

硫化カルボニル加水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^{1*}, 小川貴弘², 尾高雅文³, 養王田正文³, 片山葉子²¹ 東京農工大学機器分析施設 〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16,² 東京農工大学大学院農学研究院 〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8,³ 東京農工大学大学院工学研究院, 〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16Keiichi Noguchi^{1*}, Takahiro Ogawa², Masafumi Odaka³, Masafumi Yohda³ and Yoko Katayama²¹Instrumentation Analysis Center, Tokyo University Agriculture & Technology, 2-24-16 Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan²United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo University Agriculture & Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu, Tokyo 183-8509, Japan³Graduate School of Technology, Tokyo University Agriculture & Technology, 2-24-16 Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

1 はじめに

Thiobacillus thioparus THI115 は、チオシアネート (SCN⁻) をエネルギー源とする土壌細菌であり、SCN⁻ を硫酸イオン (SO₄²⁻) にまで分解する代謝系を有している。この分解系の第一段階では、チオシアネート加水分解酵素 (SCNase) により SCN⁻ が硫化カルボニル (COS) とアンモニアに水和・加水分解される (SCN⁻ + 2H₂O → COS + NH₃ + OH⁻)。SCNase の機能や構造に関しては、これまでに SCNase が α、β、γ の 3 種のサブユニットから構成されたヘテロ 12 量体 (αβγ)₄ であり反応中心にコバルトを有すること、コバルトには 2 個の主鎖アミド窒素と 3 個の Cys のイオウ原子が配位していること、さらに、Cys 配位子のうち 2 つは、それぞれ、システインスルフィン酸 (Cys-SO₂H)、システインスルフェン酸 (Cys-SOH) に翻訳後修飾された極めて特異な構造を有することなどが明らかにされている。

近年、本学の片山らにより、SCN⁻ 分解系の二段階目に相当する COS を二酸化炭素と硫化水素に加水分解する反応 (COS + H₂O → CO₂ + H₂S) を触媒する硫化カルボニル加水分解酵素 (COSase) が同定・単離され、その生化学的な解析が行われた。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 β-炭酸脱水素酵素 (β-CA) ファミリーに属することが予想され、β-CA と同様に、サブユニットあたり 1 個の亜鉛原子を有することが確認された。β-CA は二酸化炭素と炭酸水素イオンの相互変換 (CO₂ + H₂O ⇌ HCO₃⁻ + H⁺) を触媒する酵素であり、植物においては二酸化炭素の濃度上昇を補助し、光合成による炭酸固定反応の増大に寄与している。エンドウから精製された β-CA など、COS 分解活性を示す β-CA の存在も確認されていたが、その反応は副次的な反応として捉えられていたに過ぎなかった。

T. thioparus THI115 由来 COSase は COS 分解活性は示すが、二酸化炭素と炭酸水素イオンの相互変換活性 (CA 活性) は示さない COS 分解のみを触媒する新奇な酵素である。さらに、土壌環境中には他にも COS 分解可能な微生物が数多く生育していることも明らかにされており、これら微生物の有する酵素が自然界での COS の消失源として重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、その立体構造等が不明なため、触媒機構についてはほとんど解明されていない。

そこで、本研究では、*T. thioparus* THI115 による SCN⁻ 分解系の第二段階を触媒する酵素である COSase の基質認識機構、触媒機構を解明することを目的として、COSase と基質類似化合物との複合体の結晶化とその X 線構造解析により活性中心近傍の立体構造について検討した。

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-17A、NE3A、NW12A ビームラインで行い、既に構造解析の終了した天然型の構造 (PDB ID: 3VQJ) 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 を使用した。

3 結果および考察

基質類似化合物との複合体結晶の構造解析の結果をもとに COSase と β-CA の活性部位の構造を比較したところ、COSase に見られたアミノ酸残基の変異箇所は基質分子の認識 (Met45, Ile82, Leu87, Met102) や反応サイクル (His63) に関与する可能性が高い部位であると予想された (図 1)。そこで、活性部位の Ile82 (あるいは Leu87) と His63 を、多くの β-CA で保存されているアミノ酸残基である Tyr と Phe にそれぞれ置換した変異体を作製し、そ

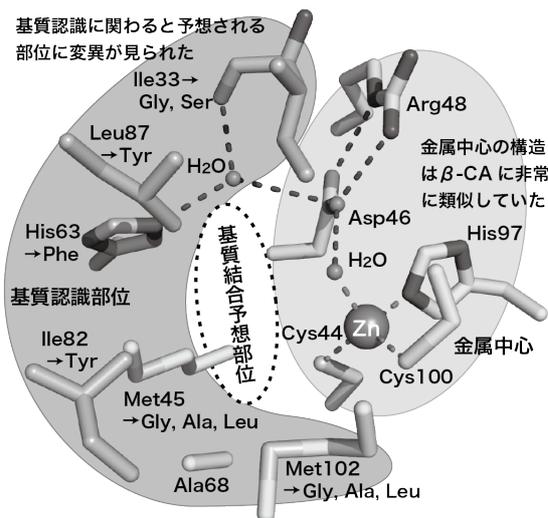


図1：COSaseの活性部位の構造。金属中心近傍の構造はβ-CAに類似しており、基質認識に関わると予想される部位に変異が見られた。本研究で導入した変異箇所を矢印に続いて示した。

