微生物による COS の発生は、SCN<sup>-</sup>や CS<sub>2</sub> の分解で報告されているが (Smith and Kelly, 1988; Katayama *et al.*, 1992; Sorokin *et al.*, 2007; Smeulders *et al.*, 2011, 2013; Hussain *et al.*, 2013)、これらの化合物は、本実験では全く使用されていない。一方、グルタチオンやシステインなどの有機硫黄化合物は、COS の前駆体となり得ることが知られており (Flöck *et al.*, 1997)、菌体内に存在するこれらの化合物が、COS 発生に寄与した可能性も考えられる。

エネルギーを得るために COS の分解が必須な、*T. thioparus* THI115 株の COS 分解活性が高いのは当然と云える。一方、高い COS 分解活性を示す *Dietzia maris* NBRC 15801<sup>T</sup> 株や、*Mycobacterium* sp. THI405 株は、従属栄養細菌であり、COS 分解がエネルギー生産と関係しているとは考えにくく、その生理的意義は、未だ明らかではないと云える。本研究で明らかになった、PCR 産物の塩基配列を National Center for Biotechnology Information (NCBI) のタンパク質保存ドメイン検索ツールである、CD-Search により検索した結果、β-CA の clade D に分類されることが示された。β-CA は、アミノ酸配列に基づく系統樹から、4 つの clade (A~D) に分けられ、Table 1-1 に示すような、高い COS 分解活性を持つ COSase や CS<sub>2</sub> hydrolase は、β-CA の clade D に分類される β-CA の酵素ファミリーである。β-CA の clade D をコードする遺伝子は、本研究で使用した放線菌のいくつかのゲノムにも存在した (Fig. 3-2)。これらの配列には、COSase に特徴的な α5 ヘリックスや、その先のループ (Gly150-Pro158)、CS<sub>2</sub> hydrolase に特徴的な FF モチーフ (Smeulders *et al.*, 2011, 2013) は存在しない (Fig. 3-2)。そのため、COSase や CS<sub>2</sub> hydrolase とは異なり、β-CA である可能性が高く、植物と同じように (Protoschill-Krebs *et al.*, 1996)、β-CA の本来の活性である CO<sub>2</sub> の可逆的な水和反応とは別に、CO<sub>2</sub> と COS はアナログ化合物であるため、COS も加水分解

するものと考えられる。その一方で、従属栄養細菌である *Mycobacterium* sp. THI503 株は、独立栄養的な硫酸化能を持ち、さらに COS 分解活性もあることが明らかにされている (Kusumi *et al.*, 2011)。このことは、*Mycobacterium* 属の細菌では、COS 分解活性が、エネルギー生産と関係している可能性があることを示唆する。本実験で用いた細菌の 16S rRNA や  $\beta$ -CA と COS 分解活性との関係を、系統樹との相関で示したが、明確な関係は明らかにならなかった (Fig. 3-3、Fig. 3-4)。

本研究によって、多くの放線菌で COS 分解活性があること、 $\beta$ -CA が、その活性に関係している可能性を明らかにした。近年、真菌に対する抗生物質 nystatin の添加で、土壌による COS 吸収が阻害されること (Bunk *et al.*, 2017)、*Fusarium* 属 や *Trichoderma* 属などの真菌にも、COS 分解活性のあることが明らかにされた (Li *et al.*, 2010、Masaki *et al.*, 2016)。そのため、大気 COS の重要な消失源としての土壌を詳細に評価するためには、放線菌のような細菌だけではなく、土壌中のバイオマスとして豊富な真菌の影響も調べるのが重要であると云える。

Table 3-1. Comparison of COS degradation activity at 30 ppmv and ambient COS.

| Phylum         | Order   | Species <sup>a)</sup>                                     | 30 ppmv COS                      |   |   | Ambient COS                                    |             |      |
|----------------|---|---|----------------------------------|---|---|--|-------------|------|
|                |   |   | Rate constant (h <sup>-1</sup> ) | TOC (mg C)  | Rate constant / TOC (h <sup>-1</sup> mg C <sup>-1</sup> ) | Rate constant (h <sup>-1</sup> ) <sup>b)</sup> |             |      |
| Actinobacteria | Actinomycetales                                     | <b>Named bacteria in Actinomycetales</b>                  |                                  |   |   |  |             |      |
|                |   | <i>Dietzia maris</i> NBRC 15801 <sup>T</sup>              | 2.34 ± 0.49                      | 0.90 ± 0.77   | 6.19 ± 5.68   | > 0.41   |             |      |
|                |   | <i>Streptomyces ambofaciens</i> NBRC 12836 <sup>T</sup>   | 1.57 ± 0.07                      | 1.26 ± 0.06   | 1.25 ± 0.01   | > 0.33   |             |      |
|                |   | <i>Geodermatophilus obscurus</i> NBRC 13315 <sup>T</sup>  | 0.69 ± 0.20                      | 1.24 ± 0.14   | 0.55 ± 0.10   | < -0.05  |             |      |
|                |   | <i>Streptosporangium roseum</i> NBRC 3776 <sup>T</sup>    | 0.55 ± 0.10                      | 1.46 ± 0.16   | 0.37 ± 0.03   | -0.04 ± 0.04                                   |             |      |
|                |   | <i>Gordonia bronchialis</i> NBRC 16047 <sup>T</sup>       | 0.11 ± 0.01                      | 0.31 ± 0.03   | 0.35 ± 0.05   | 0.08 ± 0.18                                    |             |      |
|                |   | <i>Streptomyces albidoflavus</i> NBRC 12854 <sup>T</sup>  | 0.47 ± 0.04                      | 1.51 ± 0.01   | 0.31 ± 0.03   | 0.01 ± 0.02                                    |             |      |
|                |   | <i>Kitasatospora setae</i> NBRC 14216 <sup>T</sup>        | 0.29 ± 0.01                      | 1.11 ± 0.05   | 0.26 ± 0.00   | -0.09 ± 0.03                                   |             |      |
|                |   | <i>Rhodococcus rhodochrous</i> JCM 2158                   | 0.31 ± 0.00                      | 1.30 ± 0.08   | 0.24 ± 0.02   | 0.06 ± 0.07                                    |             |      |
|                |   | <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> JCM 1305 <sup>T</sup> | 0.23 ± 0.00                      | 1.14 ± 0.22   | 0.20 ± 0.04   | -0.10 ± 0.05                                   |             |      |
|                |   | <i>Nocardioides albus</i> NBRC 13917 <sup>T</sup>         | 0.31 ± 0.04                      | 1.71 ± 0.02   | 0.18 ± 0.03   | 0.09 ± 0.04                                    |             |      |
|                |   | <i>Actinosynnema mirum</i> NBRC 14064 <sup>T</sup>        | 0.30 ± 0.03                      | 1.99 ± 0.04   | 0.15 ± 0.01   | -0.01 ± 0.01                                   |             |      |
|                |   | <i>Amycolatopsis orientalis</i> NBRC 12806 <sup>T</sup>   | 0.23 ± 0.04                      | 2.10 ± 0.06   | 0.11 ± 0.02   | < -0.14  |             |      |
|                |   | <i>Streptomyces albus</i> NBRC 13014 <sup>T</sup>         | 0.05 ± 0.01                      | 1.15 ± 0.19   | 0.05 ± 0.00   | n.d.   |             |      |
|                |   | <i>Luteococcus japonicus</i> NBRC 12422 <sup>T</sup>      | 0.06 ± 0.02                      | 1.76 ± 0.00   | 0.04 ± 0.01   | n.d.   |             |      |
|                |   | <i>Brevibacterium linens</i> NBRC 12142 <sup>T</sup>      | 0.07 ± 0.02                      | 2.86 ± 0.01   | 0.02 ± 0.01   | n.d.   |             |      |
|                |   | <i>Micrococcus luteus</i> JCM 1464 <sup>T</sup>           | 0.04 ± 0.02 <sup>c)</sup>        | 2.76 ± 0.07   | 0.01 ± 0.01   | n.d.   |             |      |
|                |   | <i>Sporichthya polymorpha</i> NBRC12702 <sup>T</sup>      | 0.02 ± 0.00 <sup>c)</sup>        | 1.61 ± 0.05   | 0.01 ± 0.00   | n.d.   |             |      |
|                |   | <i>Spirillospora albida</i> NBRC 12248 <sup>T</sup>       | 0.00 ± 0.00                      | 0.38 ± 0.13   | 0.01 ± 0.00   | n.d.   |             |      |
|                |   | <i>Skermania piniformis</i> NBRC15059 <sup>T</sup>        | 0.00 ± 0.00                      | 0.29 ± 0.05   | 0.01 ± 0.00   | n.d.   |             |      |
|                |   | <i>Micromonospora chalcea</i> NBRC 13503 <sup>T</sup>     | 0.00 ± 0.00                      | 1.79 ± 0.04   | 0.00 ± 0.00   | n.d.   |             |      |
|                |   |   |                                  | <b>COS-degrading bacteria isolated from soil<sup>d)</sup></b> |   |  |             |      |
|                |   |   |                                  | <i>Mycobacterium</i> sp. THI401                               | 1.27 ± 0.48   | 0.84 ± 0.32                                    | 1.83 ± 1.09 | n.d. |
|                |   |   |                                  | <i>Mycobacterium</i> sp. THI402                               | 0.93 ± 0.09   | 1.64 ± 0.04                                    | 0.57 ± 0.07 | n.d. |
|                |   |   |                                  | <i>Mycobacterium</i> sp. THI403                               | 1.07 ± 0.04   | 1.98 ± 0.02                                    | 0.54 ± 0.01 | n.d. |
|                |   |   |                                  | <i>Mycobacterium</i> sp. THI404                               | 1.70 ± 0.14   | 1.84 ± 0.10                                    | 0.92 ± 0.03 | n.d. |
|                |   |   |                                  | <i>Mycobacterium</i> sp. THI405                               | 3.34 ± 0.14   | 0.75 ± 0.22                                    | 4.62 ± 1.19 | n.d. |
|                |   |   |                                  | <i>Streptomyces</i> sp. THI408                                | 0.20 ± 0.04   | 1.51 ± 0.09                                    | 0.14 ± 0.03 | n.d. |
|                |   |   |                                  | <i>Williamsia</i> sp. THI410                                  | 1.00 ± 0.03   | 1.81 ± 0.04                                    | 0.55 ± 0.01 | n.d. |
|                |   | Proteobacteria  | Burkholderiales                  | <i>Cupriavidus</i> sp. THI415                                 | 0.04 ± 0.01   | 0.95 ± 0.15                                    | 0.04 ± 0.00 | n.d. |
|                | <b>COS-degrading bacteria (Chemolithoautotroph)</b> |   |                                  |   |   |  |             |      |
|                | Hydrogenophilales                                   | <i>Thiobacillus thioparus</i> THI115 <sup>e)</sup>        | 7.33 ± 2.10                      | 0.88 ± 0.06   | 8.26 ± 1.84   | n.d.   |             |      |

All experiments at 30 ppmv COS were done in duplicate except that *Dietzia maris* NBRC 15801<sup>T</sup> and *Mycobacterium* sp. THI401 were done in quadruplicate and quintuplicate, respectively. The experiments at ambient COS were done in triplicate. Values of rate constants and TOC of each organism are shown after subtracted the values of uninoculated control, respectively. Each value shows mean  $\pm$  standard deviation. The rate constant of *Corynebacterium ammoniagenes* JCM 1305<sup>T</sup> at 30 ppmv COS was obtained from the degradation curve up to 5 h as described in Results in detail.

<sup>a)</sup> The superscript “T” indicates a type strain.

<sup>b)</sup> *Dietzia maris* NBRC 15801<sup>T</sup>, *Streptomyces ambofaciens* NBRC 12836<sup>T</sup>, *Geodermatophilus obscurus* NBRC 13315<sup>T</sup> and *Amycolatopsis orientalis* NBRC 12806<sup>T</sup> show mean values because some data obtained by GC analyses were beyond linear range of calibration curve. n.d. = not determined.

<sup>c)</sup> Although the rate constants that were subtracted from the values of uninoculated control were low, it was considered as COS degrader because there was clear difference in the degradation curves between bacteria-inoculated and un-inoculated control.

<sup>d)</sup> Isolated by Kato *et al.* (2008).

<sup>e)</sup> Isolated by Katayama *et al.* (1992).



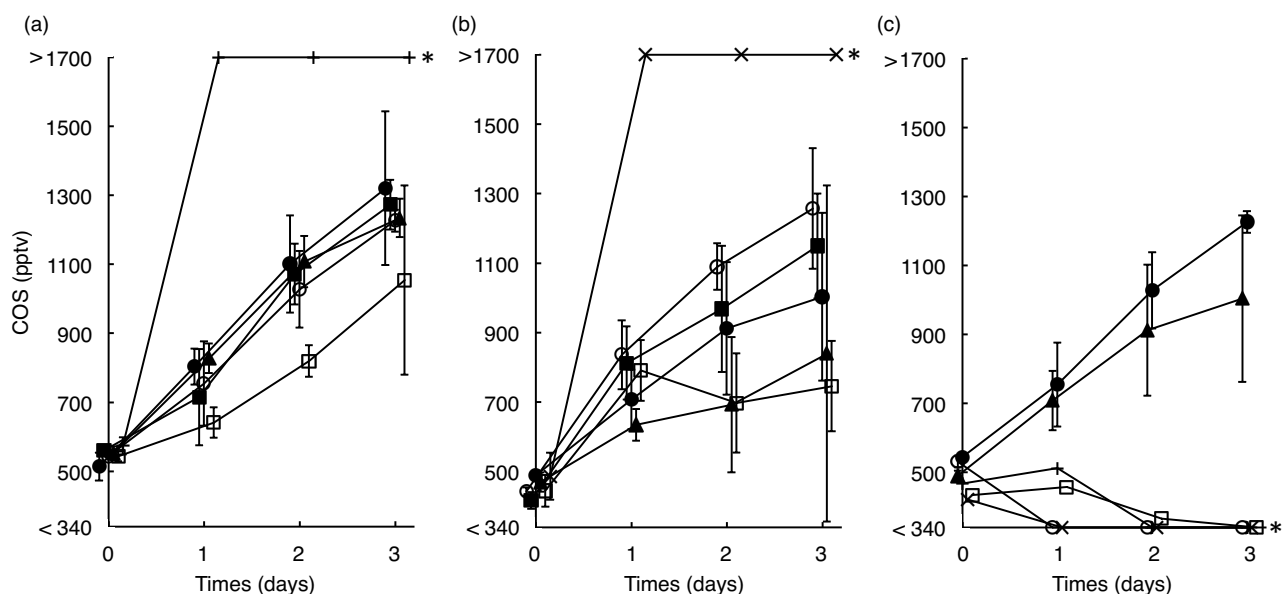


Fig. 3-1. Time courses of ambient COS degradation by actinomycetes. (a) ●, *Streptosporangium roseum* NBRC 3776<sup>T</sup>; ■, *Actinosynnema mirum* NBRC 14064<sup>T</sup>; ▲, *Streptomyces albidoflavus* NBRC 12854<sup>T</sup>; □, *Rhodococcus rhodochromus* JCM 2158; +, *Geodermatophilus obscurus* NBRC 13315<sup>T</sup>; ○, uninoculated control. (b) ○, *Corynebacterium ammoniagenes* JCM 1305<sup>T</sup>; ■, *Kitasatospora setae* NBRC 14216<sup>T</sup>; ▲, *Gordonia bronchialis* NBRC 16047<sup>T</sup>; □, *Nocardioides albus* NBRC 13917<sup>T</sup>; ×, *Amycolatopsis orientalis* NBRC 12806<sup>T</sup>; ●, uninoculated control. (c) ○, *Dietzia maris* NBRC 15801<sup>T</sup>; ×, + and □, *Streptomyces ambofaciens* NBRC 12836<sup>T</sup>; ● and ▲, uninoculated control for *Dietzia maris* NBRC 15801<sup>T</sup> and *Streptomyces ambofaciens* NBRC 12836<sup>T</sup>, respectively. The experiments of figures (a) and (b) were separately performed because of the limitation of the manipulation. Figure (c) is shown to emphasize bacteria degrading ambient COS rapidly. Asterisks indicate the bacteria significantly emitting or degrading COS. All experiments were done in triplicate. The symbol and error bar show mean and standard deviation, respectively, and are offset for clarity. Because results among triplicate time courses of *Streptomyces ambofaciens* NBRC 12836<sup>T</sup> differed, each assay is separately presented. *Amycolatopsis orientalis* NBRC 12806<sup>T</sup> increased COS to 2861 ± 954 pptv in 3 days.

