

## 硫化カルボニル分解酵素の構造化学的研究

### Structural studies on carbonyl sulfide hydrolase from *Thiobacillus thioparus* THI115

野口恵一<sup>1\*</sup>, 高橋翔平<sup>2</sup>, 小川貴弘<sup>3</sup>, 大滝証<sup>2</sup>, 尾高雅文<sup>2</sup>, 養王田正文<sup>2</sup>, 片山葉子<sup>3</sup>

<sup>1</sup>東京農工大学機器分析施設, <sup>2</sup>大学院工学研究院 〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16,

<sup>3</sup>大学院農学研究院 〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8

#### 1 はじめに

硫化カルボニル (COS) は大気中に最も多く存在する硫黄化合物であり、自然界の生命活動だけでなく、化石燃料の燃焼等を通じ人為的にも発生している。COS は対流圏ではほとんど分解されず、成層圏で分解されエアロゾルの起源物質のひとつとなるため、地球の気候変動に影響を及ぼしている。最近、我々は、土壌細菌 *Thiobacillus thioparus* THI115 から COS を二酸化炭素と硫化水素に加水分解 ( $\text{COS} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S}$ ) する硫化カルボニル加水分解酵素 (COSase) を同定・単離し、その生化学的な解析を行った。アミノ酸配列の相同性検索の結果より、COSase は植物や真正細菌の持つ炭酸脱水酵素である  $\beta$ -炭酸脱水酵素 ( $\beta$ -CA) ファミリーに属することが予想されたが、二酸化炭素と炭酸水素イオンの相互変換活性 (CA 活性) は示さず、COS 分解のみを触媒する酵素であった。そこで本研究では、COSase の基質認識機構、反応機構を明らかにすることを目的に、*T. thioparus* THI115 由来 COSase 天然型、および、基質類似化合物複合体の結晶構造解析を行った。

#### 2 実験

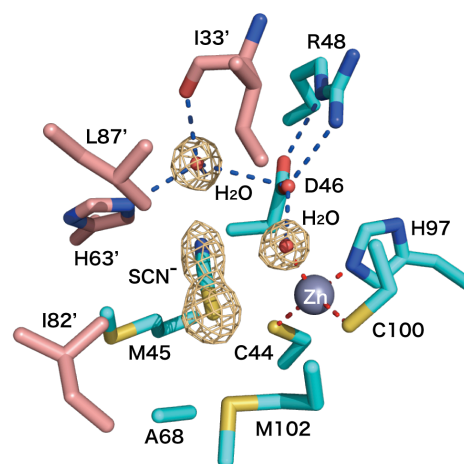
X線回折測定は高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設の BL-5A、BL-6A、NW12A ビームラインで行い、天然型は分解能 1.25 Å、基質類似化合物複合体は分解能 1.45 Å の回折強度データを収集した。*Mycobacterium tuberculosis* 由来  $\beta$ -CA Rv1284 の構造 (PDB ID:1YLK) をプローブとして、分子置換法プログラム Molrep を用いて初期構造を得た。構造精密化には SHELXL-97 を使用し、天然型 (PDB ID: 3VQJ) は  $R = 0.135$  ( $R_{\text{free}} = 0.170$ )、 $\text{SCN}^-$  との複合体 (PDB ID: 3VRK) は  $R = 0.159$  ( $R_{\text{free}} = 0.204$ ) の構造モデルを得た。

#### 3 結果および考察

天然型と  $\text{SCN}^-$  複合体の構造は同形であり、非対称単位はサブユニット 1 分子を含んでいた。

結晶中において、COSase は互いに垂直な 3 本の結晶学的 2 回軸で関係づけられるサブユニットとの間で四量体を形成していた。四量体は、二量体が二量化した構造と考えられ、基本となる二量体構造は、これまでに結晶解析された  $\beta$ -CA に共通した二量体構造と類似していた。サブユニット構造は、5 本の  $\beta$  ストランドからなる  $\beta$  シートの両面に 4 本の  $\alpha$  ヘリックスが接したコア部と、コア部から突出した 2 本の  $\alpha$  ヘリックスから構成される  $\alpha/\beta$  構造であった。

触媒部位には亜鉛イオンが存在し、亜鉛イオンに対し Cys44 と Cys100 の S 原子、His97 の N 原子、水分子が正四面体型に配位していた。この触媒部位の構造はこれまでに結晶解析された  $\beta$ -CA で共通して見出されていた構造とほぼ同一のものであった。基質ポケットは主に疎水性アミノ酸で形成されており、その大きさ、形状はともに基質である COS とよく一致していた。触媒部位からタンパク質表面までの基質経路について検討したところ、コア部から突出したヘリックス部分が触媒部位を覆うように存在するため、COSase は  $\beta$ -CA に比べ基質経路となるトンネルが狭いことが判った。COSase が CA 活性を示さない原因として、トンネルのサイズが関係している可能性が示唆された。



The catalytic site of COSase complex with thiocyanate.

\* knoguchi@cc.tuat.ac.jp