

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 (β -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 (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 β -CA に類似した。結晶構造解析の結果、 β -CA 及び β -CA の酵素ファミリーである二硫化炭素 (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。 β -CA と CS_2 hydrolase には、高い COS 加水分解活性が報告されている。一方、 β -CA や CS_2 hydrolase の本来の反応である CO_2 水和活性は、COSase では 3~4 桁低く、 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、 β -CA に比べ COSase や CS_2 hydrolase では狭く、しかも疎水性であった。さらに、 CS_2 hydrolase には、 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 CO_2 や H_2S は、これらの経路を通過できるが、 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 β -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、 β -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、 β -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 CO^{34}S よりも CO^{32}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、 β -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。