Primer

|   |   |   |    |
|---|---|---|----|
| <i>T. thioparus</i> TH1115 (COSase) (372558276)   | 1 | -----MEKSNIDALENNRLYAGGOATHRPG---HPGMPQIQ--PSRRVAIVACMDARD--VEDLLGLQTE-----AHVIR                    | 66 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. TH1401   | 1 | -----MSVTDEYLVNNEYAKTFS-----GFLPLP--PSKHVAIVACMDARD--LD--VYRILGLADGE-----AHVIR                      | 18 |
| <i>Mycobacterium obuense</i> UC1 (810923830) <sup>a)</sup>                                    | 1 | -----MSVTDEYLVNNEYAKTFS-----GFLPLP--PSKHVAIVACMDARD--LD--VYRILGLADGE-----AHVIR                      | 57 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. TH1402   | 1 | -----MSVTDEYLVNNEYAKTFS-----GFLPLP--PSKHVAIVACMDARD--LD--VYRILGLADGE-----AHVIR                      | 18 |
| <i>Mycobacterium rhodesiae</i> ATCC BAA-494 (491288636) <sup>a)</sup>                         | 1 | -----MSVTDEYLVNNEYAKTFS-----GFLPLP--PSKHVAIVACMDARD--LD--VYRILGLADGE-----AHVIR                      | 57 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. TH1403   | 1 | -----MSVTDEYLVNNEYAKTFS-----GFLPLP--PSKHVAIVACMDARD--LD--VYRILGLADGE-----AHVIR                      | 18 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. TH1404   | 1 | -----MSVTDEYLVNNEYAKTFS-----GFLPLP--PSKHVAIVACMDARD--LD--VYRILGLADGE-----AHVIR                      | 18 |
| <i>Mycobacterium phlei</i> DSM 43071 (489984060) <sup>a)</sup>                                | 1 | -----MSVTDEYLVNNEYAKTFS-----GFLPLP--PSKHVAIVACMDARD--LD--VYRILGLADGE-----AHVIR                      | 57 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. TH1405   | 1 | -----MSVTDEYLVNNEYAKTFS-----GFLPLP--PSKHVAIVACMDARD--LD--VYRILGLADGE-----AHVIR                      | 18 |
| <i>Mycobacterium rhodesiae</i> NBB3 (503978052) <sup>a)</sup>                                 | 1 | -----MSVTDEYLVNNEYAKTFS-----GFLPLP--PSKHVAIVACMDARD--LD--VYRILGLADGE-----AHVIR                      | 57 |
| <i>Williamsia</i> sp. TH1410  | 1 | -----MSVTDEYLVNNEYAKTFS-----GFLPLP--PSKHVAIVACMDARD--LD--VYRILGLADGE-----AHVIR                      | 18 |
| <i>Nocardia jiangxiensis</i> NBRC101359 (750548916) <sup>a)</sup>                             | 1 | -----MTVTDELLANNRYAQAQFS-----GFLPLP--PSKHVAIVACMDARD--LD--VYRILGLADGE-----AHVIR                     | 57 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ATCC27294 <sup>1</sup> (15608424) <sup>a)</sup>             | 1 | -----MTVTDDYLLANNVDYASGFK-----GFLPLP--PSKHVAIVACMDARD--LD--VYRILGLADGE-----AHVIR                    | 57 |
| <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> NBRC100330 <sup>1</sup> (2622705) <sup>b)</sup> | 1 | -----MRFVSMIKDLIRENODFR-----FRDLSDLKSPKLCITCDSRLIDLRLALGIRGD-----AKVIK                              | 61 |
| <i>Dietzia maris</i> NBRC 15801 <sup>1</sup> (1021689168) <sup>b)</sup>                       | 1 | -----MTVTDELEAAKAYQSDPFK-----GFLPLP--PSKHVAIVACMDARD--LD--VYRILGLADGE-----AHVIR                     | 58 |
| <i>Streptomyces ambofaciens</i> NBRC 12836 <sup>1</sup> (921183923) <sup>c)</sup>             | 1 | -----MTTSASIPAGSASAAATGDSVTDRLVEANRYATEFFAD-----AELAGR--PALQAIVACMDARD--VYALGLRNGD-----CHVIR        | 76 |
| <i>Streptomyces ambofaciens</i> NBRC 12836 <sup>1</sup> (917648564) <sup>c)</sup>             | 1 | -----MTSNVMMVMTSASIPAGSASAAATGDSVTDRLVEANRYATEFFAD-----AELAGR--PALQAIVACMDARD--VYALGLRNGD-----CHVIR | 83 |
| <i>Geodermatophilus obscurus</i> NBRC 13315 <sup>1</sup> (284066081) <sup>c)</sup>            | 1 | -----MSEIDRMLAANAERWAEFRF-----GSRDVR--FARRVAVACMDARD--LFPMLGLEVDG-----AHVIR                         | 57 |
| <i>Streptosporangium roseum</i> NBRC 3776 <sup>1</sup> (502657338) <sup>a)</sup>              | 1 | -----MSAFDLDLAANKEFAAFT-----HSALTGKAARGLAVTCDMSRID--PLGVFGLKPGD-----AKVIR                           | 58 |
| <i>Gordonia bronchialis</i> NBRC 16047 <sup>1</sup> (262086520) <sup>a)</sup>                 | 1 | -----MSVTDEYLVNNEYAKTFS-----GFLPLP--PSRRVAIVACMDARD--LD--VYRILGLADGE-----AHVIR                      | 57 |
| <i>Kitasatospora setae</i> NBRC 14216 <sup>1</sup> (503901279) <sup>a)</sup>                  | 1 | -----MAPAPG--PERPSETDRFVLNRSYAETFRD-----GGMDAR--FVRRVAVACMDARD--LFAALGLEGD-----AHVIR                | 67 |
| <i>Actinosynnema mirum</i> NBRC 14064 <sup>1</sup> (255918802) <sup>c)</sup>                  | 1 | -----MTAIDELLRNRELGNLIVP-----GDRSSPMPMQVITLTCDMSRID--VFEIFGLQGE-----AHVIR                           | 58 |
| <i>Amycolatopsis orientalis</i> NBRC 12806 <sup>1</sup> (511265535) <sup>c)</sup>             | 1 | -----GTLPLP--PAKHVAIVACMDARD--LFAALGLEGD-----AHVIR  | 57 |
| <i>Amycolatopsis orientalis</i> NBRC 12806 <sup>1</sup> (511270551) <sup>c)</sup>             | 1 | -----MTSIDVLLKRNQELGVDTP-----GDRSSPRLSHVTILTCMDARIR--VFEIFGLQGE-----AHVIR                           | 58 |
| <i>Amycolatopsis orientalis</i> NBRC 12806 <sup>1</sup> (739458976) <sup>c)</sup>             | 1 | -----MTSIDVLLKRNQELGVDTP-----GDRSSPRLSHVTILTCMDARIR--VFEIFGLQGE-----SHVIR                           | 58 |
| <i>Acidianus</i> sp. A1-3 (CS <sub>2</sub> hydrolase) (342239636)                             | 1 | -----MVSEYIDLEKRLDYALRR-----VKGIP--NNRRLVWLTCMDERVH--LEQSGLQPPD-----AHVIR                           | 57 |
| <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> G8 (CS <sub>2</sub> hydrolase) (523525295)               | 1 | -----MS-LKQQLSEDFEGHKWALRR-----QMGP--NNRRLVWLTCMDERVH--LEQSGLQPPD-----AHVIR                         | 60 |
| <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> S1p (CS <sub>2</sub> hydrolase) (523525297)              | 1 | -----MSTDKQETLHNVALSDHWQARR-----RYGPDGNNRSLVWLVACMDERIP--VDDALGIRGDR--GDHIVR                        | 67 |
| <i>Escherichia coli</i> JCM 20135 (Clade A) (47868320) <sup>a)</sup>                          | 1 | -----MKDITLINSNALWSKMLVEEDPG-----FFEKLAQAQPRFLWIGCSDSRVP--AERLTGLEPGE-----LTVHR                     | 64 |
| <i>Pisum sativum</i> (Clade B) (115471) <sup>a)</sup>   | 1 | -----TTSSSDGIPKSEASERIKTGLFHFKKDYKNP--ALYGLAKGQSPFPMFACSDSRVC--PSHVLDQFQGE-----AFVVR                | 74 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ATCC27294 <sup>1</sup> (Clade C) (614098999) <sup>a)</sup>  | 1 | -----MNPNTNPAWAKLKEGRVFRVAGRRPQSPQSVDRHRAAGQKPTAVIFGCADSRVA--AEIIFDQGLD-----MFVVR                   | 73 |

Primer

|  |    |   |     |
|--|----|---|-----|
| <i>T. thioparus</i> TH1115 (COSase) (372558276)                                  | 67 | NAGGVIN--EDAIRCLIIISH--HLLNTHETIILVHHTDCC--MLFTDDEPKKRAIO-----EETG          | 158 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. TH1401  | 19 | NAGGVIT--DDEIRSLAISO--RLGTREIILIHHTDCC--MLFTDDEPKKRAIO-----EETG             | 48  |
| <i>Mycobacterium obuense</i> UC1 (810923830)                                     | 58 | NAGGVIT--DDEIRSLAISO--RLGTREIILIHHTDCC--MLFTDDEPKKRAIO-----EETG             | 114 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. TH1402  | 19 | NAGGVIT--DDEIRSLAISO--RLGTREIILIHHTDCC--MLFTDDEPKKRAIO-----EETG             | 48  |
| <i>Mycobacterium rhodesiae</i> ATCC BAA-494 (491288636)                          | 58 | NAGGVIT--DDEIRSLAISO--RLGTREIILIHHTDCC--MLFTDDEPKKRAIO-----EETG             | 114 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. TH1403  | 19 | NAGGVIT--DDEIRSLAISO--RLGTREIILIHHTDCC--MLFTDDEPKKRAIO-----EETG             | 48  |
| <i>Mycobacterium</i> sp. TH1404  | 19 | NAGGVIT--DDEIRSLAISO--RLGTREIILIHHTDCC--MLFTDDEPKKRAIO-----EETG             | 48  |
| <i>Mycobacterium phlei</i> DSM 43071 (489984060)                                 | 58 | NAGGVIT--DDEIRSLAISO--RLGTREIILIHHTDCC--MLFTDDEPKKRAIO-----EETG             | 114 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. TH1405  | 19 | NAGGVIT--DDEIRSLAISO--RLGTREIILIHHTDCC--MLFTDDEPKKRAIO-----EETG             | 48  |
| <i>Mycobacterium rhodesiae</i> NBB3 (503978052)                                  | 58 | NAGGVIT--DDEIRSLAISO--RLGTREIILIHHTDCC--MLFTDDEPKKRAIO-----EETG             | 114 |
| <i>Williamsia</i> sp. TH1410   | 19 | NAGGVIT--DDEIRSLAISO--RLGTREIILIHHTDCC--MLFTDDEPKKRAIO-----EETG             | 48  |
| <i>Nocardia jiangxiensis</i> NBRC101359 (750548916)                              | 58 | NAGGVIT--DDEIRSLAISO--RLGTREIILIHHTDCC--MLFTDDEPKKRAIO-----EETG             | 114 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ATCC27294 <sup>1</sup> (15608424)              | 58 | NAGGVIT--DDEIRSLAISO--RLGTREIILIHHTDCC--MLFTDDEPKKRAIO-----EETG             | 114 |
| <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> NBRC100330 <sup>1</sup> (2622705)  | 62 | NAGNIVD--DGVIRSAVAI--YALGVNEIIVGHTDCC--MARLDEDLVSRMR--ELG                   | 121 |
| <i>Dietzia maris</i> NBRC 15801 <sup>1</sup> (1021689168)                        | 59 | NAGGVIT--DDVIRSLTISO--RLGTREIILIHHTDCC--MLFTDDEPKKRAIO-----EETG             | 115 |
| <i>Streptomyces ambofaciens</i> NBRC 12836 <sup>1</sup> (921183923)              | 77 | NAGGAVT--DDVIRSLTISO--RALGTRSVLVHHTDCC--METFLT--EERHELE--LEVG               | 132 |
| <i>Streptomyces ambofaciens</i> NBRC 12836 <sup>1</sup> (917648564)              | 84 | NAGGAVT--DDVIRSLTISO--RALGTRSVLVHHTDCC--METFLT--EERHELE--LEVG               | 139 |
| <i>Geodermatophilus obscurus</i> NBRC 13315 <sup>1</sup> (284066081)             | 58 | NAGGVIT--EDVIRSLTISO--HVLGTRRELVHHTDCC--LQATDDNSFADLVE--OATG                | 114 |
| <i>Streptosporangium roseum</i> NBRC 3776 <sup>1</sup> (502657338)               | 59 | NAGARVT--DDVIRSLTISO--YLLGVNRLVMPHTDCC--MAKSTDDVHALAA--OHG                  | 115 |
| <i>Gordonia bronchialis</i> NBRC 16047 <sup>1</sup> (262086520)                  | 58 | NAGGVIT--DDEIRSLAISO--RLGTREIILIHHTDCC--MLFTDDEPKKRAIO-----EETG             | 114 |
| <i>Kitasatospora setae</i> NBRC 14216 <sup>1</sup> (503901279)                   | 68 | NAGGVIT--DDAIRSLTISO--RALGTRSVLVHHTDCC--LGLLQI--EERHELE--ORPG               | 123 |
| <i>Actinosynnema mirum</i> NBRC 14064 <sup>1</sup> (255918802)                   | 59 | NAGGVIT--DDAIRSLAISO--RKLGTRELVHHTDCC--LELVTEDAFKDELE--TDSG                 | 115 |
| <i>Amycolatopsis orientalis</i> NBRC 12806 <sup>1</sup> (511265535)              | 58 | NAGGVIT--EDEIRSLAISO--RLGTREIILIHHTDCC--MLFTDDEPKKRAIO-----EETG             | 114 |
| <i>Amycolatopsis orientalis</i> NBRC 12806 <sup>1</sup> (511270551)              | 59 | NAGGVIT--DDAIRSLAISO--RKLGTRELVHHTDCC--LSMVTEDDFKDELE--AASG                 | 115 |
| <i>Amycolatopsis orientalis</i> NBRC 12806 <sup>1</sup> (739458976)              | 59 | NAGGVIT--DDAIRSLAISO--RKLGTRELVHHTDCC--LSMVTEDDFKDELE--AASG                 | 115 |
| <i>Acidianus</i> sp. A1-3 (CS <sub>2</sub> hydrolase) (342239636)                | 58 | NAGGITV--DDAIRSALTT--NFGTKEIIVVHTDCC--MLFTDDEPKKRAIO-----EETG               | 120 |
| <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> G8 (CS <sub>2</sub> hydrolase) (523525295)  | 61 | NAGGLIT--DDAIRSALTC--NFGTKEIIVVHTDCC--MMSAQTDTIVKALK--DKG                   | 123 |
| <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> S1p (CS <sub>2</sub> hydrolase) (523525297) | 68 | NAGGITV--DDAIRSALTC--NFGTKEIIVVHTDCC--MMSAQTDTIVKALK--DKG                   | 130 |
| <i>Escherichia coli</i> JCM 20135 (Clade A) (47868320)                           | 65 | NVANLVLI--HFDNLGCVQYAVDVEVEHIIICGHYCGGVQAAVNPGLGNNLWHLIRDRWFKHS--SLLE       | 136 |
| <i>Pisum sativum</i> (Clade B) (115471)  | 75 | NVANLVPPYDQAKYAGTCAAEYAVLHKLKSNLVVCHSACGGIKLSSPFDGYS--TDFIEEWKIG--LPAAKVKQA | 152 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ATCC27294 <sup>1</sup> (Clade C) (614098999)   | 74 | TAGHVID--SAAVLGSEYAV--TVNLVPLVVLGHDCGVAANLAALINDGTLGGYVVRVVERVAPS--VLLGR    | 143 |

Primer

|  |     |  |     |
|--|-----|--|-----|
| <i>T. thioparus</i> TH1115 (COSase) (372558276)                                  | 159 | RSDASTERI-----AADVRRRLSIIILNHFWLPTAGPDA--ITVRGFIVDVTGRLEEVSPGPMGGFG-----               | 219 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. TH1401  | 48  | -----WAAEAFGDL--DEDVROSRLRRIENSPFFVTKH--ESLRGFVFDVATGKLEAVTL-----                      | 163 |
| <i>Mycobacterium obuense</i> UC1 (810923830)                                     | 115 | WAAEAFGDL--DEDVROSRLRRIENSPFFVTKH--ESLRGFVFDVATGKLEAVTL-----                           | 163 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. TH1402  | 48  | -----WAAEAFGDL--DEDVROSRLRRIENSPFFVTKH--ESLRGFVFDVATGKLEAVTL-----                      | 163 |
| <i>Mycobacterium rhodesiae</i> ATCC BAA-494 (491288636)                          | 115 | WAAEAFGDL--DEDVROSRLRRIENSPFFVTKH--ESLRGFVFDVATGKLEAVTL-----                           | 163 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. TH1403  | 48  | -----WAAEAFGDL--DEDVROSRLRRIENSPFFVTKH--ESLRGFVFDVATGKLEAVTL-----                      | 163 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. TH1404  | 48  | -----WAAEAFGDL--DEDVROSRLRRIENSPFFVTKH--ESLRGFVFDVATGKLEAVTL-----                      | 163 |
| <i>Mycobacterium phlei</i> DSM 43071 (489984060)                                 | 115 | WAAEAFGDL--DEDVROSRLRRIENSPFFVTKH--ESLRGFVFDVATGKLEAVTL-----                           | 163 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. TH1405  | 48  | -----WAAEAFGDL--DEDVROSRLRRIENSPFFVTKH--ESLRGFVFDVATGKLEAVTL-----                      | 163 |
| <i>Mycobacterium rhodesiae</i> NBB3 (503978052)                                  | 115 | WAAEAFGDL--DEDVROSRLRRIENSPFFVTKH--ESLRGFVFDVATGKLEAVTL-----                           | 163 |
| <i>Williamsia</i> sp. TH1410   | 48  | -----WAAEAFGDL--DEDVROSRLRRIENSPFFVTKH--ESLRGFVFDVATGKLEAVTL-----                      | 163 |
| <i>Nocardia jiangxiensis</i> NBRC101359 (750548916)                              | 115 | WAAEAFGDL--DEDVROSRLRRIENSPFFVTKH--ESLRGFVFDVATGKLEAVTL-----                           | 163 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ATCC27294 <sup>1</sup> (15608424)              | 115 | WSPESYPDA--VEDVROSRLRRIENSPFFVTKH--ESLRGFVFDVATGKLEAVTL-----                           | 163 |
| <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> NBRC100330 <sup>1</sup> (2622705)  | 122 | FSIDVLPVPGD--EENVEICVYKRLKSSLP--IGVHGLIIDINTGRLKPLYLDED-----                           | 176 |
| <i>Dietzia maris</i> NBRC 15801 <sup>1</sup> (1021689168)                        | 116 | WAPESFPEP--EADVROSIRARVESDFPFLHS--TAVRGVFVDSVTEGLREVQREE-----                          | 166 |
| <i>Streptomyces ambofaciens</i> NBRC 12836 <sup>1</sup> (921183923)              | 133 | WAVSFRDV--DQDVROSIRQRVTSFPFLPH--DDVRFVFDVATGKLEAVTL-----                               | 182 |
| <i>Streptomyces ambofaciens</i> NBRC 12836 <sup>1</sup> (917648564)              | 140 | WAVSFRDV--DQDVROSIRQRVTSFPFLPH--DDVRFVFDVATGKLEAVTL-----                               | 189 |
| <i>Geodermatophilus obscurus</i> NBRC 13315 <sup>1</sup> (284066081)             | 115 | WAVRARDA--DEDVRESMRLIHESVPLLSH--EVRGSVYDVATGKLEAVTL-----                               | 164 |
| <i>Streptosporangium roseum</i> NBRC 3776 <sup>1</sup> (502657338)               | 116 | LDVHTVDPD--DAALRHDLTRIRTSFPFLPH--LAIAGAVDVHTGKMPVEL-----                               | 164 |
| <i>Gordonia bronchialis</i> NBRC 16047 <sup>1</sup> (262086520)                  | 115 | WAAEFTDL--DEDVROSRLRRIENSPFFVTKH--ESLRGFVFDVATGKLEAVTL-----                            | 163 |
| <i>Kitasatospora setae</i> NBRC 14216 <sup>1</sup> (503901279)                   | 124 | WAVSFTDL--DADVROSIRQRVTSFPFLPH--DDVRFVFDVATGKLEAVTL-----                               | 171 |
| <i>Actinosynnema mirum</i> NBRC 14064 <sup>1</sup> (255918802)                   | 116 | WVSEAFREV--KDSVRSVNRVRSVFPFLPH--DTRGVFVVDVATGKLEAVTL-----                              | 163 |
| <i>Amycolatopsis orientalis</i> NBRC 12806 <sup>1</sup> (511265535)              | 115 | WAAEAFGDL--DEDVROSIRQRVTSFPFLPH--DDVRFVFDVATGKLEAVTL-----                              | 163 |
| <i>Amycolatopsis orientalis</i> NBRC 12806 <sup>1</sup> (511270551)              | 116 | WVSEAFREV--KDSVRSVNRVRSVFPFLPH--DTRGVFVVDVATGKLEAVTL-----                              | 163 |
| <i>Amycolatopsis orientalis</i> NBRC 12806 <sup>1</sup> (739458976)              | 116 | WVSEAFREV--KDSVRSVNRVRSVFPFLPH--DTRGVFVVDVATGKLEAVTL-----                              | 163 |
| <i>Acidianus</i> sp. A1-3 (CS <sub>2</sub> hydrolase) (342239636)                | 121 | LPARFISSEDFDKWFKFYEDLVGKSPEDMALKGVLELHRLNLPKPD--VRIITYGVVEVTHRLRKNQNIYM--ETSKFEHGTIVKE | 204 |
| <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> G8 (CS <sub>2</sub> hydrolase) (523525295)  | 124 | LPETLQKAG--MFGKWKMYQDVE--DTCARQVEYMRNHLIPKH--VTSISGWVETVTHRLRPPHRTCEKVNNT--KAMGAK      | 199 |
| <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> S1p (CS <sub>2</sub> hydrolase) (523525297) | 131 | LPETLQKAG--MFGKWKMYQDVE--DTCARQVEYMRNHLIPKH--VTSISGWVETVTHRLRPPHRTCEKVNNT--KAMGAK      | 199 |
| <i>Escherichia coli</i> JCM 20135 (Clade A) (47868320)                           | 137 | MPEERLDT--LCELNVQVYNLNGHSTIQMSAMKRGQVITHWAGYIHDGLRLDLDVATNRETLREQRYRHGINSNLKLNKHNK     | 220 |
| <i>Pisum sativum</i> (Clade B) (115471)  | 153 | HGDAPAEELCT--HCEKAVNASIGLNLLTYFVVRG--LVNKTALKGGYDFVKSFEWGLFGLSSTFSV--                  | 221 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ATCC27294 <sup>1</sup> (Clade C) (614098999)   | 144 | DGLSRVDEF--EQRHVEVTAALMARSAISERIAAGSLAIVGVTYQLDGRVLRDIGNIGEEV--                        | 207 |

Fig. 3-2. Multiple alignment of amino acid sequences deduced from partial nucleotide sequences of *Mycobacterium* spp. THI401-THI405 and *Williamsia* sp. THI410 with  $\beta$ -CA, COSase and CS<sub>2</sub> hydrolase. The alignment was constructed using ClustalW with MEGA6 (Tamura *et al.* 2013) and showed using GENETYX-MAC ver. 17 (GENETYX, Tokyo, Japan). The residues to be identical in more than 50% are shown in grey background. All proteins, except as otherwise noted, are clade D of  $\beta$ -CA. The secondary structure of COSase is shown above the alignment. Closed stars show the zinc binding residues and the residues stabilizing the water molecule that occupies the fourth coordination site of COSase (Chapter 2). Open stars show the FF motif that is specific to CS<sub>2</sub> hydrolase. The amino acid sequences of COSase used for the design of the degenerate PCR primers are surrounded by a broken line. Arrows show the PCR primer regions. The accession number of each sequence is shown by NCBI GI number in parentheses.

