

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22550147

研究課題名（和文） X線結晶構造解析による土壌細菌由来チオシアネート分解系酵素の触媒機構の解明

研究課題名（英文） Structural studies on carbonyl sulfide hydrolase from *Thiobacillus thioparus* strain THI115

研究代表者

野口 恵一 (NOGUCHI KEIICHI)

東京農工大学・学術研究支援総合センター・准教授

研究者番号：00251588

研究成果の概要（和文）：

地球の気候変動に影響を及ぼしている気体の一つである硫化カルボニルを加水分解する酵素の立体構造を決定し、基質選択機構について検討した。この酵素の全体構造や触媒部位の構造は、二酸化炭素を水和し炭酸と水素イオンを生成する反応を触媒する酵素に非常に類似していたが、基質の酵素への侵入口に違いが見られたことから、この部位が基質の選択性に関わっている可能性が示唆された。本研究成果を基に、この酵素の基質選択性、安定性、反応性を改良することにより、硫化カルボニルの効率的な除去法の開発につながる事が予想される。

研究成果の概要（英文）：

Carbonyl sulfide is an atmospheric trace gas leading to sulfate aerosol formation, thereby participating in the global radiation balance and ozone chemistry. In this study, the crystal structure of carbonyl sulfide hydrolase (COSase) from *Thiobacillus thioparus* strain THI115 was determined to clarify its substrate recognition mechanism. Although the overall structure including the catalytic site resembles those of the β -class carbonic anhydrases, the $\alpha 5$ helix of COSase narrows its substrate pathway, which could be responsible for the substrate specificity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：環境・金属酵素・X線回折・結晶構造・触媒機構・基質認識

1. 研究開始当初の背景

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 (SO_4^{2-}) にまで分解する代謝系を有している。チオシアネート加水分解酵素 (SCNase) は、この分解系の第一段階を触媒する酵素であり、 SCN^- を

水和・加水分解して硫化カルボニル (COS) とアンモニアを生産する ($\text{SCN}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{COS} + \text{NH}_3 + \text{OH}^-$)。SCNase の機能や構造に関して、本研究の連携研究者である尾高らを中心としたグループにより精力的に研究が進められており、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($\alpha\beta\gamma$)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。

2. 研究の目的

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 野生型、および、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。

3. 研究の方法

(1) COSase の詳細な立体構造情報を収集するために、COSase 野生型、および、COSase と基質類似化合物との複合体の結晶化と X 線結晶構造解析に行った。大腸菌によるタンパク質試料の大量発現系は既に構築済みで

あり、大腸菌の培養、タンパク質の発現、精製、結晶化には研究室に既設の設備を用いた。結晶の予備的な測定には、本学学術研究支援総合センターに既設の共同利用機器を使用し、構造解析に必要な回折データ収集は高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設 Photon Factory のタンパク質結晶用ビームライン BL-5A、BL-6A、NW12A を共同利用課題として利用した。回折データ処理、結晶構造解析に必要なソフトウェア等についても、研究室に既設のシステムを利用した。

(2) 結晶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、それらの COS 分解活性や CA 活性の評価を行った。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した。

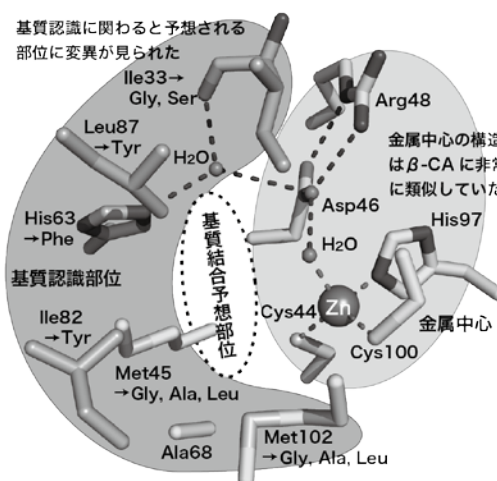


図 1 COSase の活性部位の構造。金属中心近傍の構造は β-CA に類似しており、基質認識に関わると予想される部位に変異が見られた。本研究で導入した変異箇所を矢印に続いて示した。

4. 研究成果

Photon Factory での X 線回折測定の結果、野生型は分解能 1.25 Å、基質類似化合物である SCN⁻ との複合体は分解能 1.45 Å での強度データ収集に成功した。 *Mycobacterium tuberculosis* 由来 β-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、野生型 (PDB ID: 3VQJ) は $R = 0.135$ ($R_{\text{free}} = 0.170$)、SCN⁻ との複合体 (PDB ID: 3VRK) は $R = 0.159$ ($R_{\text{free}} = 0.204$) の構造モデルを得て、結果を蛋白質構造データベース (PDB) に登録した。本研究の成果は、関連した酵素の構造解析の中でも高分解能での解析結果であり、類似した触媒機構の検討にも有用な構造情報になると考えられる。