これらのCOS分解活性やCA活性の評価を行うとともに、現在、変異体の結晶化条件の検討を進めている。また、COSaseの活性部位近傍には、β-CAの活性部位にはほとんど見られないMet残基が複数存在しており、これが活性部位空間の大きさ、形状、化学的性質に影響を与えていると考えられた。さらに、活性部位の奥に位置するIle33も反応キャビティの性質に関係していることが予想された。そこで、Met45やMet102をGly, Ala, Leuなどに、また、Ile33をGly, Serに置換した変異体の作製、酵素活性評価を行い、反応キャビティの改変にともなう基質との親和性や酵素反応の変化に関して検討するとともに、こちらの変異体に関しても結晶化条件の探索を行っている。

触媒部位を構成するアミノ酸残基の違いにより、β-CAはplant型とCab型に分類されている。触媒部位の特徴、および、全体的な立体構造の類似性からCOSaseはCab型に属すると考えられた。COSaseと立体構造既知のCab型β-CAについて、触媒部位からタンパク質表面に達する基質分子が通る経路を検討したところ、二量体コア部から突出したヘリックス部分(α5)が存在するためCOSaseはβ-CAに比べ基質経路となるトンネルが狭くなっていることが判った。β-CAはα5に相当する部位を持っていないことから、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(図2)。

4 まとめ

COSは大気中に最も高濃度で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、化石燃料の燃焼や化学物質の合成過程などを通じて人為的にも

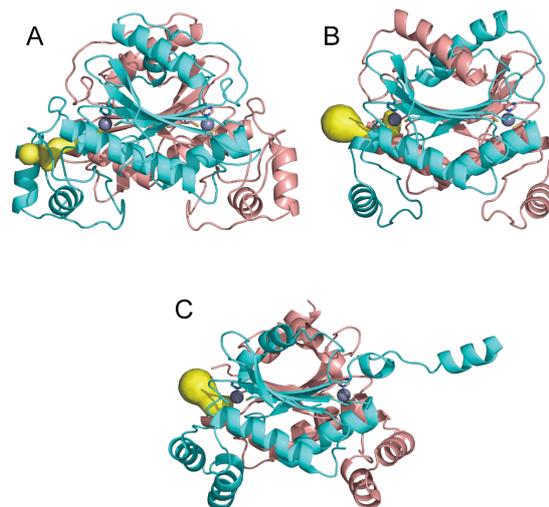


図2：COSaseとCab型β-CAの触媒部位からタンパク質表面に達する基質経路の比較。黄色の部分の基本二量体について予想される基質経路を表す。二量体の一方のサブユニットは水色で、他方を桃色で示し、灰色の丸は触媒部位の亜鉛原子を表す。(A) COSase、(B) *Mycobacterium tuberculosis* β-CA Rv1284 (PDB ID: 1YLK)、(C) *Methanobacterium thermoautotrophicum* β-CA (PDB ID: 1G5C)。

多量に発生している。COSは対流圏ではほとんど分解されず、成層圏で分解され硫酸エアロゾルの原因物質となるため、地球の気候変動に大きな影響を及ぼしている。大気化学の分野では、COSによる気候変動の将来予測のための調査が広く行われ、COSの消失源は主に植物や土壌への吸収によるものであると推定されている。従って、自然界においてCOS分解の主要な役割を果たしていると考えられる土壌細菌由来のCOS分解酵素による分解機構の解明が、地球上の硫黄循環や土壌中の硫黄集積に関する研究に与える影響は大きく、その意義も高いと考えられる。今後、部位特異的な変異体を用いて触媒機構に関する研究を引き続き進めることにより、基質選択性や酵素機能の改変、安定性の改良などが可能になれば、高活性、高選択的なCOSase変異体を用いた大気中からの効率的COS除去技術の開発に結びつくことが期待される。

成果

- Ogawa T, Noguchi K, Saito M, Nagahata Y, Kato H, Ohtaki A, Nakayama H, Dohmae N, Matsushita Y, Odaka M, Yohda M, Nyunoya H, Katayama Y, Carbonyl sulfide hydrolase from *Thiobacillus thioparus* strain TH115 is one of the β-carbonic anhydrase family enzymes, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 3818-3825 (2013), DOI: 10.1021/ja307735e.

* knoguchi@cc.tuat.ac.jp