<sup>a)</sup> Amino acid sequences of  $\beta$ -CA just below each THI401-THI405 and THI410 are those suggesting the highest relatedness by results of NCBI BLASTP search: for example, *Mycobacterium obuense* UC1 for THI401.

<sup>b)</sup>  $\beta$ -CAs reported their characteristics such as CA activity and X-ray crystal structure in detail.

<sup>c)</sup> Included in this figure, because Clade D of  $\beta$ -CA was found in the genome databases of actinomycetes used here.

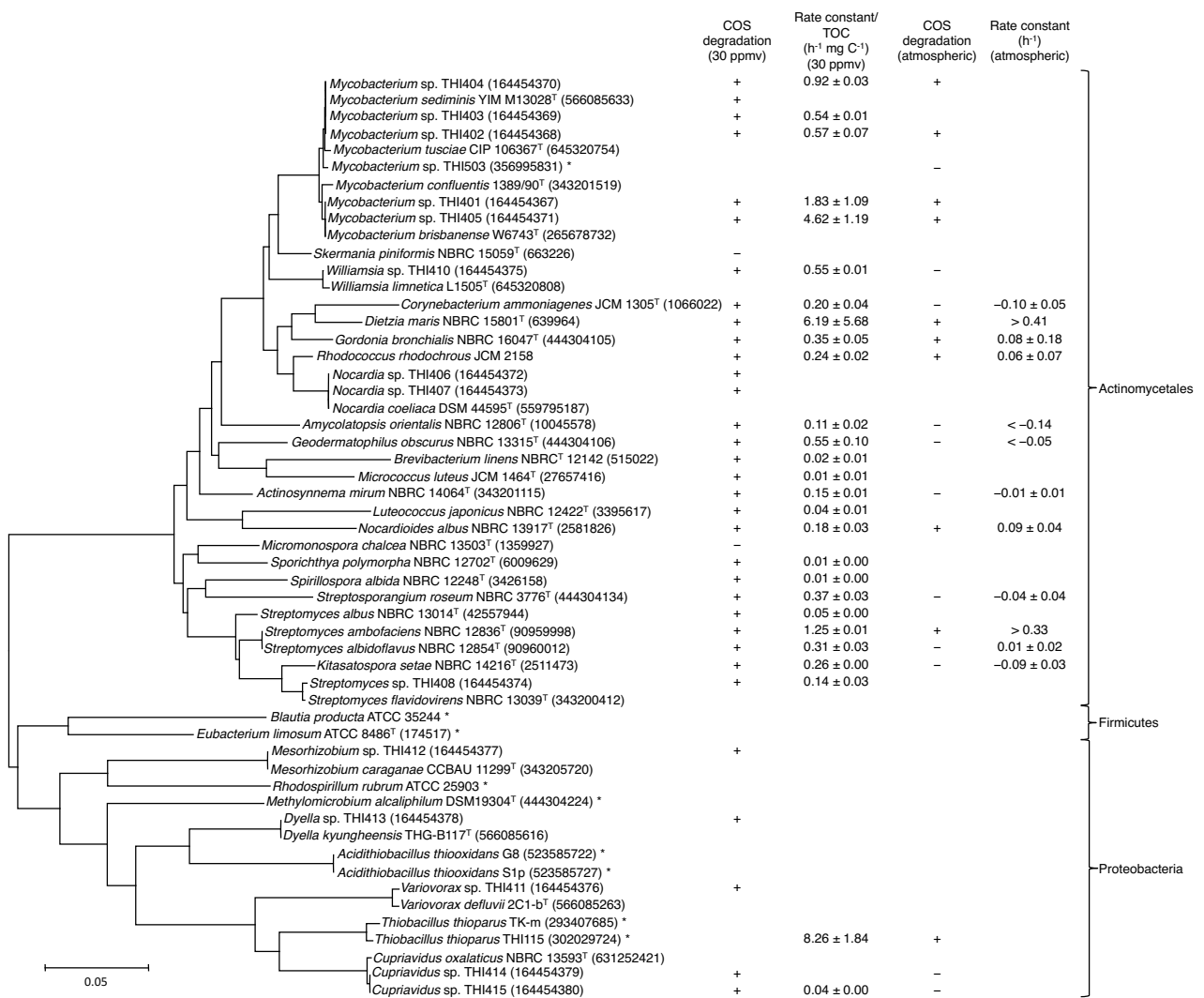


Fig. 3-3. The relationship of COS degradation activity and bacterial phylogenetic position based on 16S rRNA gene of bacteria used in this study. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method with MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). *Nocardia* sp. THI406, *Nocardia* sp. THI407, *Variovorax* sp. THI411, *Mesorhizobium* sp. THI412 and *Dyella* sp. THI413 are COS degrading bacteria isolated in the research of Kato *et al.* (2008) and their phylogeny was determined. Bacteria that phylogenetically related to isolates by Kato *et al.* (2008) are also shown in the phylogenetic tree. Bacteria marked with asterisks are known as COS degrading bacteria (Smith and Kelly 1988; Smith *et al.*, 1991; Katayama *et al.*, 1993; Kusumi *et al.*, 2011; Smeulders *et al.*, 2013). The accession numbers of 16S rRNA gene sequence data are shown by NCBI GI number in parentheses. Due to the lack of 16S rRNA gene sequence data, 16S rRNA genes of *Blautia producta* JCM 1471<sup>T</sup> (GI: 631252072), *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170<sup>T</sup> (GI: 444303827) and *Rhodococcus rhodochrous* DSM 43241<sup>T</sup> (GI: 640003) were used from the data of *Blautia producta* ATCC35244, *Rhodospirillum rubrum* ATCC 25903 and *Rhodococcus rhodochrous* JCM 2158, respectively. *Blautia producta* ATCC35244 was formerly

classified as *Peptostreptococcus productus* strain U-1 in the research of Smith *et al.* (1991).

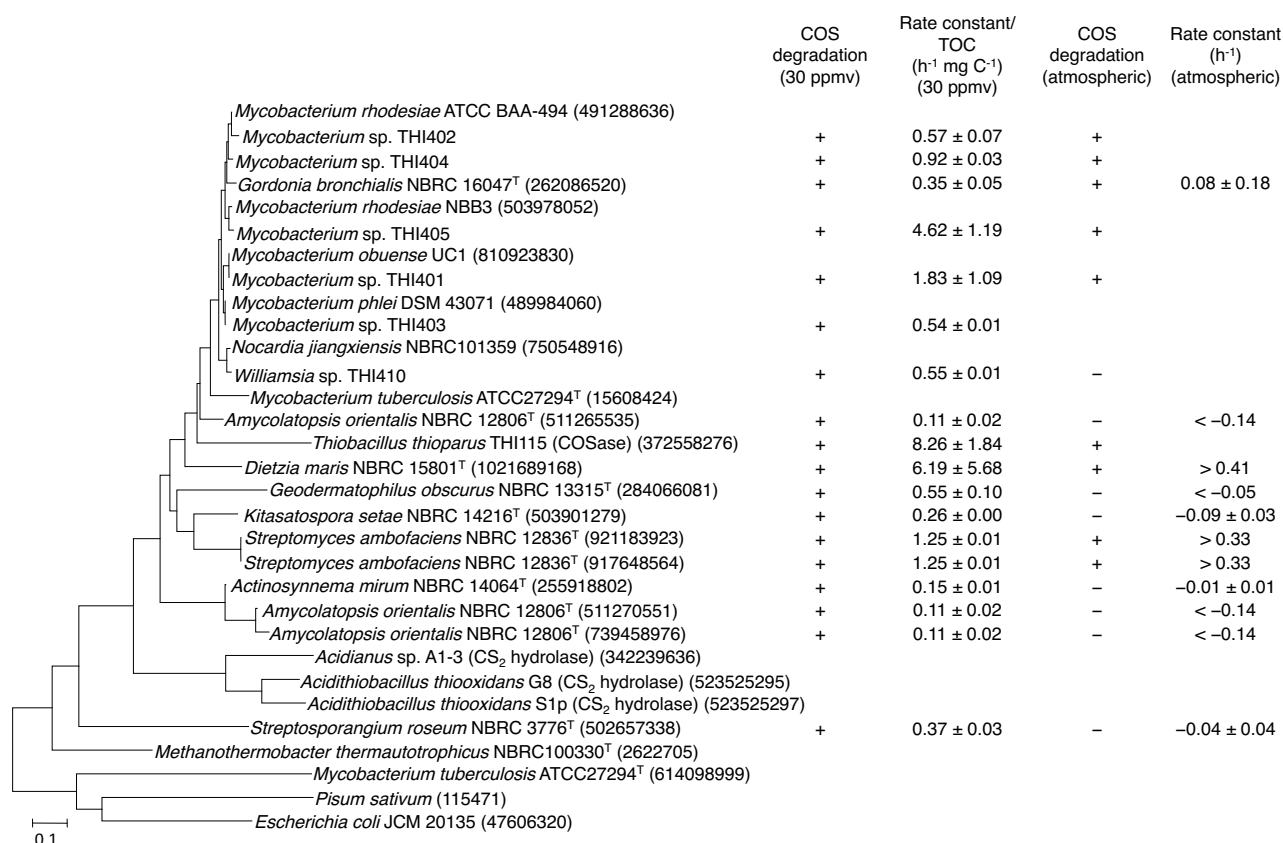


Fig. 3-4. Phylogenetic tree based on amino acid sequences of  $\beta$ -CA, COSase and CS<sub>2</sub> hydrolase and their relation to the COS degrading activity. Enzyme proteins illustrated in Fig. 3-2 were used to construct the phylogenetic tree using the neighbor-joining method with MEGA6 (Tamura *et al.* 2013).

## 第4章 COSase 及び *T. thioparus* THI115 株の COS 分解に伴う硫黄の同位体分別

### 4-1 はじめに

第1章で記した通り、COSの発生源や消失源に関する研究から、地球規模のCOSの循環を把握することが試みられている。しかし、最新の研究においても、見積もられる発生源や消失量のばらつきは大きく、例えば、土壌の消失量では $255\sim 770\text{ Gg S yr}^{-1}$ と推定されている (Launois *et al.*, 2015)。これらの見積もりは、個々の発生源、消失源からのCOSの発生速度、消失速度を地球規模でも同じように生じているものと仮定して行なわれている。一方、このような大気微量成分の動態を把握する手段として、同位体分別の利用が注目されている (Johnson *et al.*, 2002, Brenninkmeijer *et al.*, 2003)。これは、様々な環境から採取されたCOSの同位体比と、COSの発生あるいは消失に関わる反応で生じる同位体分別を利用して、地球規模のCOSの動態を推定する方法である。

これまでに、生物地球化学的な反応に関係する酵素を用いた同位体分別の研究は、光合成に関わる RuBisCO (Park and Epstein, 1960)、光呼吸に関わる glycolate oxidase (Guy *et al.*, 1993)、脱窒に関わる nitrate reductase (Karsh *et al.*, 2012) 及び nitric oxide reductase (Yamazaki *et al.*, 2014)、硝化に関わる hydroxylamine oxidoreductase (Yamazaki *et al.*, 2014)、窒素固定に関わる nitrogenase (Sra *et al.*, 2004)、アンモニア同化に関わる glutamate dehydrogenase (Weiss *et al.*, 1988) 及び glutamine synthetase (Yoneyama *et al.*, 1993) がある。硫黄の場合は、硫酸還元菌による硫酸還元反応の酵素である、dissimilatory sulfite reductase (DsrAB) のみ知られている (Leavitt *et al.*, 2015)。その他、生物地球化学的な反応ではないが、硫黄に関わる酵素として唯一、除草剤 ametryn の分解酵素である *s*-triazine hydrolase (TrzN) が研究されている (Schürner *et al.*, 2015)。一方、硫黄酸化細菌に関しては、分離菌を中心として、元素硫黄や硫黄を含む化合物の酸化反応における、同位体分別に関して研究されているものの [Jones and Starkey, 1957; Kaplan and Rafter, 1958; Kaplan and Rittenberg, 1962, 1964; Nakai and Jensen, 1964; Kondrat'eva, Mekhtieva and Sumarokova, 1966 (Zerkle *et al.* (2009) によって引用された); Mekhtieva and Kondrat'eva, 1966 (Chambers and Trudinger (1979) 及び Zerkle *et al.* (2009) によって引用された); Ivanov *et al.*, 1976 (Chambers and Trudinger (1979) 及び Zerkle *et al.* (2009) によって引用された); Chambers and Trudinger, 1979; McCready and Krouse, 1982; Fry *et al.*, 1984, 1985, 1986, 1988; Taylor *et al.*, 1984; Habicht *et al.*, 1998; Zerkle *et al.*, 2009; Kamezaki *et al.*, 2016]、硫黄酸化に関わる酵素の同位体分別の研究は行なわれていない。

これまでに、COSの同位体分別については、COSの光分解 (Hattori *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2013)、及びラジカル [ $\cdot\text{OH}$  及び  $\text{O}(\text{}^3\text{P})$ ] との反応 (Danielache *et al.*, 2008; Hattori *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2013) に関して研究が行なわれているものの、主要な消失源である、植物や土壌によるCOS分解を対象とした研究はなかった。その理由として、同位体分別の測定には、COSが数 $\mu\text{mol}$ 必要であったためである。しかし、近年、数 $\text{nmol}$ のCOSを用いて同位体比を測定できる、ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計 (GC-IRMS) が開発され (Hattori *et al.*, 2015)、初めてCOS分解細菌による、COS分解に

における硫黄の同位体分別の研究が行なわれた (Kamezaki *et al.*, 2016)。

Kamezaki *et al.* (2016) は、加藤により土壌から分離された、7 菌株の従属栄養性の COS 分解細菌 (Kato *et al.*, 2008) を用いて、4,000 ppmv の COS の分解実験を行ない、7 菌株全てにおいて、 $\text{CO}^{34}\text{S}$  よりも  $\text{CO}^{32}\text{S}$  を優先して分解することを明らかにした。そして、その同位体分別定数 ( $^{34}\epsilon$ ) は、*Mycobacterium* spp. 4 菌株が $-3.99\sim-3.56\%$ 、*Williamsia* sp. THI410 株が $-3.74\%$ 、*Cupriavidus* spp. 2 菌株が $-2.38\sim-2.09\%$ であり、細菌の属レベルで  $^{34}\epsilon$  値が異なる可能性を示した。しかしながら、微生物による  $^{34}\epsilon$  値は、同じ反応であっても用いた電子供与体の違いのような、実験条件の違いや、反復実験間で変動する例が知られており (Kaplan and Rittenberg, 1964; Zerkle *et al.*, 2009)、実際の大气のような pptv レベルの COS 濃度でも、同じような同位体分別が生じるかは不明である。同位体比測定を行なう上での技術的な制約から、現状では、大气濃度の COS を用いた同位体比測定の実験は、不可能ではあるが、同位体分別の詳細なメカニズムを理解することは、微生物による大气濃度の COS 分解における、同位体分別を推定する上で重要である。そこで、本研究では、2 章で基質特異性や X 線結晶構造を明らかにした COSase、並びに *T. thioparus* THI115 株の菌体を用いて、同位体分別定数を決定し、同位体分別のメカニズムを明らかにすることを目的とした。



## 4-2 材料と方法

### 4-2-1 COSase の精製

小川 (2005) による方法を用いて、組換え型 COSase の精製を行なった。ただし、グルタチオンセファロース 4B (GE ヘルスケア) に吸着させた GST 融合 COSase を、Factor Xa Cleavage/Capture Buffer (メルクミリポア) によって、遠心後に菌体残渣を目視で確認できなくなるまで洗浄した。また、HiTrap Q HP カラム (GE ヘルスケア) で精製する前に、0.45  $\mu\text{m}$  孔径のメンブレンフィルター (Millex-HV Durapore PVDF membrane、メルクミリポア) により酵素溶液を濾過し、グルタチオンセファロース 4B や Xarrest Agarose (メルクミリポア) を完全に除去した。

### 4-2-2 COSase による COS 分解実験

68 mL 容バイアル瓶 (V-50、日電理化硝子) にブチル栓 (アネロビックストッパー、神田ゴム化学) で蓋をし、 $\text{N}_2$  ガス (99.999%、市村酸素) を充填した。10.4% の COS 標準気体 (Balance gas:  $\text{N}_2$ 、日酸 TANAKA) を、ガスタイトマイクロシリンジで 3.43 mL 採取し、バイアル瓶に添加して、およそ 5,000 ppmv の COS を調製した。シリンジ針を刺して内圧を大気圧にさせた後、50  $\mu\text{g}$  の組換え型 COSase を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) 2 mL を添加し、30  $^{\circ}\text{C}$  で反応させた。コントロールとして、酵素を含まない 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) 2 mL も同様に行なった。COSase は 3 連、コントロールは 2 連で行なった。添加直後は、気相の COS 濃度が乱れるため、添加後 5 分から経時的にガスタイトマイクロシリンジを用いて、気相をサンプリングした。COS 濃度は、COS の濃度に応じて 30  $\mu\text{L}$  又は 50  $\mu\text{L}$  を採取し、それを直接 GC-FPD に注入し、4-2-5 の方法によって測定した。一方、同位体比の測定に関しては、COS の濃度に応じて 1 mL、2 mL 又は 3 mL をサンプリングし、He (>99.99995%、太陽日本酸素) を充填した 5 mL 容バイアル瓶 (V-5B、日電理化硝子) に添加し、後日 GC-IRMS による測定を行なった。

### 4-2-3 *T. thioparus* THI115 株の培養

500 mL 容坂口フラスコへ入れた、10 / 9 倍濃度の mTC10 培地 (Table 2-1) 90 mL に、定常期に達している *T. thioparus* THI115 株の菌液 10 mL を接種し、120 rpm、30  $^{\circ}\text{C}$  で往復振盪しながら 2 日間培養を行なった。2-1-2-2 の方法により、SCN<sup>-</sup> が全て分解されたことを確認後、菌液 1 白金耳を、試験管 (長さ 20 cm、内径 2 cm) 内の mTC10 スラント培地上に接種し、30  $^{\circ}\text{C}$  で静置培養した。培養 25 日後、定常期に達していると目視で判断し、4-2-4 に記載の方法で COS 分解実験を行なった。

### 4-2-4 *T. thioparus* THI115 株による COS 分解実験

定常期まで成長した、*T. thioparus* THI115 株の COS 分解実験を行なうため、スラント培地上で培養を行なってきた試験管のシリコ栓を、ブチル W 栓 (W-21、太陽興業) に交換後、気相を純空気 (グレード G3、市村酸素) と液化炭酸ガス (市村酸素) を用いて、80%  $\text{N}_2$ 、20%  $\text{O}_2$ 、0.03%  $\text{CO}_2$  に置換した。そこ

へ 10.4%の COS 標準気体 (Balance gas: N<sub>2</sub>, 日酸 TANAKA) を、ガスタイトマイクロシリンジを用いて、およそ 4,000 ppmv の COS になるように添加し、30 °C で COS を分解させた。添加直後は、気相の COS 濃度が乱れるため、添加後 20 分以降から経時的に、ガスタイトマイクロシリンジを用いて気相をサンプリングした。COS 濃度測定用に採取した 20 μL の気相は、直接 GC-FPD に注入し、4-2-5 の方法によって測定した。一方、同位体比の測定に関しては、1 mL をサンプリングし、4-2-2 の方法と同様に作製した、He 充填した 5 mL 容バイアル瓶に添加し、後日 GC-IRMS による測定を行なった。COS の初期濃度の 70%程度が分解された時点で分解実験を終了し、スラント上の細菌数を 4-2-7 の方法によって計数した。COS 分解反応は、指数近似曲線  $C(t) = C_0 e^{-kt}$  として近似され、速度定数  $k$  (h<sup>-1</sup>) を求めた。ここで、 $C(t)$  は  $t$  (h) における COS の濃度を示し、 $C_0$  は COS の初期濃度を示す。

#### 4-2-5 COS の定量

COS の定量は、2-2-2-1 の方法と同様にして行なった。ただし、カラムの温度を 190 °C ではなく、60 °C に変更した。COS 濃度の相対標準偏差は 3%以内であった。