全体構造: 野生型と SCN⁻ 複合体の構造は同形であり、結晶学的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。分子量測定の結果より、水溶液中でも四量体を形成していることが確認できたことから、結晶中での四量体構造は生物学的構造単位であると考えられる。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 β-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 β ストランドからなるオープン β シートの両面に 4 本の α ヘリックスが接しているコア部と、コア部から突出した 2 本の α ヘリックスから構成される α / β 構造であった (図 2)。基本的二量体構造中では、2 つのサブユニットの 10 本のストランドが連続した β シートを形成しており、サブユニット間の相互作用面積は 3420 Å² (サブユニット表面積の約 31 %) であった。一方、四量体形成における相互作用面積はサブユニット当たり 960 Å² であり、四量体化の相互作用は二量体化のそれに比べ弱いと考えられた。

触媒部位の構造: 触媒部位は基本的二量体の界面に存在し、溶媒領域からほぼ完全に遮蔽されていた。β-CA のアミノ酸配列との比較から予想されたように、亜鉛イオンには、Cys44 と Cys100 の硫黄原子、His97 の窒素原子が正四面体型に配位していた (図 3)。β-CA では、4 番目の配座には水分子、あるいは近接した Asp の側鎖カルボキシレート基の酸素が配位した構造が報告されているが、COSase 野生型、SCN⁻ 複合体では、ともに水分子が配位していた。この活性部位の構造はこれまでに結晶解析された β-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。基質類似化合物 SCN⁻ は亜鉛の第四配座の水分子から約 2.9 Å の位置にあり、基質

ポケットを形成しているアミノ酸側鎖原子と van der Waals 接触程度の距離にあった。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。

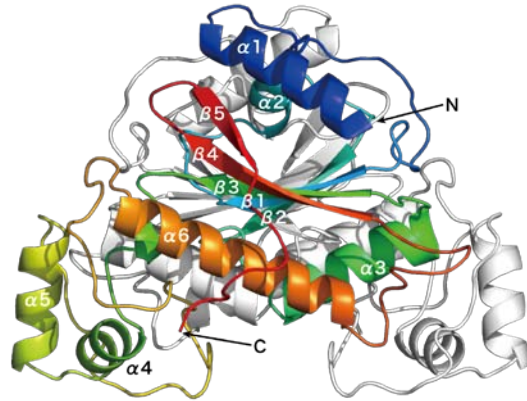


図 2 COSase 二量体の構造 (基本的二量体). 二量体を形成している一方のサブユニットは、N 末端 (青) から C 末端 (赤) に進むに従い徐々に色を変化させており、他方のサブユニットは白色で示した。6 本の α ヘリックスと 5 本の β ストランドには、N 末端側から順に番号を付けて表した。結晶中では、この二量体の下側に、この図とは上下方向が反対を向いた別の二量体が相互作用し、ホモ四量体が形成されている。

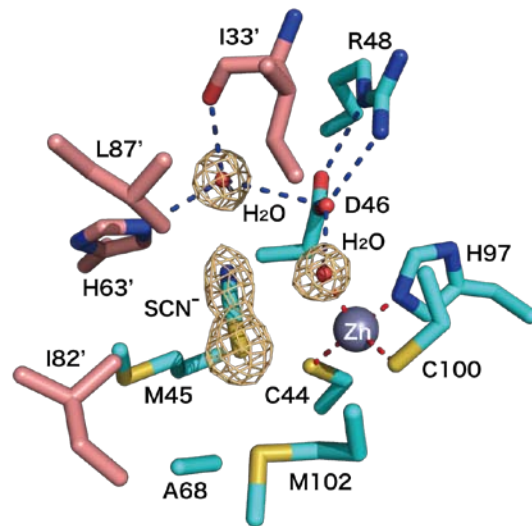


図 3 COSase 触媒部位の構造。触媒部位は二量体の界面に存在しており、一方のサブユニットのアミノ酸側鎖を水色で、他方を桃色で示した。アミノ酸側鎖の窒素、硫黄原子や水の酸素原子と亜鉛との配位を赤い破線で、水素結合を青い破線で示した。また、触媒部位近傍に存在した水と SCN⁻ イオンの電子密度を黄色のメッシュで示した。

触媒部位を構成するアミノ酸残基の違いにより、 β -CA は plant 型と Cab 型に分類されている。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($\alpha 5$)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 $\alpha 5$ 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。