#### 4-2-6 COSase の安定同位体分別の測定

Hattori *et al.* (2015) によって開発された GC-IRMS により、COS の硫黄の同位体比を測定した。簡潔に述べると、5A モレキュラーシーブ (シグマ アルドリッチ) によって精製された He (>99.99995%、太陽日本酸素) を、1.5 L min<sup>-1</sup> の流速でキャリアーガスとして用いた。上記の COS 分解実験で採取した気相を含むバイアル瓶から、COS が 8 nmol 以上になるように、ガスタイトマイクロシリンジで採取し、preconcentration line に注入した。液体窒素で冷却したステンレススチールチューブ (長さ 150 mm、内径 10.5 mm) に COS をトラップ後、室温に戻すことで脱着させ、それを液体窒素で冷却したキャピラリーチューブにトラップさせた。その後、液体窒素を除去し、脱着した COS を、キャピラリーカラム (長さ 30 m、内径 0.32 mm、厚さ 10 μm、HP-PLOT Q、アジレントテクノロジー) を装着した GC、さらに IRMS (MAT253、サーモフィッシャーサイエンティフィック) へ導入して、フラグメントイオン <sup>32</sup>S<sup>+</sup>、<sup>33</sup>S<sup>+</sup>、<sup>34</sup>S<sup>+</sup> を測定し、同位体比を算出した。およそ 11 ppmv の COS 標準気体 (ジャパンファインプロダクツ) が、同位体比測定の精度を確認するために、3 連で測定された。 $\delta^{33}\text{S}$ 、 $\delta^{34}\text{S}$ 、 $\Delta^{33}\text{S}$  の標準偏差は、COSase の実験で、それぞれ 0.1‰、*T. thioparus* THI115 株の実験で、それぞれ 0.6‰、0.3‰、0.5‰であった。

#### 4-2-7 *T. thioparus* THI115 株の計数

生細胞及び死細胞の計数には、LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit for microscopy (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いた。初めに、スラント上の菌体を 0.85% NaCl 10 mL で懸濁、回収し、10,000 × g、15 分遠心してペレットを得た。2 回 0.85% NaCl 10 mL で菌体洗浄後、再度 10 mL で懸濁させた。希釈後、菌液 1 mL に対して Live/Dead 試薬 3 μL を加え、15 分反応させた。0.01%ポリ-L-

リジン (P8920、シグマ アルドリッチ) で処理した、直径 25 mm の孔径 0.2  $\mu\text{m}$  ポリカーボネートブラックフィルター (K020N025A、アドバンテック) で濾過し、菌体を回収後、蛍光顕微鏡 (BZ-8000、KEYENCE) により計数した。

#### 4-2-8 同位体の定義

$^{33}\text{S}$  と  $^{34}\text{S}$  の同位体は、 $\delta$  値として次のように示される。

$$\delta^x\text{S} = R_{\text{sample}} / R_{\text{reference}} - 1$$

ここで  $R_{\text{sample}}$  及び  $R_{\text{reference}}$  は、ある時間における残存 COS 及び初期の COS の同位体比 [ $^x\text{S} / ^{32}\text{S}$  ( $x$  は 33 又は 34)] である。さらに  $\Delta^{33}\text{S}$  は、質量依存的分別 [mass-dependent fractionation (MDF)] と、質量非依存的分別 [mass-independent fractionation あるいは non-mass-dependent fractionation (MIF)] を区別するために用いられ、MDF からの偏差として、次のように求められる。

$$\Delta^{33}\text{S} = \delta^{33}\text{S} - [(\delta^{34}\text{S} + 1)^{0.515} - 1]$$

同位体分別ファクター  $\alpha$  は、 $\alpha = ^xk / ^{32}k$  ( $x$  は 33 又は 34、 $k$  は速度定数) として表される。同位体分別定数  $^x\varepsilon$  ( $x$  は 33 又は 34) は、 $^x\varepsilon = (x\alpha - 1)$  として表され、Mariotti *et al.* (1981) によって定義されたように、次に示されるレイリー式から求められる。

$$\delta^x\text{S} - \delta^x\text{S}_{\text{initial}} = ^x\varepsilon \ln f$$

ここで  $f$  は、ある時間における COS 濃度を初期の COS 濃度で割った値である。MIF は、MDF からの偏差として、次の式によって示され、MDF の法則によって  $^{33}\text{S}$  ( $^{33}E$ ) として定められる (Bigeleisen and Mayer, 1947; Hulston and Thode, 1965)。

$$^{33}E = ^{33}\varepsilon - 0.515 ^{34}\varepsilon$$

#### 4-2-9 統計分析

速度定数  $k$  は、エクセル (for Mac 2011、version 14.7.2、Microsoft) の SLOPE 関数を用いて算出した。 $\varepsilon$  値と  $^{33}E$  値の統計分析は、フリーソフト R (version 3.4.1)(R Core Team, 2017) を用いて行なった。レイリー式において、縦軸を  $\delta^x\text{S} - \delta^x\text{S}_{\text{initial}}$ 、横軸を  $\ln f$  とした時の傾きが  $\varepsilon$  値となり、 $\varepsilon$  値とその標準偏差及び  $P$  値の算出は、原点を通る最小二乗法によって求まり、R の summary 関数を用いて行なった。COSase と *T. thioparus* THI115 株の  $\varepsilon$  値の比較は、R の t.test 関数を用いて  $t$  検定により行なった。 $P$  値が  $<0.05$  の時に、有意に差があるものとした。

### 4-3 結果

COSaseによるCOS分解の速度定数は、 $0.79 \pm 0.10 \text{ h}^{-1}$  ( $r^2 = 1.00$ ) となり、本実験のCOS濃度範囲では、一次反応であることが示された (Fig. 4-1A、Table 4-1)。コントロールでは、COSのわずかな変動が見られたが、 $\text{H}_2\text{S}$ は検出されなかった [ $< 7 \text{ ppmv}$  (検出限界値)] ことから、化学的な加水分解によるCOS分解は、ないものと判断した。COSaseは、 $\text{CO}^{33}\text{S}$ や $\text{CO}^{34}\text{S}$ よりも $\text{CO}^{32}\text{S}$ を優先して分解し、 $^{33}\epsilon$ 値及び $^{34}\epsilon$ 値は、それぞれ $-1.0 \pm 0.1\%$ 及び $-2.2 \pm 0.2\%$ であった (Fig. 4-1B、4-1C、Table 4-1)。

*T. thioparus* THI115株によるCOS分解の速度定数は、 $0.33 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$  ( $r^2 \geq 0.94$ ) となり、COSaseと同様に1次反応であることが示された (Fig. 4-1D、Table 4-1)。コントロールではCOSの変動が見られたが、COSaseの場合と同様に $\text{H}_2\text{S}$ は検出されず [ $< 10 \text{ ppmv}$  (検出限界値)]、化学的な加水分解によるCOS分解はないものと判断した。スラント培地上に生育した*T. thioparus* THI115株の細菌数は、COS添加区で生菌数 $4.7 \times 10^9$ 、 $2.0 \times 10^9 \text{ cells tube}^{-1}$ 、死菌数 $4.8 \times 10^9$ 、 $1.3 \times 10^9 \text{ cells tube}^{-1}$ 、COS無添加区で生菌数 $3.1 \times 10^9$ 、 $3.2 \times 10^9 \text{ cells tube}^{-1}$ 、死菌数 $0.81 \times 10^9$ 、 $1.8 \times 10^9 \text{ cells tube}^{-1}$ となり、顕微鏡観察で確認した限りでは、本実験に使用した濃度のCOSの添加は、菌体の生存に悪影響を及ぼしていないことが示された (Table 4-1)。*T. thioparus* THI115株の生菌当たりのCOS分解速度定数は、 $0.76 \sim 1.51 \times 10^{-10} \text{ h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$ であった (Table 4-1)。COSaseの場合と同様に、*T. thioparus* THI115株においても、 $\text{CO}^{33}\text{S}$ や $\text{CO}^{34}\text{S}$ よりも $\text{CO}^{32}\text{S}$ を優先して分解し、 $^{33}\epsilon$ 値及び $^{34}\epsilon$ 値は、それぞれ $-1.8 \pm 0.6\%$ 及び $-3.6 \pm 0.7\%$ であった (Fig. 4-1E、4-1F、Table 4-1)。

COSaseと*T. thioparus* THI115株間の $^{33}\epsilon$ 及び $^{34}\epsilon$ 値のP値は、0.08及び0.03となり、 $^{34}\epsilon$ のみ有意な差となった (Table 4-1)。しかし、スリーアイソトーププロットによる傾きは、 $0.43 \sim 0.56$ であり (Fig. 4-2)、MDFを示す傾き0.515に比較的近い値を示した。さらに、 $^{33}\epsilon$ 値は、COSaseで $0.1 \pm 0.1\%$ 、*T. thioparus* THI115株で $0.1 \pm 0.2\%$ となり、ほぼ0%であることから、COSase及び*T. thioparus* THI115株によるCOS分解は、MDFによる反応と考えられた (Table 4-1)。

#### 4-4 考察

COSase 及び *T. thioparus* THI115 株による COS 分解は、本実験において一次反応を示した。COS は、化学的に加水分解することが知られているが (Ferm, 1957; Elliott *et al.*, 1989)、コントロールとして設定した酵素なし、あるいは無菌区では、COS 濃度にばらつきは見られたものの、加水分解の生成物である H<sub>2</sub>S は検出されず、化学的な加水分解は、検出されるレベルでは生じていなかった。COS 濃度のばらつきは、GC-FPD の測定による相対標準偏差からも説明がつかず、その原因は不明ではあるが、コントロールと比べて COSase や *T. thioparus* THI115 株は、明らかに早く COS を分解していることから、本研究では、このばらつきは同位体分別の決定に影響しないものと考えた。

これまでに明らかにされている硫黄に関する酵素の同位体分別は、DsrAB と TrzN のみである (Leavitt *et al.*, 2015; Schürner *et al.*, 2015)。 *Desulfovibrio vulgaris* と *Archaeoglobus fulgidus* の DsrAB の <sup>34</sup>ε 値は、それぞれ -15.3‰、-16‰ である。 *Arthrobacter aureescens* の TrzN による、ametryn のチオメチル基のヒドロキシ基への置換による <sup>34</sup>ε 値は、-14.7‰ であることから、これらと比べて COSase の <sup>34</sup>ε 値は、低いことが明らかになった。TrzN と α-CA の X 線結晶構造は、全体的には異なるものの、活性部位について比較すると、両者は互いに類似している (Seffernick *et al.*, 2010)。また、COS 分解活性は大きく異なるが、COSase を含む β-CA も、活性部位は α-CA に類似している (Kimber and Pai, 2000; Haritos and Dojchinov, 2005; Ogée *et al.*, 2016)。さらに、TrzN の基質である ametryn と、COSase の基質である COS は、全く異なる化合物ではあるが、両酵素は共通した分解メカニズム、つまり、活性部位に存在する亜鉛に配位する、ヒドロキシイオンによる炭素への求核攻撃と、その後の C-S 結合の解離によって基質が分解される (Fig. 2-17; Schürner *et al.*, 2015)。Schürner *et al.* (2015) は、TrzN による ametryn の C-S 結合の解離は、大きな同位体分別を示し、この素反応が律速段階であるため、ametryn の分解による硫黄の同位体分別が大きくなると提案している。一方、α-CA の活性部位を模したモデル化合物 [(H<sub>3</sub>N)<sub>3</sub>ZnOH]<sup>+</sup> による、COS の加水分解反応は、炭素への求核攻撃が律速段階であると提案されている (Schenk *et al.*, 2004)。そのため、COSase による COS 加水分解における同位体分別が小さい理由として、C-S 結合の解離反応は、律速段階ではなく、反応中間体は全て、C-S 結合の解離を生じるために、この素反応は見かけ上、同位体分別を示さない。一方、炭素への求核攻撃が律速段階となり、この素反応による同位体分別が小さいため、COS 加水分解における同位体分別が、小さくなる可能性が考えられた。

*T. thioparus* THI115 株の菌体当たりの COS 分解活性は、Kamezaki *et al.* (2016) が求めた従属栄養の COS 分解細菌の  $0.07 \sim 1.12 \times 10^{-10} \text{ h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$  と比べて高い値を示した。これは、*T. thioparus* THI115 株はエネルギー源を得るために COS の分解が生育に必須であり、そのために、*T. thioparus* THI115 株は、従属栄養細菌と比べて細胞当たりの COS 分解活性が高いと考えられた。一方、従属栄養細菌による COS 分解は、どの生理的機能にリンクしているのかは現状では不明である。第 3 章でも記した通り、COS 分解に生理的機能があるというよりも、COS は、CO<sub>2</sub> のアナログ化合物であるため、β-CA による CO<sub>2</sub> の可逆的な水和反応に伴い、COS も分解されると考える方が妥当であるのかもしれない。

*T. thioparus* THI115 株の同位体分別のメカニズムは、次のような式で表される、Rees モデルに基づいて理解できる (Rees, 1973)(Fig. 4-3)。

$$\varepsilon_{\text{net}} = \varepsilon_{\text{dif}} + (\varepsilon_{\text{enz}} - \varepsilon_{\text{dif}}) k_{\text{out}} / (k_{\text{out}} + k_{\text{enz}})$$

この式で、 $\varepsilon_{\text{net}}$ 、 $\varepsilon_{\text{dif}}$ 、 $\varepsilon_{\text{enz}}$  は、菌体、細胞外から細胞質への輸送、酵素による同位体分別定数である。 $k_{\text{into}}$ 、 $k_{\text{out}}$ 、 $k_{\text{enz}}$  は、細胞外から細胞質への輸送、細胞質から細胞外への輸送、酵素による COS 分解に関する速度定数である。 $k_{\text{out}} / (k_{\text{out}} + k_{\text{enz}})$ 、又は  $k_{\text{out}} + k_{\text{enz}} = k_{\text{into}}$  と考えられるため、 $k_{\text{out}} / k_{\text{into}}$  は、細胞質へ流入する COS に対して、細胞外へ流出する COS の割合を示す。細胞膜は、基質の拡散やトランスポーターなどによる能動輸送により、同位体分別を示すファクターの 1 つとして知られているが (Harrison and Thode, 1958; O'Leary, 1988)、COS の場合は、気体状の硫黄化合物であり、細胞質は液相であるため、COS は拡散するものと考えられる。拡散は、 $D_T$  として次のような式で表される (Mills and Harris, 1976)。

$$D_T = \left( \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \right)^{\frac{1}{2}}$$

ここで、 $m_1$  と  $m_2$  は、それぞれ  $\text{CO}^{32}\text{S}$  又は  $\text{CO}^{34}\text{S}$  と  $\text{H}_2\text{O}$  の質量を示す。こうして、 $D(\text{CO}^{32}\text{S})$  と  $D(\text{CO}^{34}\text{S})$  が求まる。COS 拡散の  $^{34}\varepsilon_{\text{dif}}$  は、 $D(\text{CO}^{34}\text{S}) / D(\text{CO}^{32}\text{S}) - 1$  として計算され、 $-3.7\%$  である。 $k_{\text{out}} \ll k_{\text{enz}}$  の場合、Rees モデルから、 $^{34}\varepsilon_{\text{net}}$  値は  $^{34}\varepsilon_{\text{dif}}$  値である  $-3.7\%$ 、逆に  $k_{\text{out}} \gg k_{\text{enz}}$  の場合、 $^{34}\varepsilon_{\text{net}}$  値は、 $^{34}\varepsilon_{\text{enz}}$  値である  $-2.2\%$  となる。本実験で、*T. thioparus* THI115 株の  $^{34}\varepsilon$  値は、 $-3.6 \pm 0.7\%$  であったことから、 $k_{\text{out}} / (k_{\text{out}} + k_{\text{enz}})$  又は  $k_{\text{out}} / k_{\text{into}}$  は、 $0.07$ 、 $k_{\text{into}}$  は  $0.35 \text{ h}^{-1}$ 、 $k_{\text{enz}}$  は  $0.33 \text{ h}^{-1}$ 、 $k_{\text{out}}$  は  $0.02 \text{ h}^{-1}$  であることが明らかになり、本実験で用いられた COS 濃度下では、細胞質に流入した COS のほとんどが、COSase によって分解されるものと考えられた。このことは、COSase による同位体分別よりも、細胞質への COS の流入による同位体分別の方が、主に菌体の同位体分別を制御するファクターであることを示す。

本研究では、技術的な制約があるために、大気濃度ではなく、より高濃度の COS を実験に用いた。現場環境の実測データとしては、小麦畑の収穫後の土壌では、 $13 \text{ pmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  の COS 放出があり、この条件下でのモデル研究に基づき、土壌中の COS 濃度は、およそ  $10 \text{ parts per billion by volume (ppbv)}$  と見積もられている (Maseyk *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015)。土壌からの COS 放出は、調べた限りでは、 $\sim 50 \text{ pmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  が最大であることから (Billesbach *et al.*, 2014)、土壌中の COS 濃度は、最大でも  $\text{ppbv}$  のオーダーであると考えられる。このため、大気中の COS 濃度と同様、土壌中の COS 濃度も、本実験で用いた濃度と比べてかなり低く、そのような低濃度下で、*T. thioparus* THI115 株の COS 分解は、 $k_{\text{out}} \ll k_{\text{enz}}$  となることから、 $^{34}\varepsilon_{\text{net}}$  値は、 $^{34}\varepsilon_{\text{dif}}$  値である  $-3.7\%$  に限りなく近い値であると推測される。

Kamezaki *et al.* (2016) の研究では、アクチノバクテリアに属する *Mycobacterium spp.* の 4 菌株と、*Williamsia sp.* THI410 株の  $^{34}\varepsilon$  値は、それぞれ  $-3.99\%$ 、 $-3.56\%$  及び  $-3.74\%$  であり、本研究で明らかにしたプロテオバクテリアである *T. thioparus* THI115 株の  $^{34}\varepsilon$  値  $3.6\%$  と、近い値を示した。一方、プロテオバクテリアである *Cupriavidus spp.* THI414 株と THI415 株は、それぞれ  $-2.09\%$  及び  $-2.38\%$  であった。これらの  $^{34}\varepsilon$  値の違いの要因は、明らかではないが、可能性の 1 つとして、第 3 章で示した COS 分解酵素

の影響が考えられる。つまり、前者の5菌株のゲノムには、COSaseを含む $\beta$ -CAのclade Dをコードする遺伝子の保存された塩基配列領域が存在するが、*Cupriavidus* spp. THI414株とTHI415株では、検出されなかったためである(第3章)。NCBIのタンパク質データベースでヒットした、*Cupriavidus*属に属する細菌の245個のCAに関して、保存ドメインの検索ツールであるNCBIのCD-Searchを行なったところ、clade Dに分類されたCAは、2つのみであった。このことから、*Cupriavidus* spp. THI414株とTHI415株は、clade Dに分類されるCAを保持していない可能性が高いと考えられた。以上の結果から、調査の対象とした細菌種数および菌株数は、限られるものの、本研究からは、細菌のCOS分解における $^{34}\text{S}$ 値は、分解酵素によって影響する可能性があると考えられた。

COS分解能をもつ生物は、1-2に記載した通り、細菌や古細菌から植物まで、系統的に幅広く存在する。高いCOS分解活性(第2章; Smeulders *et al.*, 2011, 2013; Ogée *et al.*, 2016)や、生物における $\beta$ -CAの広い分布(Smith *et al.*, 1999, Smith and Ferry, 2000)から、これらの生物によるCOS分解は、主に $\beta$ -CAファミリーに属する酵素が担っているものと推測される。そのため、これらのCOS分解生物は、酵素レベルでは、COSaseと同じような同位体分別を示す可能性が高い。しかしながら、これらとは別のCOS分解酵素による、同位体分別の可能性も否定することはできない。COSaseをコードする遺伝子をプローブに用いたサザンブロットによる解析から、COSase遺伝子は、*T. thioparus* THI115株のゲノム中に1コピーのみ存在すると見られる(小川, 2005)。このことは、塩基配列レベルでCOSaseと類似した $\beta$ -CAファミリーに属する酵素は、ゲノム中に存在しない可能性が高いことを示す。一方、コドンの3番目の塩基のみが異なる等により、塩基配列の相同性が低くとも、類似したアミノ酸配列を示すことも考えられ、COSaseとは異なる $\beta$ -CAファミリーに属する酵素は存在する可能性がある。さらに、Table 1-1に示した、COS分解活性の低い酵素の存在は、否定できない。最近明らかになった、*T. thioparus* DSM 505株のゲノムには、 $\beta$ -CA、carboxysome CA、 $\gamma$ -CA、RubisCOと推定される遺伝子が含まれる(Hutt *et al.*, 2017)。Carboxysome CAと $\gamma$ -CAのCOS分解能に関する研究は、行われておらず、COS分解活性があるかどうか明らかではないが、X線結晶構造解析の結果からは、これらの活性部位には、それぞれ $\beta$ -CA、 $\alpha$ -CAの活性部位に類似する構造が存在していることが明らかになっており(Hewett-Emmett and Tashian, 1996; Kisker *et al.*, 1996; Sawaya *et al.*, 2006)、COS分解活性がある可能性を示唆する。我々は、*T. thioparus* THI115株にもこれらのCOS分解酵素が存在するかを明らかにするため、現在ゲノム解析を行なっている。

COSaseと*T. thioparus* THI115株の同位体分別は、MDFであることが分かった。MIFにより生じる硫酸エアロゾルの同位体異常は、対流圏のエアロゾルや、成層圏のエアロゾルが含まれる、雪やアイスコアの分析で観察されているが、この硫酸エアロゾルの同位体異常の原因の1つを、細菌のCOS分解に帰することはできないことを示す(Romero and Thiemens, 2003; Savarino *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2010)。

本研究で明らかになった同位体分別は、同位体を用いて地球規模のCOSの物質循環を推定する上で、重要である。今後は、COSの最も大きな消失源と見られている、植物に関する同位体分別を明らかにす

ることによって、COS の消失源として、土壌と植物の影響を区別することが可能になると思われる。また、より高精度の COS の動態を理解するには、大気濃度における測定も、土壌や COS 分解生物で行われるべきであり、大気 COS の同位体分別の測定法の確立が望まれる。



Table 4-1. Sulfur isotopic fractionations in COS degradation by COSase and *T. thioparus* THI115.<sup>a</sup>

|                            | Batch                | Isotope sampling times | Rate constant (h <sup>-1</sup> ) | Living cell number (× 10 <sup>9</sup> cell) | Cell specific activity (× 10 <sup>-10</sup> h <sup>-1</sup> cell <sup>-1</sup> ) | <sup>33</sup> ε |                |                        | <sup>34</sup> ε |                |                        | <sup>33</sup> E (%) |
|----------------------------|----------------------|------------------------|----------------------------------|---|--|-----------------|----------------|------------------------|-----------------|----------------|------------------------|---------------------|
|                            |                      |                        |                                  |   |  | (‰)             | r <sup>2</sup> | P value                | (‰)             | r <sup>2</sup> | P value                |                     |
| COSase                     | 1                    | 5                      | 0.90                             | –   | –  | -0.9 ± 0.1      | 0.99           | 2.8 × 10 <sup>-5</sup> | -2.0 ± 0.2      | 0.99           | 2.2 × 10 <sup>-5</sup> | 0.1                 |
|                            | 2                    | 5                      | 0.72                             | –   | –  | -1.1 ± 0.0      | 1.00           | 7.6 × 10 <sup>-7</sup> | -2.4 ± 0.2      | 0.99           | 2.6 × 10 <sup>-5</sup> | 0.2                 |
|                            | 3                    | 5                      | 0.75                             | –   | –  | -1.1 ± 0.1      | 0.99           | 4.1 × 10 <sup>-5</sup> | -2.2 ± 0.3      | 0.99           | 4.0 × 10 <sup>-5</sup> | 0.1                 |
|                            | Average <sup>b</sup> | –                      | 0.79 ± 0.10                      | –   | –  | -1.0 ± 0.1      | –              | – <sup>c</sup>         | -2.2 ± 0.2      | –              | – <sup>c</sup>         | 0.1 ± 0.1           |
| <i>T. thioparus</i> THI115 | 1                    | 6                      | 0.36                             | 4.7   | 0.76   | -1.4 ± 0.2      | 0.99           | 9.1 × 10 <sup>-6</sup> | -2.9 ± 0.3      | 0.99           | 4.8 × 10 <sup>-6</sup> | 0.1                 |
|                            | 2                    | 5                      | 0.30                             | 2.0   | 1.51   | -2.4 ± 0.8      | 0.93           | 2.0 × 10 <sup>-3</sup> | -4.3 ± 1.3      | 0.94           | 1.2 × 10 <sup>-3</sup> | -0.2                |
|                            | 3                    | 6                      | 0.33                             | ND  | ND   | -1.6 ± 0.1      | 0.99           | 1.3 × 10 <sup>-6</sup> | -3.6 ± 0.3      | 1.00           | 3.9 × 10 <sup>-7</sup> | 0.3                 |
|                            | Average <sup>b</sup> | –                      | 0.33 ± 0.03                      | 3.3 ± 1.9                                   | 1.14 ± 0.53  | -1.8 ± 0.6      | –              | – <sup>c</sup>         | -3.6 ± 0.7      | –              | – <sup>c</sup>         | 0.1 ± 0.2           |

ND, not determined. <sup>a</sup> Indicated ±SD. <sup>b</sup> Indicated mean ± SD calculated based on the value of each batch. <sup>c</sup> P values for ε values between COSase and *T. thioparus* THI115 were 0.08 for the <sup>33</sup>ε value and 0.03 for the <sup>34</sup>ε value.

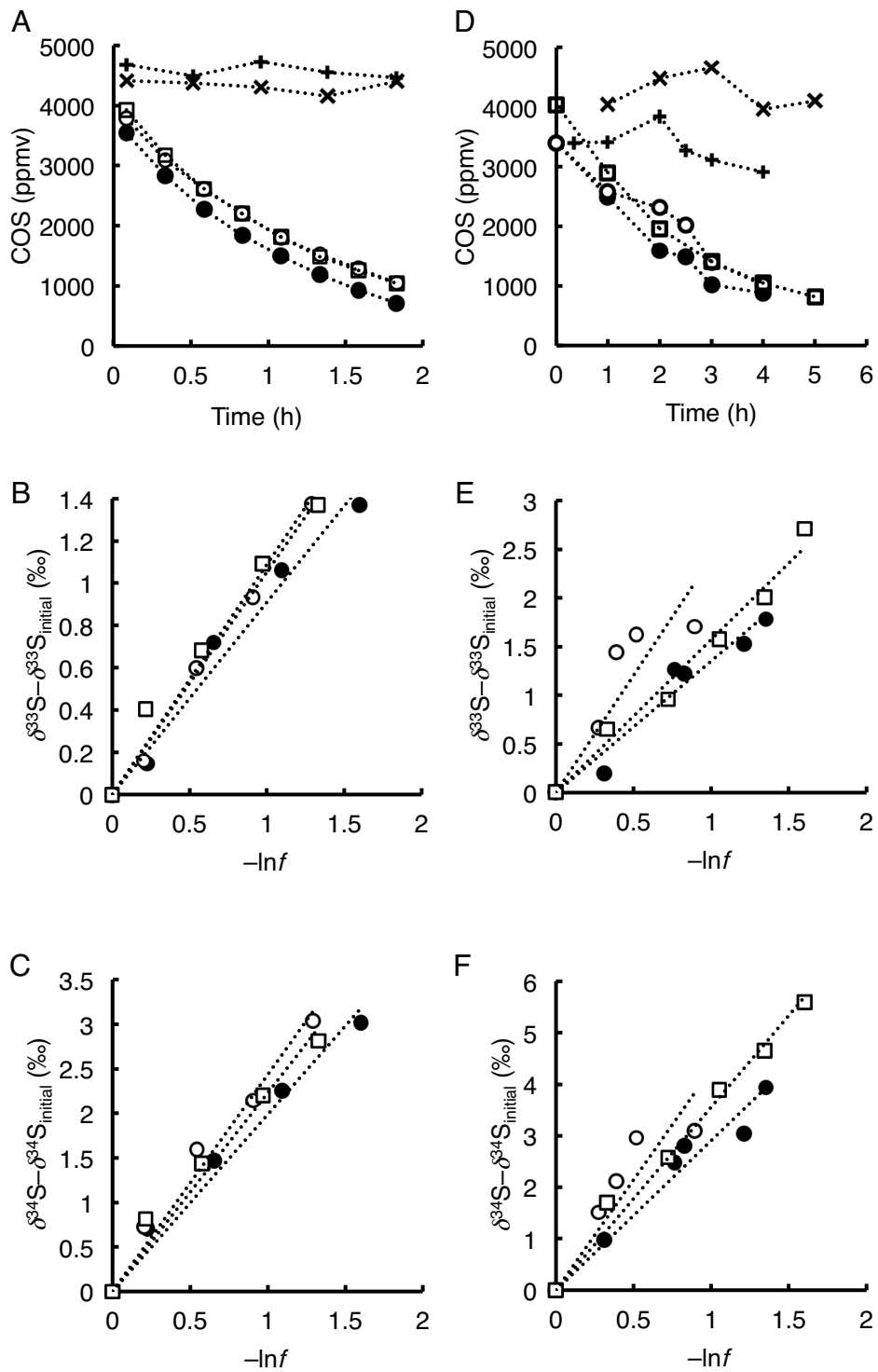


Fig. 4-1. Time courses of COS and sulfur isotopic compositions during COS degradation by COSase (A, B and C) and *T. thioparus* THI115 (D, E and F).  $\ln f$  represents the natural logarithm of the ratio of the residual COS concentration at the times indicated divided by the initial COS concentration. (A and D) ●, ○ and □ represent batches 1, 2, and 3 of COSase or *T. thioparus* THI115, respectively. × and + represent batches 1 and 2 of buffer without COSase or uninoculated control, respectively. (B, C, E and F) ●, ○ and □ represent batches 1, 2, and 3 of COSase or *T. thioparus* THI115, respectively. The COS concentration at 0 min cannot be measured because of the disturbance of the headspace gas by the addition of COS. Therefore, the concentration of *T. thioparus* THI115 at 0 min was regarded as those of batches 1 and 2 of the uninoculated control measured at 20 min and 60 min, respectively, corresponding to measurements conducted on different dates.

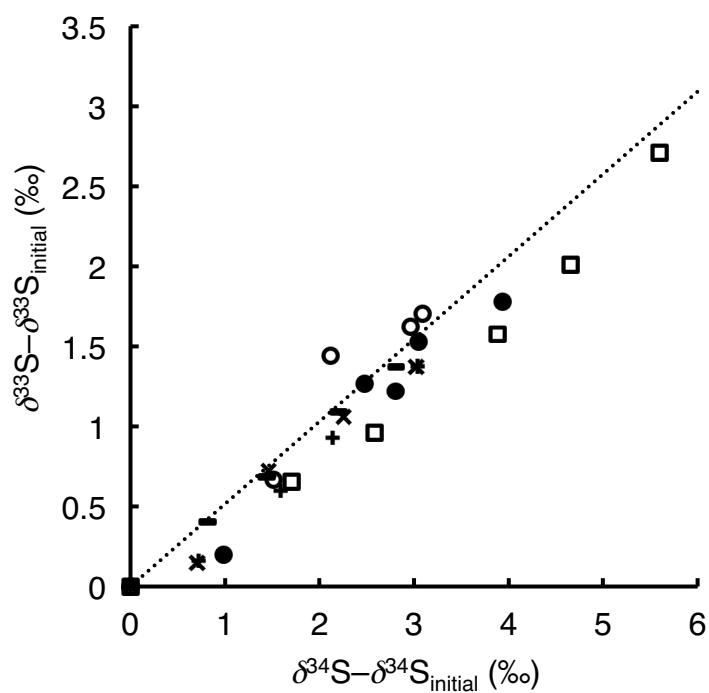


Fig. 4-2. A three-isotope plot between  $\delta^{33}\text{S}$  and  $\delta^{34}\text{S}$  values. The broken line indicates the mass-dependent fractionation line with slope (0.515). ×, +, and - represent batches 1, 2, and 3 of COSase, respectively. ●, ○, and □ represent batches 1, 2, and 3 of *T. thioparus* THI115, respectively.

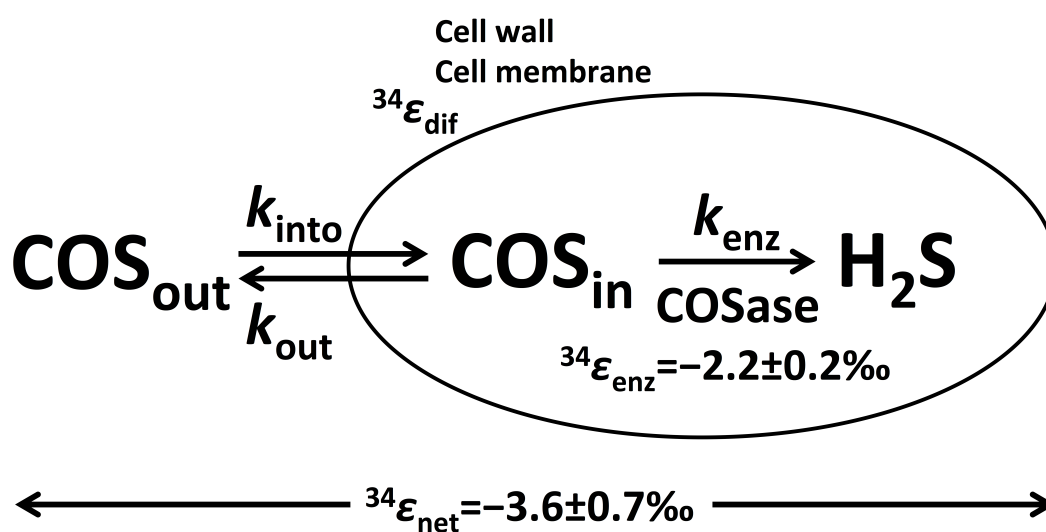


Fig. 4-3. Schematic diagram of  $^{34}\text{S}$  isotopic fractionation by *T. thioparus* THI115.  $\epsilon_{\text{net}}$ ,  $\epsilon_{\text{dif}}$ , and  $\epsilon_{\text{enz}}$  represent the isotopic fractionation constants for the overall net, transport into the cytoplasm, and the enzyme reaction, respectively.  $k_{\text{into}}$ ,  $k_{\text{out}}$ , and  $k_{\text{enz}}$  represent rate constants for diffusion into and out of the cell of COS and degradation by enzymes, respectively.

## 第5章 総合考察

本研究では、対流圏の COS の主要な消失源の1つである、土壌 (Launois *et al.*, 2015) を念頭に置いて、COS の分解を COSase を用いた酵素レベル、並びに *T. thioparus* THI115 株及び放線菌を主とした、従属栄養細菌の菌体を用いた、細菌レベルの研究を行なった。COS のもう1つの主要な消失源である植物では、 $\beta$ -CA が COS 分解を触媒すると考えられている (Protoschill-Krebs *et al.*, 1996)。 $\beta$ -CA の本来の活性は、光合成にとって必須である  $\text{CO}_2$  と  $\text{HCO}_3^-$  との変換反応であるが、COS は、 $\text{CO}_2$  と構造が類似しているため、 $\beta$ -CA は、COS も加水分解することができる。CA は、生物にほぼ普遍的に存在するが、その中でも  $\beta$ -CA は、多くの細菌や古細菌に存在する酵素として知られる (Smith *et al.*, 1999; Smith and Ferry, 2000)。そのため、土壌においても、COS の取り込みには、土壌微生物の  $\beta$ -CA が関与していると考えられてはいるが、これまで、微生物の  $\beta$ -CA に関する COS 分解は研究されていない (Conrad, 1996)。

そこで、*T. thioparus* THI115 株から精製された、COSase のカイネティクスを求めた結果、本来の基質の他に、COS も基質とすることが明らかとなっている、既知の酵素の中で、 $\beta$ -CA や  $\text{CS}_2$  hydrolase と共に、高い COS 分解活性を持つことが明らかになった (Table 1-1)。 $\beta$ -CA は、アミノ酸配列を基に作成した系統樹によって、clade A~D に分類され (Smith *et al.*, 1999; Smith and Ferry, 2000)、COSase は、 $\text{CS}_2$  hydrolase と共に、 $\beta$ -CA の clade D に分類される、 $\beta$ -CA の酵素ファミリーと考えられた (Fig. 5-1)。しかし、 $\beta$ -CA とは異なり、 $\text{CO}_2$  水和活性はほとんど見られなかった。植物の  $\beta$ -CA で見られるような、共役的な COS 分解とは異なり、*T. thioparus* THI115 株において、COS は、 $\text{SCN}^-$  をエネルギー源として成長する際の代謝中間体である。そのため、COSase の主な機能は、COS を触媒することにあると考えられた。

アミノ酸配列、COS 加水分解活性、及び  $\text{CO}_2$  水和活性に関して、COSase と類似した特徴を持つ  $\text{CS}_2$  hydrolase は、活性中心の構造においても、COSase と共通点が見られる (Smeulders *et al.*, 2011)。そのため、同じような反応メカニズムで、COS 加水分解と  $\text{CS}_2$  加水分解の反応が触媒されることが、示唆されると云える。基質の進入や生成物の退出経路が、多くの  $\beta$ -CA では幅広く、一方、COSase や  $\text{CS}_2$  hydrolase では狭く、しかも疎水性であったことが、これらの酵素間で、 $\text{CO}_2$  水和活性に差異が見られた要因であるかもしれない。そのため、結晶構造の解析結果からは、活性中心ではなく、基質の進入、または生成物の退出経路が、基質特異性に重要である可能性を示した。今後、基質特異性に関しては、進入退出経路や、活性中心近傍のアミノ酸の部位特異的変異体を作製することによって、解明していく必要がある。

*T. thioparus* THI115 株と COSase は、共に、大気中に存在する濃度の COS (500 pptv 前後) を分解した。これまでに、COS を分解する酵素において、このような低い基質濃度における分解活性を調べた研究はなかった。今回、大気濃度の COS に対しても、分解を行なえることが明らかになり、しかも、*Thiobacillus* 属細菌は、土壌中に豊富に生息することも考えると、COSase は、土壌における COS 分解を触媒する酵素の1つとして見なすことができる。本研究で実験に用いた、大気濃度の COS を分解する *Mycobacterium* spp. のゲノムには、 $\beta$ -CA の clade D をコードする遺伝子の存在が示唆された。これらの結果は、アミノ

酸配列や結晶構造において、COSase と類似している  $\beta$ -CA の clade D や CS<sub>2</sub> hydrolase にも、同じように大気濃度の COS を分解する能力が備わっている可能性を示す。 $\beta$ -CA のアミノ酸配列を基に作成した系統樹において、COSase と結晶構造の特徴から、高い類似性を有することが考えられる、*Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -CA Rv1284 や *Methanobacterium thermoautotrophicum*  $\beta$ -CA、さらに、CS<sub>2</sub> hydrolase も、共に clade D に分類される (Fig. 5-1)。植物の  $\beta$ -CA は、clade B に分類されるが、これらの知見は、 $\beta$ -CA の中でも、clade D に属する酵素を持つ土壌微生物が、土壌における大気中の COS の取り込みを主として担う可能性を示す。

$\beta$ -CA は、様々な生物に分布しており、好熱性の細菌 *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* や、古細菌 *Methanobacterium thermoautotrophicum* などの、生物の進化系統樹の根元に近い生物にも存在することから、古代酵素であると言われている (Smith *et al.*, 1999)。30 億年ほど昔の COS の濃度は、今よりも 10,000 倍程度高い 5 ppmv 程度であったとする報告もある (Ueno *et al.*, 2009)。高い基質特異性や COS 分解活性を示す COSase や、 $\beta$ -CA による COS 分解は、現在よりも生物にとって重要な反応であったのかもしれない。独立栄養生物である *T. thioparus* THI115 株、*Acidithiobacillus thiooxidans* S1p 株、*A. thiooxidans* G8 株及び *Acidianus* sp. A1-3 株から精製された COSase や、CS<sub>2</sub> hydrolase (Smeulders *et al.*, 2011, 2013) は、エネルギー獲得のための代謝経路に関わる酵素であるため、生育に不可欠な酵素である。一方、本研究の 3 章で示した放線菌の COS 分解のように、従属栄養生物における COS 分解の生理的意義については不明である。

COSase や *T. thioparus* THI115 株の COS 分解における同位体分別は、本研究によって明らかとなったが、生物による COS の同位体分別に関する研究は、極端に乏しい。近年、COS は、植物における総一次生産量を見積もるための、トレーサーになり得るとして期待されており (Campbell *et al.*, 2008; Seibt *et al.*, 2010; Stimler *et al.*, 2010)、植物の COS 分解における同位体分別を把握することは、同位体比や同位体分別定数の数値の違いから、COS の消失源である土壌と植物を区別するために、必要な検討項目である。