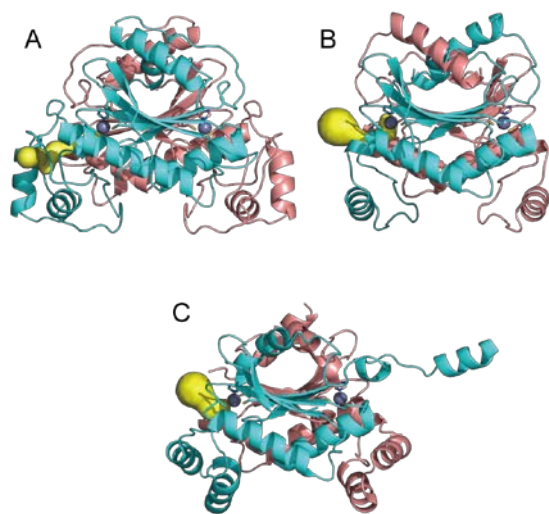


図4 COSase と Cab 型 β -CA の触媒部位からタンパク質表面に達する基質経路の比較。黄色の部分基本的二量体について予想される基質経路を表す。二量体の一方のサブユニットは水色で、他方を桃色で示し、灰色の丸は触媒部位の亜鉛原子を表す。(A) COSase、(B) *Mycobacterium tuberculosis* β -CA Rv1284 (PDB ID: 1YLK)、(C) *Methanobacterium thermoautotrophicum* β -CA (PDB ID: 1G5C)。

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。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Ogawa T, Noguchi K, Saito M, Nagahata Y, Kato H, Ohtaki A, Nakayama H, Dohmae N, Matsushita Y, Odaka M, Yohda M, Nyunoya H, Katayama Y, Carbonyl sulfide hydrolase from *Thiobacillus thioparus* strain THI115 is one of the β -carbonic anhydrase family enzymes, J. Am. Chem. Soc., 査読有, 135, 3818-3825 (2013), DOI: 10.1021/ja307735e.

〔学会発表〕(計20件)

- ① 渡邊俊則, 他, 活性化タンパク質P15Kによるチオシアネート加水分解酵素成熟化機構の解明, 第85回日本生化学会大会, 2012年12月16日, 福岡国際会議場.
- ② 渡邊俊則, 他, 変異体を用いたチオシアネート加水分解酵素反応機構の解析, 酵素工学研究会第68回講演会, 2012年10月15日, 東京大学山上会館.
- ③ 相原敬之, 他, Functions of Two Strictly Conserved Arginine Residues in Fe-type Hydratase from *Rhodococcus erythropolis* N771, 生命医薬情報学連合大会, 2012年10月14日, タワーホール船堀.
- ④ 山中保明, 他, ニトリルヒドラーゼ触媒機構の時間分割X線結晶構造解析, 第6回バイオ関連化学シンポジウム, 2012年9月8日, 北海道大学.
- ⑤ 相原敬之, 他, Difference in the substrate recognition among nitrile hydratase family, 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, 2012年5月29日, 金沢エクセルホテル東急.
- ⑥ 野口恵一, 他, 基質アナログ複合体の結晶解析による硫化カルボニル分解酵素の基質認識機構の検討, 第63回日本生物工学会大会, 2011年9月26日, 東京農工大学小金井キャンパス.
- ⑦ 高橋翔平, 他, *Thiobacillus thioparus* THI115 由来硫化カルボニル分解酵素の触媒機構, 第5回バイオ関連化学シンポ

ジウム, 2011年9月12日, つくば国際会議場エポカルつくば.

- ⑧ 尾高雅文, 他, Carbonyl sulfide hydrolase: a novel β -carbonic anhydrase family enzyme catalyzing ambient level of carbonyl sulfide, 15th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 2011年8月7日, バンクーバー (カナダ).
- ⑨ 野口恵一, 他, 硫化カルボニル分解酵素の基質認識機構の解析, 第38回生体分子科学討論会, 2011年6月23日, 筑波大学 大学会館 国際会議室.
- ⑩ 野口恵一, 硫化カルボニルを分解する新規酵素COSaseの構造化学的研究, 第23回生物無機化学夏季セミナー, 2010年8月30日, 山梨県南都留郡鳴沢村森の家久野屋 (招待講演).
- ⑪ 小川 貴弘, 他, *Thiobacillus thioparus* THI115の硫化カルボニル加水分解酵素(COSase)の酸素化学的性質および結晶構造解析, 2010年度環境バイオテクノロジー学会, 2010年6月22日, 宮城県東北大学片平さくらホール.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 恵一 (NOGUCHI KEIICHI)
東京農工大学・学術研究支援総合センター・准教授
研究者番号: 00251588

(2) 研究者分担者

なし

(3) 連携研究者

尾高 雅文 (ODAKA MASAFUMI)
東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 20224248