本研究によって示されたように、COS 分解能はあるとしても、大気濃度の COS を分解する微生物は、限られる。地球規模の COS の動態を詳細に把握するためにも、今後、clade D に加えて、他の clade に属する  $\beta$ -CA などの酵素や、土壌バイオマスとして豊富な真菌、そして対流圏の COS の最も大きな消失源とされる、植物の COS 分解や、その同位体分別を研究することは重要で、その際は、大気濃度の COS を用いて行なうことが必要である。

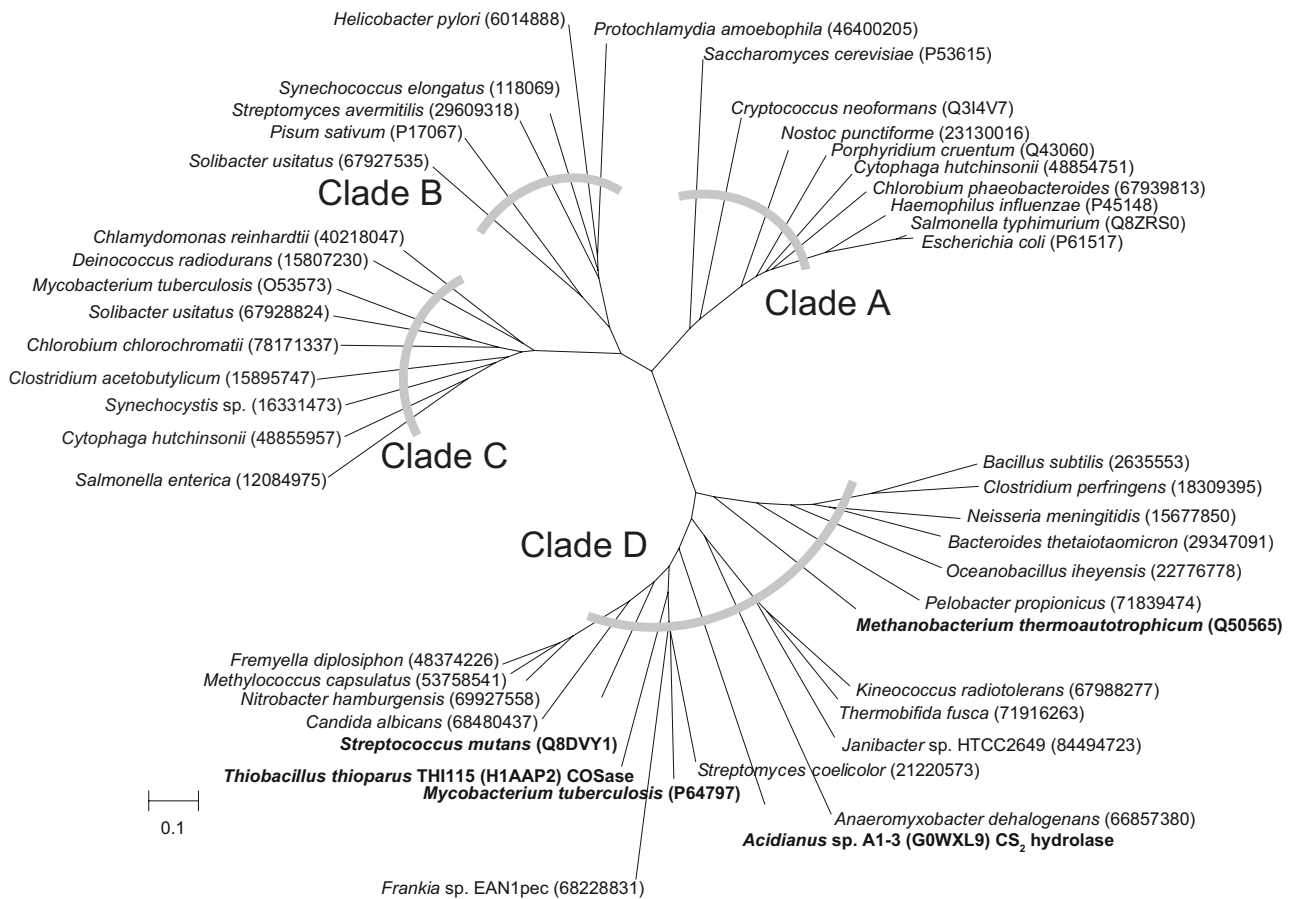


Figure 5-1. Phylogenetic tree of COSase and  $\beta$ -CAs. A phylogenetic tree was constructed with MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) using sequences of COSase and  $\beta$ -CAs.  $\beta$ -CAs were selected from the PDB and used the sequences from UniProt Knowledgebase (UniProtKB) corresponding to  $\beta$ -CAs.  $\beta$ -CAs from the NCBI conserved domain database (CDD) were used to classify  $\beta$ -CAs into 4 clades. For each clade, single sequence data from eukarya and archaea, and those of bacteria that represent clade A, B, and C at the phylum level and clade D at the genus level were used to construct the tree when the sequence data of  $\beta$ -CAs was unavailable in PDB. Sequence data of *Halothiobacillus neapolitanus* deposited in PDB were not included due to the low homology with COSase. The transit peptide sequence of  $\beta$ -CA from *Pisum sativum* was also not included. The accession numbers of the  $\beta$ -CAs used here are indicated by its NCBI GI number or UniProtKB number and appear in parentheses. The COSase, CS<sub>2</sub> hydrolase and  $\beta$ -CAs of clade D that were deposited to PDB are shown in bold.



## 謝辞

この研究を行なっていく過程で、数多くの方にアドバイスや御支援、御協力を戴きました。皆様のサポートのおかげで、研究の成果をこのような学位論文としてまとめることができました。感謝の意を表します。

指導教員の片山葉子教授には、研究の全般にわたって指導して戴きました。研究では成果が出るのに大変長期間かかってしまいましたが、辛抱強く見守って下さり、感謝致します。本研究の多くは環境微生物学研究室で得られました。多羅尾光徳准教授、山田元章技術職員をはじめ、環境微生物学研究室に所属の方々による研究のアドバイスや御協力に感謝致します。特に、第3章に記載の研究では東出満氏、西宮真美氏の御協力によって成果をまとめることができ、感謝致します。

本研究は環境微生物学研究室の方々だけでなく、多くの方々によって研究を進めることができました。特に、第2章に記載の研究では工学部の尾高雅文准教授(現 秋田大学教授)、機器分析施設の野口恵一准教授に主として結晶構造解析や論文の執筆時に御協力や御助言を数多く戴きました。理化学研究所の堂前直氏、中山洋氏には、研究所内にある機器の使用を快く承諾して戴きました。第4章に記載の研究では東京工業大学の服部祥平助教に同位体分別に関する研究全般、論文の執筆時に御協力や御助言を戴きました。また、東京工業大学の博士課程に在籍する亀崎和輝氏には同位体比の測定に御協力戴きました。

遺伝子実験施設の丹生谷博教授(現 早稲田大学)、松下保彦准教授、佐々木信光准教授には研究に必要な時間を融通して下さいました。

## 引用文献

- **Adler, L., Brundell, J., Falkbring, S. O. and Nyman, P. O. (1972).** Carbonic anhydrase from *Neisseria sicca* strain 6021 I. Bacterial growth and purification of the enzyme. *Biophys Acta* **284**, 298-310.
- **Alber, B. E. and Ferry, J. G. (1994).** A carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **91**, 6909-6913.
- **Aydin, M., De Bruyn, W. J. and Saltzman, E. S. (2002).** Preindustrial atmospheric carbonyl sulfide (COS) from an Antarctic ice core. *Geophys Res Lett* **29**, 1359.
- **Aydin, M., Williams, M. B. and Saltzman, E. S. (2007).** Feasibility of reconstructing paleoatmospheric records of selected alkanes, methyl halides, and sulfur gases from Greenland ice cores. *J Geophys Res: Atmos* **112**, D07312.
- **Aydin, M., Williams, M. B., Tatum, C. and Saltzman, E. S. (2008).** Carbonyl sulfide in air extracted from a South Pole ice core: a 2000 year record. *Atmos Chem Phys* **8**, 7533-7542.
- **Andreae, M. O. and Crutzen, P. J. (1997).** Atmospheric aerosols: Biogeochemical sources and role in atmospheric chemistry. *Science* **276**, 1052-1058.
- **Badger, M. R. and Andrews, T. J. (1987).** Co-evolution of Rubisco and CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms. p. 601-609. In Biggins J. (ed.), *Progress in Photosynthesis Research Vol. 3*. Martinus Nijhoff Publisher, Norwell, MA.
- **Badger, M. R. and Price, G. D. (1989).** Carbonic anhydrase activity associated with the Cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Plant Physiol* **89**, 51-60.
- **Berry, J., Wolf, A., Campbell, J. E., Baker, I., Blake, N., Blake, D., Denning, A. S., Kawa, S. R., Montzka, S. A., Seibt, U., Stimler, K., Yakir, D. and Zhu, Z. (2013).** A coupled model of the global cycles of carbonyl sulfide and CO<sub>2</sub>: A possible new window on the carbon cycle. *J Geophys Res Biogeosci* **118**, 842-852.
- **Betts, J. C., Lukey, P. T., Robb, L. C., McAdam R. A. and Duncan, K. (2002).** Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol* **43**, 717-731.
- **Bigeleisen, J. and M.G. Mayer, M.G. (1947).** Calculation of equilibrium constants for isotopic exchange reactions. *J Chem Phys* **15**, 261-267.
- **Billesbach, D.P., Berry, J.A., Seibt, U., Maseyk, K., Torn, M.S., Fischer, M.L., Abu-Naser, M. and Campbell, J.E. (2014).** Growing season eddy covariance measurements of carbonyl sulfide and CO<sub>2</sub> fluxes: COS and CO<sub>2</sub> relationships in Southern Great Plains winter wheat. *Agric For Meteorol* **184**, 48-55.
- **Blezynger, S., Wilhelm, C. and Kesselmeier, J. (2000).** Enzymatic consumption of carbonyl sulfide (COS) by marine algae. *Biogeochemistry* **48**, 185-197.

- **Brenninkmeijer, C.A.M., Janssen, C., Kaiser, J., Röckmann, T., Rhee, T.S. and Assonov, S.S. (2003).** Isotope effects in the chemistry of atmospheric trace compounds. *Chem Rev* **103**, 5125-5161.
- **Brundell, J., Falkbring, S. O. and Nyman, P. O. (1972).** Carbonic anhydrase activity in acetate grown *Methanosarcina barkeri*. *Arch Microbiol* **151**, 137-142.
- **Brühl, C., Lelieveld, J., Crutzen, P. J. and Tost, H. (2012).** The role of carbonyl sulphide as a source of stratospheric sulphate aerosol and its impact on climate. *Atmos Chem Phys* **12**, 1239-1253.
- **Brünger, A. T. (1992).** Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-475.
- **Bunk, R., Behrendt, T., Yi, Z., Andreae, M. O. and Kesselmeier, J. (2017).** Exchange of carbonyl sulfide (OCS) between soils and atmosphere under various CO<sub>2</sub> concentrations. *J Geophys Res: Biogeosci* **122**, 1343-1358.
- **Burghout, P., Vullo, D., Scozzafava, A., Hermans, P. W. M. and Supuran, C. T. (2011).** Inhibition of the  $\beta$ -carbonic anhydrase from *Streptococcus pneumoniae* by inorganic anions and small molecules: Toward innovative drug design of antiinfectives? *Bioorg Med Chem* **19**, 243-248.
- **Campbell, J. E., Carmichael, G.R., Chai, T., Mena-Carrasco, M., Tang, Y., Blake, D. R., Blake, N. J., Vay, S. A., Collatz, G. J., Baker, I., Berry, J. A., Montzka, S. A., Sweeney, C., Schnoor, J. L. and Stanier, C. O. (2008).** Photosynthetic control of atmospheric carbonyl sulfide during the growing season. *Science* **322**, 1085-1088.
- **Chae, Y. M. and Tabatabai, M. A. (1983).** Colorimetric determination of allyl isothiocyanate. *Anal Lett* **16**, 1197-1206.
- **Chambers, L.A. and Trudinger, P.A. (1979).** Microbiological fractionation of stable sulfur isotopes: A review and critique. *Geomicrobiol J* **1**, 249-293.
- **Chapman, S. J. (1990).** Thiobacillus populations in some agricultural soils. *Soil Biol Biochem* **22**, 479-482.
- **Chengelis, C. P. and Neal, R. A. (1979).** Hepatic carbonyl sulfide metabolism. *Biochem Biophys Res Comm* **90**, 993-999.
- **Chin, M., and Davis, D.D. (1993).** Global sources and sinks of OCS and CS<sub>2</sub> and their distributions. *Global Biogeochem Cycles* **7**, 321-337.
- **Chin, M. and Davis, D. D. (1995).** A reanalysis of carbonyl sulfide as a source of stratospheric background sulfur aerosol. *J Geophys Res* **100**, 8993-9005.
- **Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E. 3rd., Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J.,**

- Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S. and Barrell, B. G. (1998).** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-44.
- **Conrad, R. (1996).** Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, OCS, N<sub>2</sub>O and NO). *Microbiol Rev* **60**, 609-640.
  - **Conrad, R. and Meuser, K. (2000).** Soils contain more than one activity consuming carbonyl sulfide. *Atmos Environ* **34**, 3635–3639.
  - **Covarrubias, A. S., Larsson, A. M., Högbom, M., Lindberg, J., Bergfors, T., Björkelid, C., Mowbray, S. L., Unge, T. and Jones, T. A. (2005).** Structure and function of carbonic anhydrases from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **280**, 18782-18789.
  - **Covarrubias, A. S., Bergfors, T., Jones, T. A. and Högbom, M. (2006).** Structural mechanics of the pH-dependent activity of β-carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **281**, 4993-4999.
  - **Cronk, J. D., Rowlett, R. S., Zhang, K. Y. J., Tu, C. Endrizzi, J. A., Lee, J., Gareiss, P. C. and Preiss, J. R. (2006).** Identification of a novel noncatalytic bicarbonate binding site in eubacterial β-carbonic anhydrase. *Biochemistry* **45**, 4351-4361.
  - **Crutzen, P. J. (1976).** The possible importance of CSO for the sulfate layer of the stratosphere. *Geophys Res Lett* **3**, 73-76.
  - **Danielache, S. O., Johnson, M. S., Nanbu, S., Grage, M. M. L., McLinden, C. and Yoshida, N. (2008).** High-precision spectroscopy of <sup>32</sup>S, <sup>33</sup>S, and <sup>34</sup>S sulfur dioxide: Ultraviolet absorption cross sections and isotope effects *Chem Phys Lett* **450**, 214–220.
  - **De Bruyn, W. J., Swartz, E., Hu, J. H., Shorter, J. A., Davidovits, P., Worsnop, D. R., Zahniser, M. S. and Kolb, C. E. (1995).** Henry's law solubilities and Setchenow coefficients for biogenic reduced sulfur species obtained from gas-liquied uptake measurements. *J Geophys Res* **100**, 7245-7251.
  - **De Simone, G. and Supuran, C. T. (2012).** (In)organic anions as carbonic anhydrase inhibitors. *J Inorg Chem* **111**, 117-129.
  - **Dean, J. A. (1999).** *Electrolytes, Electromotive Force, and Chemical Equilibrium: Lange's Handbook of Chemistry*, 15th Eds.; McGraw-Hill: New York, 8.1-8.169.
  - **Elliott, S., Lu, E. and Rowland, F. S. (1989).** Rates and mechanisms for the hydrolysis of carbonyl sulfide in natural waters. *Environ Sci Technol* **23**, 458-461.
  - **Emsley, P. and Cowtan, K. (2004).** *Coot*: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst* **D60**, 2126-2132.
  - **Ensign, S. A. and Ludden, P. W. (1991).** Characterization of the CO oxidation/H<sub>2</sub> evolution system of *Rhodospirillum rubrum*. *J Biol Chem* **266**, 18395-18403.

- **Ensign, S. A. (1995).** Reactivity of carbon monoxide dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* with carbon dioxide, carbonyl sulfide, and carbon disulfide. *Biochemistry* **34**, 5372-5381.
- **Kesselmeier, J. and Merk, L. (1993).** Exchange of carbonyl sulfide (COS) between agricultural plants and the atmosphere: Studies on the deposition of COS to peas, corn and ratiweed. *Biogeochemistry* **23**, 47-59.
- **Ferm, R.J. (1957).** The chemistry of carbonyl sulfide. *Chem Rev* **57**, 621–640.
- **Flöck, O.R., Andreae, M.O. and Dräger, M. (1997).** Environmentally relevant precursors of carbonyl sulfide in aquatic systems. *Mar Chem* **59**, 71–85.
- **Fry, B., Gest, H. and Hayes, J.M. (1984).** Isotope effects associated with the anaerobic oxidation of sulfide by the purple photosynthetic bacterium, *Chromatium vinosum*. *FEMS Microbiol Lett* **22**, 283-287.
- **Fry, B., Gest, H. and Hayes, J.M. (1985).** Isotope effects associated with the anaerobic oxidation of sulfite and thiosulfate by the photosynthetic bacterium, *Chromatium vinosum*. *FEMS Microbiol Lett* **27**, 227-232.
- **Fry, B., Cox, J., Gest, H. and Hayes, J.M. (1986).** Discrimination between <sup>34</sup>S and <sup>32</sup>S during bacterial metabolism of inorganic sulfur compounds. *J Bacteriol* **165**, 328-330.
- **Fry, B., Gest, H. and Hayes, J.M. (1988).** <sup>34</sup>S/<sup>32</sup>S fractionation in sulfur cycles catalyzed by anaerobic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **54**, 250-256.
- **Gries, C., Nash, T. H. and Kesselmeier, J. (1994).** Exchange of reduced sulfur gases between lichens and the atmosphere. *Biogeochemistry* **26**, 25-39.
- **Guo, Z., Li, Z., Farquhar, J., Kaufman, A.J., Wu, N., Li, C., Dickerson, R.R. and Wang, P. (2010).** Identification of sources and formation processes of atmospheric sulfate by sulfur isotope and scanning electron microscope measurements. *J Geophys Res: Atmos* **115**:D00K07 doi:10.1029/2009JD012893.
- **Guy, R.D., Fogel, M.L. and Berry, J.A. (1993).** Photosynthetic fractionation of the stable isotopes of oxygen and carbon. *Plant Physiol* **101**, 37-47.
- **Habicht, K.S., Canfield, D.E. and Rethmeier, J. (1998).** Sulfur isotope fractionation during bacterial reduction and disproportionation of thiosulfate and sulfite. *Geochim Cosmochim Acta* **62**, 2585-2595.
- **Haritos, V. S. and Dojchinov, G. (2005).** Carbonic anhydrase metabolism is a key factor in the toxicity of CO<sub>2</sub> and COS but not CS<sub>2</sub> toward the flour beetle *Tribolium castaneum* [Coleoptera: Tenebrionidae]. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol* **140**, 139-147.
- **Harrison, A.G. and Thode, H.G. (1958).** Mechanism of the bacterial reduction of sulphate from isotope fractionation studies. *Trans Faraday Soc* **54**, 84-92.
- **Hartikainen, T., Ruuskanen, J., Rätty, K., Von Wright, A. and Martikainen, P. J. (2000).** Physiology and taxonomy of *thiobacillus* strain TJ330, which oxidizes carbon disulphide (CS<sub>2</sub>). *J Appl Microbiol* **89**, 580-586.
- **Hatch, M. D. and Burnell, J. N. (1989).** Carbonic anhydrase activity in leaves and its role in the first step of C<sub>4</sub> photosynthesis. *Plant Physiol* **93**, 825-828.

- **Hattori, S., Danielache, S. O., Johnson, M. S., Schmidt, J. A., Kjaergaard, H. G., Toyoda, S., Ueno, Y. and Yoshida, N. (2011).** Ultraviolet absorption cross sections of carbonyl sulfide isotopologues OC<sup>32</sup>S, OC<sup>33</sup>S, OC<sup>34</sup>S and O<sup>13</sup>CS: isotopic fractionation in photolysis and atmospheric implications. *Atmos Chem Phys* **11**, 10293–10303.
- **Hattori, S., Schmidt, J. A., Mahler, D. W., Danielache, S. O., Johnson, M. S. and Yoshida, N. (2012).** Isotope Effect in the Carbonyl Sulfide Reaction with O(<sup>3</sup>P). *J Phys Chem A* **116**, 3521–3526.
- **Hattori, S., Toyoda, A., Toyoda, S., Ishino, S., Ueno, Y. and N. Yoshida. (2015).** Determination of the sulfur isotope ratio in carbonyl sulfide using gas chromatography/isotope ratio mass spectrometry on fragment ions <sup>32</sup>S<sup>+</sup>, <sup>33</sup>S<sup>+</sup>, and <sup>34</sup>S<sup>+</sup>. *Anal Chem* **87**, 477-484.
- **Henkart, P., Guidotti, G. and Edsall, J. T. (1968).** Catalysis of the hydrolysis of 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene by carbonic anhydrase. *J Biol Chem* **243**, 2447-2449.
- **Hewett-Emmelt, D. and Tashian, R. E. (1996).** Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the α-, β-, and γ-carbonic anhydrase gene families. *Mol Phylogenet Evol* **5**, 50-77.
- **Holm, L., Kääriäinen, S., Rosenström, P. and Schenkel, A. (2008).** Searching protein structure databases with DaliLite v.3. *Bioinformatics* **24**, 2780–2781.
- **Hulston, J.R. and Thode, H.G. (1965).** Variations in the S<sup>33</sup>, S<sup>34</sup>, and S<sup>36</sup> contents of meteorites and their relation to chemical and nuclear effects. *J Geophys Res* **70**, 3475-3484.
- **Hussain, A., Ogawa, T., Saito, M., Sekine, T., Nameki, M., Matsushita, Y., Hayashi, T. and Katayama, Y. (2013).** Cloning and expression of a gene encoding a novel thermostable thiocyanate-degrading enzyme from a mesophilic alphaproteobacteria strain THI201. *Microbiology* **159**, 2294–2302.
- **Hutt, L.P., Huntemann, M., Clum, A., Pillay, M., Palaniappan, K., Varghese, N., Mikhailova, N., Stamatis, D., Reddy, T., Daum, C., Shapiro, N., Ivanova, N., Kyrpides, N., Woyke, T. and Boden, R. (2017).** Permanent draft genome of *Thiobacillus thioparus* DSM 505<sup>T</sup>, an obligately chemolithoautotrophic member of the *Betaproteobacteria*. *Stand Genomic Sci* doi:10.1186/s40793-017-0229-3.
- **Islam, K. R., Wright, S.R. (2006).** Microbial communities. p. 1071-1076. In R. Lal (ed.), *Encyclopedia of soil science*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.
- **Ivanov, M.V., Gogotova, G.I., Matrosov, A.G. and Zyakun, A.M. (1976).** Fractionation of sulfur isotopes by phototrophic sulfur bacteria *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*. *Mikrobiologiya* **45**, 655-659 (In Russian with English abstract).
- **Johnson, M.S., Feilberg, K.L., von Hessberg, P. and Nielsen, O.J. (2002).** Isotopic processes in atmospheric chemistry. *Chem Soc Rev* **31**, 313-323.
- **Jones, G.E., and Starkey, R.L. (1957).** Fractionation of stable isotopes of sulfur by microorganisms and their role in deposition of native sulfur. *Appl Microbiol* **5**, 111-118.

- **Jordan, S. L., McDonald, I. R., Kraczkiewicz, A. J., Kelly, D. P., Rainey, F. A., Murrell, J. C. and Wood, A. P. (1997).** Autotrophic growth on carbon disulfide is a property of novel strains of *Paracoccus denitrificans*. *Arch Microbiol* **168**, 225-236.
- **Kaiser, E. T. and Lo, K. W. (1969).** The carbonic anhydrase catalyzed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitro- $\omega$ -toluenesulfonic acid sultone. *J Am Chem Soc* **91**, 4912-4918.
- **Kamezaki, K., Hattori, S., Ogawa, T., Toyoda, S., Kato, H., Katayama, Y. and Yoshida, N. (2016).** Sulfur isotopic fractionation of carbonyl sulfide during degradation by soil bacteria. *Environ Sci Technol* **50**, 3537-3544.
- **Kanda, K., Tsuruta, H. and Minami, K. (1992).** Emission of dimethyl sulfide, carbonyl sulfide, and carbon bisulfide from paddy fields. *Soil Sci Plant Nutr* **38**, 709–716.
- **Kanda, K., Tsuruta, H. and Minami, K. (1995).** Emissions of biogenic sulfur gases from maize and wheat fields. *Soil Sci Plant Nutr* **41**, 1–8.
- **Kaplan, I.R. and Rafter, T.A. (1958).** Fractionation of stable isotopes of sulfur by Thiobacilli. *Science* **127**, 517-518.
- **Kaplan, I.R. and Rittenberg, S.C. (1962).** Fractionation of isotopes in relation to the problem of elemental sulphur transport by micro-organisms. *Nature* **194**, 1098-1099.
- **Kaplan, I.R. and Rittenberg, S.C. (1964).** Microbiological fractionation of sulphur isotopes. *J Gen Microbiol* **34**, 195-212.
- **Karsh, K.L., Granger, J., Kritee, K. and Sigman, D.M. (2012).** Eukaryotic assimilatory nitrate reductase fractionates N and O isotopes with a ratio near unity. *Environ Sci Technol* **46**, 5727-5735.
- **Katayama, Y., Narahara, Y., Inoue, Y., Amano, F., Kanagawa, T. and Kuraishi, H. (1992).** A thiocyanate hydrolase of *Thiobacillus thioparus*. A novel enzyme catalyzing the formation of carbonyl sulfide from thiocyanate. *J Biol Chem* **267**, 9170-9175.
- **Katayama, Y., Kanagawa, T. and Kuraishi, H. (1993).** Emission of carbonyl sulfide by *Thiobacillus thioparus* grown with thiocyanate in pure and mixed cultures. *FEMS Microbiol Lett* **114**, 223-227.
- **Katayama, Y., Matsushita, Y., Kaneko, M., Kondo M., Mizuno, T. and Nyunoya, H. (1998).** Cloning of genes coding for the three subunits of Thiocyanate hydrolase of *Thiobacillus thioparus* THI115 and their evolutionary relationships to nitrile hydratase. *J Bacteriol* **180**, 2583-2589.
- **Kato, H., Saito, M., Nagahata, Y. and Katayama, Y. (2008).** Degradation of ambient carbonyl sulfide by *Mycobacterium* spp. in soil. *Microbiology* **154**, 249-255.
- **Kelly, D.P., Wood, A.P. and Stackebrandt, E. (2005).** *Thiobacillus*. Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. doi:10.1002/9781118960608.gbm00969.

- **Kesselmeier, J., Teusch, N. and Kuhn, U. (1999).** Controlling variables for the uptake of atmospheric carbonyl sulfide by soil. *J Geophys Res* **104**, 11577-11584.
- **Kettle, A. J., Kuhn, U., Hobe M. von, Kesselmeier J., and Andreae M. O. (2002).** Global budget of atmospheric carbonyl sulfide: Temporal and spatial variations of the dominant sources and sinks. *J Geophys Res* **107 (D22)**, 4658.
- **Khalifah, R. G. (1971).** The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. *J Biol Chem* **246**, 2561-2573.
- **Khalil, M. A. K. and Rasmussen, R. A. (1984).** Global sources, lifetimes and mass balances of carbonyl sulfide (OCS) and carbon disulfide (CS<sub>2</sub>) in the earth's atmosphere. *Atmos Environ* **18**, 1805-1813.
- **Kim, S-J. and Katayama, Y. (2000).** Effect of growth conditions on thiocyanate degradation and emission of carbonyl sulfide by *Thiobacillus thioparus* TH1115. *Wat Res* **34**, 2887-2894.
- **Kimber, M. S. and Pai, E. F. (2000).** The active site architecture of Pisum sativum β-carbonic anhydrase is a mirror image of that of α-carbonic anhydrases. *EMBO J* **19**, 1407-1418.
- **Kisker, C., Schindelin, H., Alber, B.E., Ferry, J.G. and Rees, D.C. (1996).** A left-handed β-helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *EMBO J* **15**, 2323-2330.
- **Kondrat'eva, E.N., Mekhtieva, V.L. and Sumarokova, R.S. (1966).** Concerning the directionality of the isotope effect in the first steps of sulphide oxidation by purple bacteria. *Vest Mosk Univ Ser VI VI*, 45-48 (In Russian).
- **Kusumi, A, Li, X. S. and Katayama, Y. (2011).** Mycobacteria isolated from Angkor monument sandstones grow chemolithoautotrophically by oxidizing elemental sulfur. *Front Microbiol* DOI: 10.3389/fmicb.2011.00104.
- **Lane, T. W., Saito, M. A., George, G. N., Pickering, I. J., Prince, R. C. and Morel, F. M. M. (2005).** A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* **435**, 42.
- **Launois, T., Peylin, P., Belviso, S. and Poulter, B. (2015).** A new model of the global biogeochemical cycle of carbonyl sulfide – Part 2: Use of carbonyl sulfide to constrain gross primary productivity in current vegetation models. *Atmos Chem Phys* **15**, 9285-9312.
- **Leavitt, W.D., Bradley, A.S., Santos, A.A., Pereira, I.A.C. and Johnston, D.T. (2015).** Sulfur isotope effects of dissimilatory sulfite reductase. *Front Microbiol* doi: 10.3389/fmicb.2015.01392.
- **Lehmann, S. and Conrad, R. (1996).** Characteristics of turnover of carbonyl sulfide in four different soils. *J Atmos Chem* **23**, 193–207.
- **Li, X. S., Sato, T., Ooiwa, Y., Kusumi, A., Gu, J-D. and Katayama, Y. (2010).** Oxidation of elemental sulfur by *Fusarium solani* strain THIF01 harboring endobacterium *Bradyrhizobium* sp. *Microb Ecol* **60**, 96-104.



- **Lin, Y., Sim, M. S. and Ono, S. (2011).** Multiple-sulfur isotope effects during photolysis of carbonyl sulfide. *Atmos Chem Phys* **11**, 10283–10292.
- **Liu, J., Geng, C., Mu, Y., Zhang, Y., Xu, Z. and Wu, H. (2010).** Exchange of carbonyl sulfide (COS) between the atmosphere and various soils in China. *Biogeosciences* **7**, 753–762.
- **Lorimer, G. H. and Pierce, J. (1989).** Carbonyl sulfide: an alternate substrate for but not an activator of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *J Biol Chem* **264**, 2764-2772.
- **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- **Mariotti, A., Germon, J.C., Hubert, P., Kaiser, P., Letolle, R., Tardieux, A. and P. Tardieux. (1981).** Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: Some principles; illustration for the denitrification and nitrification processes. *Plant Soil* **62**, 413-430.
- **Masaki, Y., Ozawa, R., Kageyama, K. and Katayama, Y. (2016).** Degradation and emission of carbonyl sulfide, an atmospheric trace gas, by fungi isolated from forest soil. *FEMS Microbiol Lett* **363**, fnw197  
doi:10.1093/femsle/fnw197.
- **Maseyk, K., Berry, J.A., Billesbach, D., Campbell, J. E., Torn, M. S., Zahniser, M. and Seibt, U. (2014).** Sources and sinks of carbonyl sulfide in an agricultural field in the Southern Great Plains. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 9064–9069.
- **McCready, R.G.L. and Krouse, H.R. (1982).** Sulfur isotope fractionation during the oxidation of elemental sulfur by thiobacilli in a solonchic soil. *Can J Soil Sci* **62**, 105-110.
- **Mekhtieva, V.L. and Kondrat'eva, E.N. (1966).** Fractionation of stable isotopes of sulfur by photosynthesizing purple sulfur bacteria *Rhodospseudomonas* sp. *Dokl Akad Nauk SSSR* **166**, 80-83 (In Russian).
- **Meldrum, N. N. and Roughton, F. J. W. (1933).** Carbonic anhydrase: its preparation and properties. *Nature* **80**, 113-142.
- **Melillo, J.M. and Steudler, P.A. (1989).** The effect of nitrogen fertilization on the COS and CS<sub>2</sub> emissions from temperate forest soils. *J Atmos Chem* **9**, 411–417.
- **Miller, A. G., Espie, G. S. and Canvin, D. T. (1989).** Use of carbon oxysulfide, a structural analog of CO<sub>2</sub>, to study active CO<sub>2</sub> transport in the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. *Plant Physiol* **90**, 1221-1231.
- **Mills, R. and Harris, K.R. (1976).** The effect of isotopic substitution on diffusion in liquids. *Chem Soc Rev* **5**, 215-231.
- **Minakuchi, T., Nishimori, I., Vullo, D., Scozzafava, A. and Supuran, C. T. (2009).** Molecular cloning, characterization, and inhibition studies of the Rv1284 β-carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis* with sulfonamides and a sulfamate. *J Med Chem* **52**, 2226-2232.
- **Mitsubishi, S., Mizushima, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Moriyama, H., Ueki, T. and**

- Miyachi S. (2000).** X-ray structure of  $\beta$ -carbonic anhydrase from the red alga *Porphyridium purpureum*, reveals a novel catalytic site for CO<sub>2</sub> hydration. *J Biol Chem* **275**, 5521-5526.
- **Montzka, S. A., Aydin, M., Battle, M., Saltzman, E. S., Hall, B. D., Clarke, A. D., Mondeel, D. and Elkins, W. (2004).** A-350-year atmospheric history for carbonyl sulfide inferred from Antarctic firn air and air trapped in ice. *J Geophys Res: Atmos* **109**, D22302.
  - **Montzka, S. A., Calvert, P., Hall, B. D., Elkins, J. W., Conway, T. J., Tans, P. P. and Sweeney, C. (2007).** On the global distribution, seasonality, and budget of atmospheric carbonyl sulfide (COS) and some similarities to CO<sub>2</sub>. *J Geophys Res* **112**, D09302.
  - **Murshudov, G. N., Vagin, A. A. and Dodson, E. J. (1997).** Refinement of macromolecular structure by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst* **D53**, 240-255.
  - **Nakai, N., and Jensen, M.L. (1964).** The kinetic isotope effect in the bacterial reduction and oxidation of sulfur. *Geochim Cosmochim Acta* **28**, 1893-1912.
  - **Neish, A. C. (1939).** Studies on chloroplasts. Their chemical composition and the distribution of certain metabolites between the chloroplasts and the remainder of the leaf. *Biochem J* **33**, 300-308.
  - **Nishida, H., Beppu, T. and Ueda, K. (2009).** Symbiobacterium lost carbonic anhydrase in the course of evolution. *J Mol Evol* **68**, 90-96.
  - **Nishimori, I., Minakuchi, T., Vullo, D., Scozzafava, A., Innocenti, A. and Supuran, C. T. (2009).** Carbonic anhydrase inhibitors. Cloning, characterization, and inhibition studies of a new  $\beta$ -carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Chem* **52**, 3116-3120.
  - **Notni, J., Schenk, S., Protoschill-Krebs, G., Kesselmeier, J. and Anders, E. (2007).** The missing link in COS metabolism: A model study on the reactivation of carbonic anhydrase from its hydrosulfide analogue. *Chembiochem* **8**, 530-536.
  - **Ogée, J., Sauze, J., Kesselmeier, J., Genty, B., Van Diest, H., Launois, T. and Wingate, L. (2016).** A new mechanistic framework to predict OCS fluxes from soils. *Biogeosciences* **13**, 2221-2240.
  - **Okabe, K., Yang, S.-Y., Tsuzuki, M. and Miyachi, S. (1984).** Carbonic anhydrase: its content in spinach leaves and its taxonomic diversity studied with anti-spinach leaf carbonic anhydrase antibody. *Plant Sci Lett* **33**, 145-153.
  - **O'Leary, M.H. (1988).** Carbon isotopes in photosynthesis: Fractionation techniques may reveal new aspects of carbon dynamics in plants. *BioScience* **38**, 328-336.
  - **Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997).** Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol* **276**, 307-326.
  - **Park, R. and Epstein, S. (1960).** Carbon isotope fractionation during photosynthesis. *Geochim Cosmochim Acta* **21**, 110-126.

- **Petřek, M., Otyepka, M., Banáš, P., Košinová, P., Koča, J. and Damborský, J. (2006).** CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC Bioinf* **7**, 316.
- **Pitari, G., Mancini, E., Rizi, V. and Shindell, D. T. (2002).** Impact of future climate and emission changes on stratospheric aerosols and ozone. *J Atmos Sci* **59**, 414-440.
- **Pocker, Y. and Meany, J. E. (1965).** The catalytic versatility of carbonic anhydrase from erythrocytes: the enzyme-catalyzed hydration of acetaldehyde. *J Am Chem Soc* **87**, 1809-1811.
- **Pocker, Y. and Stone, J. T. (1965).** The catalytic versatility of carbonic anhydrase: the enzyme-catalyzed hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate. *J Am Chem Soc* **87**, 5497-5498.
- **Protoschill-Krebs, G. and Kesselmeier, J. (1992).** Enzymatic pathways for the consumption of carbonyl sulphide (COS) by higher plants. *Bot Acta* **105**, 206-212.
- **Protoschill-Krebs, G., Wilhelm, C. and Kesselmeier, J. (1995).** Consumption of carbonyl sulphide by *Chlamydomonas reinhardtii* with different activities of carbonic anhydrase (CA) induced by different CO<sub>2</sub> growing regimes. *Bot Acta* **108**, 445-448.
- **Protoschill-Krebs, G., Wilhelm, C. and Kesselmeier, J. (1996).** Consumption of carbonyl sulphide (COS) by higher plant carbonic anhydrase (CA). *Atmos Environ* **30**, 3151-3156.
- **Pullan, L. M. and Noltmann, E. A. (1985).** Specific arginine modification at the phosphatase site of muscle carbonic anhydrase. *Biochemistry* **24**, 635-640.
- **R Core Team. (2017).** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- **Rees, C.E. (1973).** A steady-state model for sulphur isotope fractionation in bacterial reduction processes. *Geochim Cosmochim Acta* **37**, 1141-1162.
- **Romero, A.B. and Thiemens, M.H. (2003).** Mass-independent sulfur isotopic compositions in present-day sulfate aerosols. *J Geophys Res: Atmos* **108**, 4524.
- **Rowlett, R. S. (2010).** Structure and catalytic mechanism of the  $\beta$ -carbonic anhydrases. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **1804**, 362-373.
- **Saito, M., Honna, T., Kanagawa, T. and Katayama, Y. (2002).** Microbial degradation of carbonyl sulfide in soil. *Microbes Environ* **17**, 32-38.
- **Sassetti, C. M., Boyd, D. H. and Rubin, E. J. (2003).** Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* **48**, 77-84.
- **Sassetti, C. M. and Rubin, E. J. (2003).** Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **28**, 12989-12994.
- **Savarino, J., Romero, A., Cole-Dai, J., Bekki, S. and Thiemens., M.H. (2003).** UV induced mass-independent sulfur isotope fractionation in stratospheric volcanic sulfate. *Geophys Res Lett* **30**, 2131.

- **Sawaya, M.R., Cannon, G.C., Heinhorst, S., Tanaka, S., Williams, E.B., Yeates, T.O. and Kerfeld, C.A. (2006).** The structure of  $\beta$ -carbonic anhydrase from the carboxysomal shell reveals a distinct subclass with one active site for the price of two. *J Biol Chem* **281**, 7546-7555.
- **Schenk, S., Kesselmeier, J. and Anders, E. (2004).** How does the exchange of one oxygen atom with sulfur affect the catalytic cycle of carbonic anhydrase? *Chem Eur J* **10**, 3091-3105.
- **Schmidt, J. A., Johnson, M. S., Hattori, S., Yoshida, N., Nanbu, S. and Schinke, R. (2013).** OCS photolytic isotope effects from first principles: sulfur and carbon isotopes, temperature dependence and implications for the stratosphere. *Atmos Chem Phys* **13**, 1511–1520.
- **Schürner, H.K.V., Seffernick, J.L., Grzybkowska, A., Dybala-Defratyka, A., Wackett, L.P. and Elsner, M. (2015).** Characteristic isotope fractionation patterns in *s* triazine degradation have their origin in multiple protonation options in the *s* triazine hydrolase TrzN. *Environ Sci Technol* **49**, 3490-3498.
- **Seefeldt, L. C., Morgan, T. V., Dean, D. R. and Mortenson, L. E. (1992).** Mapping the site(s) of MgATP and MgADP interaction with the nitrogenase of *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem* **267**, 6680-6688.
- **Seefeldt, L. C., Rasche, M. E. and Ensign, S. A. (1995).** Carbonyl sulfide and carbon dioxide as new substrates, and carbon disulfide as a new inhibitor, of nitrogenase. *Biochemistry* **34**, 5382-5389.
- **Seffernick, J.L., Reynolds, E., Fedorov, A.A., Fedorov, E., Almo, S.C., Sadowsky, M.J. and Wackett, L.P. (2010).** X-ray structure and mutational analysis of the atrazine chlorohydrolase TrzN. *J Biol Chem* **285**, 30606-30614.
- **Seibt, U., Kesselmeier, J., Sandoval-Soto, L., Kuhn, U. and Berry, J.A. (2010).** A kinetic analysis of leaf uptake of COS and its relation to transpiration, photosynthesis and carbon isotope fractionation. *Biogeosciences* **7**, 333-341.
- **Seto, M. and Tange, I. (1980).** Rapid and sensitive method for the determination of total organic carbon in soil by potassium persulfate-nondispersive infrared gas analyzer. *J Sci Soil Manure Jpn* **51**, 27–30 (In Japanese).
- **Sheldrick, G. M. (2008).** A short history of *SHELX*. *Acta Cryst A* **64**, 112-122.
- **Sheng, J-X., Welsenstein, D. K., Luo, B-P., Rozanov, E., Stenke, A., Anet, J., Bingemer, H. and Peter, T. (2015).** Global atmospheric sulfur budget under volcanically quiescent conditions: Aerosol-chemistry-climate model predictions and validation. *J Geophys Res: Atmos* **120**, 256–276.
- **Shiraiwa, Y. and Miyachi, S. (1979).** Enhancement of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylation reaction by carbonic anhydrase. *FEBS Lett* **106**, 243–246.
- **Silverman, D. N. (1982).** Carbonic anhydrase: oxygen-18 exchange catalyzed by an enzyme with rate-contributing proton-transfer steps. *Methods Enzymol* **87**, 732-752.
- **Sippl, M. J. and Wiederstein, M. (2008).** A note on difficult structure alignment problems. *Bioinformatics* **24**, 426-427.

- Smeulders, M. J., Barends, T. R. M., Pol, A., Scherer, A., Zandvoort, M. H., Udvarhelyi, A., Khadem, A. F., Menzel, A., Hermans, J., Shoeman R. L., Wessels, H. J. C. T., van den Heuvel, L. P., Russ, L., Schlichting, I., Jetten, M. S. M. and Op den Camp, H. J. M. (2011). Evolution of a new enzyme for carbon disulphide conversion by an acidothermophilic archaeon. *Nature* **478**, 412-416.
- Smeulders, M. J., Pol, A., Venselaar, H., Barends, T. R. M., Hermans, J., Jetten, M. S. M. and Op den Camp, H. J. M. (2013). Bacterial CS<sub>2</sub> hydrolases from *Acidithiobacillus thiooxidans* strains are homologous to the archaeal catenane CS<sub>2</sub> hydrolase. *J Bacteriol* **195**, 4046–4056.
- Smith, N. A. and Kelly, D. P. (1988). Oxidation of carbon disulphide as the sole source of energy for the autotrophic growth of *Thiobacillus thioparus* strain TK-m. *Microbiology* **134**, 3041-3048.
- Smith, K. N., Klasson, K. T., Ackerson, M. D., Clausen, E. C. and Gaddy, J. L. (1991). COS degradation by selected CO-utilizing bacteria. *Appl Biochem Biotechnol* **28-29**, 787-796.
- Smith, K. S. and Ferry, J. G. (1999). A plant-type (β-class) carbonic anhydrase in the Thermophilic Methanoarchaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J Bacteriol* **181**, 6247-6253.
- Smith, K. S., Jakubzick, C., Whittam, T. S. and Ferry, J. G. (1999). Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **96**, 15184-15189.
- Smith, K. S. and Ferry, J. G. (2000). Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 335-366.
- Solomon, S. (1999). Stratospheric ozone depletion: A review of concepts and history. *Rev Geophys* **37**, 275-316.
- Solomon, S., Daniel, J. S., Neely, R. R., Vernier, J.-P., Dutton, E. G. and Thomason, L. W. (2011). The persistently variable “background” stratospheric aerosol layer and global climate change. *Science* **333**, 866-870.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Lysenko, A. M. and Kuenen, J. G. (2001). Microbial thiocyanate utilization under highly alkaline conditions. *Appl Environ Microbiol* **67**, 528-538.
- Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., Bezsoudnova, E.Y., Pol, A. and Muyzer, G. (2007). Denitrification in a binary culture and thiocyanate metabolism in *Thiohalophilus thiocyanoxidans* gen. nov. sp. nov. – a moderately halophilic chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing *Gammaproteobacterium* from hypersaline lakes. *Arch Microbiol* **187**, 441–450.
- Sra, A.K., Hu, Y., Martin, G.E., Snow, D.D., Ribbe, M.W. and Kohen, A. (2004). Competitive <sup>15</sup>N kinetic isotope effects of nitrogenase-catalyzed dinitrogen reduction. *J Am Chem Soc* **126**, 12768-12769.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A. and Ward-Rainey, N.L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 479–91.
- Staudinger, J. and Roberts, P. V. (2001). A critical compilation of Henry’s law constant temperature dependence relations for organic compounds in dilute aqueous solutions. *Chemosphere* **44**, 561-576.
- Steele, H.M., Eldering, A., Sen, B., Toon, G. C., Mills, F. P. and Kahn, B. H. (2003). Retrieval of stratospheric aerosol size and composition information from solar infrared transmission spectra. *Appl Opt* **42**,

2140-2154.

- **Stimler, K., Montzka, S.A., Berry, J.A., Rudich, Y. and Yakir, D. (2010).** Relationships between carbonyl sulfide (COS) and CO<sub>2</sub> during leaf gas exchange. *New Phytol* **186**, 869-878.
- **Strop, P., Smith, K. S., Iverson, T. M., Ferry, J. G. and Rees, D. C. (2001).** Crystal structure of the “cab”-type β class carbonic anhydrase from the archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J Biol Chem* **276**, 10299-10305.
- **Sun, W., Maseyk, K., Lett, C. and Seibt, U. (2015).** A soil diffusion–reaction model for surface COS flux: COSSM v1. *Geosci Model Dev* **8**, 3055-3070.
- **Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011).** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-2739.
- **Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A. and Kumar, S. (2013).** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725–2729.
- **Taylor, B.E., Wheeler, M.C. and Nordstrom, D.K. (1984).** Stable isotope geochemistry of acid mine drainage: Experimental oxidation of pyrite. *Geochim Cosmochim Acta* **48**, 2669-2678.
- **Taylor, G. E., McLaughlin, S. B., Shriner, D. S. and Selvidge, W. J. (1983).** The flux of sulfur-containing gases to vegetation. *Atmos Environ* **17**, 789-796.
- **Tobin, A. J. (1970).** Carbonic anhydrase from parsley leaves. *J Biol Chem* **245**, 2656-2666.
- **Tripp, B. C., Smith, K. and Ferry, J. G. (2001).** Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. *J Biol Chem* **276**, 48615-48618.
- **Turco, R. P., Whitten, R. C., Toon, O. B., Pollack, J. B. and Hamill, P. (1980).** OCS, stratospheric aerosols and climate. *Nature* **283**, 283-286.
- **Ueda, K., Nishida, H. and Beppu, T. (2012).** Dispensabilities of carbonic anhydrase in Proteobacteria. *Int J Evol Biol* **2012**, Article ID 324549.
- **Ueno, Y., Johnson, M. S., Danielache, S. O., Eskebjerg, C., Pandey, A. and Yoshida, N. (2009).** Geological sulfur isotopes indicate elevated OCS in the Archean atmosphere, solving faint young sun paradox. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **106**, 14784-14789.
- **Vagin, A. and Teplyakov, A. (1997).** MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J Appl Crystallogr* **30**, 1022-1025.
- **Vullo, D., Nishimori, I., Minakuchi, T., Scozzafava, A. and Supuran, C. T. (2011).** Inhibition studies with anions and small molecules of two novel β-carbonic anhydrases from the bacterial pathogen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Bioorg Med Chem Lett* **21**, 3591-3595.
- **Watts, S. F. (2000).** The mass budgets of carbonyl sulfide, dimethyl sulfide, carbon disulfide and hydrogen

sulfide. *Atmos Environ* **34**, 761-779.

- **Weiss, P.M., Cheau-Yun, C., Cleland, W.W. and Cook, P.F. (1988).** Use of Primary deuterium and <sup>15</sup>N isotope effects to deduce the relative rates of steps in the mechanisms of alanine and glutamate dehydrogenases. *Biochemistry* **27**, 4814-4822.
- **Whelan, M.E., Lennartz, S.T., Gimeno, T.E., Wehr, R., Wohlfahrt, G., Wang, Y., Kooijmans, M.J., Hilton, T.W., Belviso, S., Peylin, P., Commane, R., Sun, W., Chen, H., Kuai, L., Mammarella, I., Maseyk, K., Berkelhammer, M., Li, K-F., Yakir, D., Zumkehr, A., Katayama, Y., Ogée, J., Spielmann, F.M., Kitz, F., Rastogi, B., Kesselmeier, J., Marshall, J., Erkkilä, K-M., Wingate, L., Meredith, L.K., He, W., Bunk, R., Launois, T., Vesala, T., Schmidt, J.A., Fichot, C.G., Seibt, U., Saleska, S., Saltzman, E.S., Montzka, S.A., Berry, J.A. and Campbell, J.E. (2017).** Review and syntheses: carbonyl sulfide as a multi-scale tracer for carbon and water cycles. *Biogeosciences Discuss.*, doi.org/10.5194/bg-2017-427.
- **Whelan, M.E., Min, D-H. and Rhew, R.C. (2013).** Salt marsh vegetation as a carbonyl sulfide (COS) source to the atmosphere. *Atmos Environ* **73**, 131–137.
- **Whelan, M.E. and Rhew, R.C. (2015).** Carbonyl sulfide produced by abiotic thermal and photodegradation of soil organic matter from wheat field substrate. *J Geophys Res Biogeosci* **120**, 54–62.
- **Whelan, M.E., Hilton, T.W., Berry, J.A., Berkelhammer, M., Desai, A. R. and Campbell, J. E. (2016).** Carbonyl sulfide exchange in soils for better estimates of ecosystem carbon uptake. *Atmos Chem Phys* **16**, 3711–3726.
- **Wilbur, K. M. and Anderson, N. G. (1948).** Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *J Biol Chem* **176**, 147-154.
- **Wilhelm, E., Battino, R. and Wilcock, R. J. (1977).** Low-pressure solubility of gases in liquid water. *Chem Rev* **77**, 219-262.
- **Yamazaki, T., Hozuki, T., Arai, K., Toyoda, S., Koba, K., Fujiwara, T. and Yoshida, N. (2014).** Isotopomeric characterization of nitrous oxide produced by reaction of enzymes extracted from nitrifying and denitrifying bacteria. *Biogeosciences* **11**, 2679-2689.
- **Yoneyama, T., Kamachi, K., Yamaya, T. and Mae, T. (1993).** Fractionation of nitrogen isotopes by glutamine synthetase isolated from spinach leaves. *Plant Cell Physiol* **34**, 489-491.
- **Zerkle, A.L., Farquhar, J., Johnston, D.T., Cox, R.P. and Canfield, D.E. (2009).** Fractionation of multiple sulfur isotopes during phototrophic oxidation of sulfide and elemental sulfur by a green sulfur bacterium. *Geochim Cosmochim Acta* **73**, 291-306.
- **小川貴弘 (2005).** 大腸菌を用いた *Thiobacillus thioparus* THI115 由来の COS 加水分解酵素の大量発現ならびにその精製, 東京農工大学大学院農学教育部物質循環環境科学専攻 平成 16 年度修士論文.
- **齋藤匡彦 (2003).** 土壌における硫化カルボニル (COS) のフラックスおよび微生物による COS の生産

と消費, 東京農工大学大学院連合農学研究科資源・環境学専攻 平成 14 年度学位論文.

- 長畑善子 (2003). *Thiobacillus thioparus* THI115 の COS 分解酵素の精製とその酵素学的性質及びクローニング, 東京農工大学大学院農学研究科物質循環環境科学専攻 平成 14 年度修士論文.



補足情報

Table S1. The nucleotide sequences determined in the chapter 3.

| Plasmid | Sequencing primer <sup>a</sup> | Nucleotide sequences including primer regions shown in red   | Number of bases |
|---------|--------------------------------|--|-----------------|
| THI401  |                                |  |                 |
| 1       | F                              | <b>GGCCTGTATGGATGCTCG</b> CCTGGACGTGTACGGATCCTGGGGCTGGCCGACGGTGAGGCGCACGTCATCCGCAACGCCGG<br>CGGGTGGTGACCGACGACGAGATCCGATCCCTTGCCATCAGCCAGCGCCTGCTGGGCACCCGCGAGATCATCCTGATCCA<br><b>CCACACCCGATGCGGCATG</b> | 181             |
| 1       | R                              | Reverse complementary sequence of the above.   | 181             |
| THI402  |                                |  |                 |
| 1       | F                              | <b>GGCGTGTATGGATGCTCG</b> GCTGGACGTCTACGGGTCTTGGGCCTCAAAGATGGTGAGGCACATGTCATTCCGAATGCCGG<br>CGGTGTGATCACCGACGACGAGATCCGGTCGCTGGCGATCAGTCAGCGCTTGCTGGGCACCAAGGAGATCATCCTCATCCA<br><b>CCACACCCGCTGCGGA</b>   | 178             |
| 1       | R                              | Reverse complementary sequence of the above.   | 178             |
| 2       | F                              | Sequence identical to the above “THI402 plasmid 1”.  | 178             |

THI403

|   |   |  |     |
|---|---|--|-----|
| 1 | F | <p><b>TGCCGCAGCGTGTGTG</b>GTGGATGAGGATGATCTCTCTGGTGCCAGCAGGCGCTGGCTGATCGCCAGCGAGCGAATCTCGT<br/>           CATCGGTGACCACGCCTCCGGCATTCCGAATGACATGTGCCTCACCATCTTTGAGGCCAGAATCCGGTAGACGTCCAGCC<br/> <b>GGGCATCCATACAGCC</b></p>    | 179 |
| 1 | R | Reverse complementary sequence of the above.   | 179 |
| 2 | F | <p><b>CATGCCGCAGCGGGTGTG</b>GTGGATGAGGATGATCTCTCTGGTGCCAGCAGGCGCTGGCTGATCGCCAGCGAGCGAATCTC<br/>           GTCATCGGTGACCACGCCTCCGGCATTCCGAATGACATGTGCCTCACCATCTTTGAGGCCAGAATCCGGTAGACGTCCAG<br/> <b>CCGAGCATCCATACAGCC</b></p>  | 181 |
| 2 | R | Reverse complementary sequence of the above.   | 181 |
| 3 | F | <p><b>GTGGCGTGTATGGATGCGCG</b>GCTGGACGTCTACCGGATTCTGGGCCTCAAAGATGGTGAGGCACATGTCATTCCGAATGCC<br/>           GGAGGCGTGGTCACCGATGACGAGATTCGCTCGCTGGCGATCAGCCAGCGCCTGCTGGGCACCAGAGAGATCATCCTCATC<br/> <b>CACCACACCCGCTGCGG</b></p> | 179 |
| 3 | R | Reverse complementary sequence of the above.   | 179 |

THI404

|   |   |  |     |
|---|---|--|-----|
| 1 | F | <p><b>GGCGTGTATGGATGCCCG</b>GCTGGACGTCTACCGGATCCTGGGCCTCAAAGATGGTGAGGCACATGTCATTTCGGAATGCCGG<br/>         AGGCGTGATCACCGATGACGAGATCCGTTTCGCTGGCGATCAGTCAGCGCCTGCTGGGCACCAGGGAGATCATCCTCATCCA<br/> <b>CCACACACGCTGCGGCATG</b></p>   | 181 |
| 1 | R | Reverse complementary sequence of the above.   | 181 |
| 2 | F | <p><b>GGCGTGCATGGATGCCCG</b>GCTGGACGTCTACCGGATCCTGGGCCTCAAAGATGGTGAGGCACATGTCATTTCGGAATGCCGG<br/>         AGGCGTGATCACCGATGACGAGATCCGTTTCGCTGGCGATCAGTCAGCGCCTGCTGGGCACCAGGGAGATCATCCTCATCCA<br/> <b>CCACACCAGATGCGGCATGCT</b></p> | 183 |
| 3 | F | <p><b>CATCCCGCAGCGGGTGTG</b>GTGGATGAGGATGATCTCCCTGGTGCCAGCAGGCGCTGACTGATGCCAGCGAACGGATCTC<br/>         GTCATCGGTGATCACGCCTCCGGCATTCCGAATGACATGTGCCTCACCATCTTTGAGGCCAGGATCCGGTAGACGTCCAG<br/> <b>CCGCGCATCCATACATGCCAC</b></p>      | 183 |

THI405

|   |    |   |     |
|---|----|---|-----|
| 1 | F  | <p><b>TGTCGCGTGTATGGATGCGCG</b>GCTGGACGTCTACCGCATCCTCGGGCTGGGCGACGGCGAGGCACACGTATCCGCAACGC<br/>         CGGCGGTGTCATCACCGACGACGAGATCCGGTCACTGG</p>  | 119 |
| 1 | F' | <p>ACGCCGGCGGTGTCATCACCGACGACGAGATCCGGTCACTGGCCATCAGCCAACGCCTGTTGGGCACCAAAGAGATCATCC<br/>         TCATCCAC<b>CACACCCGCTGCGGCATG</b></p>   | 107 |
| 1 | R  | <p><b>CATGCCCGCAGCGGGTGTG</b>GTGGATGAGGATGATCTCTTTGGTGCCCAACAGGCGTTGGCTGATGGCCAGTGACCGGATCTC<br/>         GTCGTGCGGTGATGACACCGCCGGCGTTGCGGATGACGTGTGCCTCGCCGTCGCCAGCCCAGGATGCGGTAGACGTCCAG<br/> <b>CCGCGCATCCATACACGCGACA</b></p> | 184 |

(Reverse complementary sequence of the above two sequences.)

THI410

|   |   |  |     |
|---|---|--|-----|
| 1 | F | <p><b>GTGGCGTGTATGGATGCCAG</b>GCTCGACGTCTACCGCATCCTCGGCCTCGGGGCCGGCGAAGCCCACGTCATCCGCAATGCC<br/> GGCGGCGTGGTGACCGACGACGAGATCCGGTCCCTCGCCATCAGCCAGCGCCTACTCGGGACCACCGAGATCATCCTCATC<br/> CAC<b>CACACCCGCTGCGGCATG</b></p> | 183 |
| 1 | R | Reverse complementary sequence of the above.   | 183 |
| 2 | F | <p><b>ATTCCGACGCGGTGTG</b>GTGGATGAGGATGATCTCGGTGGTCCCAGTAGGCGCTGGCTGATGGCGAGGGACCGGATCTCG<br/> TCGTCGGTCACCACGCCGCCGGCATTGCGGATGACGTGGGCTTCGCCGGCCCCGAGGCCGAGGATGCGGTAGACGTCGAGC<br/> CTGGCGTCCATACACGCA</p>             | 180 |
| 3 | F | <p><b>TGCGTGTATGGATGCCAG</b>GCTCGACGTCTACCGCATCCTCGGCCTCGGGGCCGGCGAAGCCCACGTCATCCGCAATGCCGG<br/> CGGCGTGGTGACCGACGACGAGATCCGGTCCCTCGCCATCAGCCAGCGCCTACTCGGGACCACCGAGATCATCCTCATCCA<br/> CCACACAAGCTGCGGCATGCT</p>        | 183 |
| 4 | F | <p><b>GGCGTGTATGGATGCCAG</b>GCTCGACGTCTACCGCATCCTCGGCCTCGGGGCCGGCGAAGCCCACGTCATCCGCAATGCCGG<br/> CGGCGTGGTGACCGACGACGAGATCCGGTCCCTCGCCATCAGCCAGCGCCTACTCGGGACCACCGAGATCATCCTCATCCA<br/> CCACACCCGCTGCGGCATG</p>          | 181 |

---

<sup>a</sup>Sequencing primers used in this study were pUC/M13 Forward Primer (5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3'), pUC/M13 Reverse Primer (5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'), and Degenerate PCR Forward Primer (5'-GTNGCNTGYATGGAYGCNMG-3'). These primers were shown as F, R and F', respectively.