

無機硫黄化合物を基質とする新規酵素の構造と機能解析

岡山大学大学院環境生命科学研究科（農学系） 金尾忠芳

【略歴】

2001年11月 京都大学大学院工学研究科博士後期課程 単位認定退学
2001年12月 地球環境産業技術研究機構（RITE）研究員
2002年11月 工学博士（京都大学）
2003年4月 新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）養成技術者（京都大学受託研究員）
2004年4月 岡山大学自然生命科学研究支援センター（農学部兼担）助手
2007年4月 岡山大学自然生命科学研究支援センター（農学部兼担）助教
2011年4月 岡山大学大学院自然科学研究科（農学部兼任）准教授
2012年4月 岡山大学大学院環境生命科学研究科（農学部兼任）准教授

はじめに

硫黄（S）は、C、H、O、N、Pに次ぐ生命に必須の元素である。しかしながら我々ヒトを含んだ大多数の生物は、0価の硫黄（S⁰、ここでは主にS₈を指す）を直接利用することはできない。一方、自然界にはこの0価の硫黄をはじめ、硫化水素（H₂S）やチオ硫酸（S₂O₃²⁻）など様々な還元型無機硫黄化合物をエネルギー源として好んで食べる「変わり者」の微生物が存在する。その代表的なものに硫黄酸化細菌がある。この細菌の菌体細胞内には、硫黄を消化（代謝）する様々な酵素が存在し、中には特定の硫黄酸化細菌やその近縁種にのみ存在が確認された特徴的な酵素も少なくない。これまで動物や植物・酵母などの微生物から、メチオニンやグルタチオンなど有機硫黄化合物に関する生合成のような代謝と、それに関わる酵素の研究は詳細に行われてきた。これに対して無機硫黄化合物の代謝やこれに関わる酵素については、その化合物の多様性に加えて非酵素的反応も含まれることから、未解明な点が多く残されている。我々は、硫黄酸化細菌の持つ特殊な能力とされる「無機硫黄化合物を代謝する酵素」を研究することで「無機硫黄化合物の酵素化学」という新たな学問分野を創出することを目標としている。

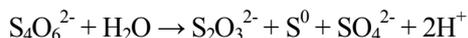
細菌の主な硫黄代謝

還元型無機硫黄化合物をエネルギー源とする硫黄酸化細菌は、これまで光合成または化学合成独立栄養細菌、あるいは混合栄養細菌として多く発見され、研究されてきた。光合成の場合は、酸素非発生の紅色硫黄細菌（*Allochromatium* 属など）や緑色硫黄細菌（*Chlorobaculum* 属など）において硫化水素（H₂S）が電子供与体として酸化され硫黄を生成する。また、一部の菌種は生成した硫黄やその中間代謝物であるチオ硫酸を硫酸にまで酸化する能力を持つことも知られている。さらに化学合成細菌では、硫化水素だけでなく、硫黄、チオ硫酸、亜硫酸、テトラチオン酸のようなポリチオン酸など様々な還元型無機硫黄化合物を酸化して生育のためのエネルギーを獲得している。この異化的硫黄代謝は、これまでの研究により大きく2種類に分けることができる。1つはSox経路と呼ばれ、sox遺伝子クラスター（soxXYZBCDなど）にコードされたタンパク質の1つが代謝中間体であるチオ硫酸のcarrierとして自身のシステイン残基にジスルフィド結合し、他のSox酵素によってこの酸化と末端脱離を行う代謝経路で、大多数の硫黄酸化細菌において確認されている。もう1つは、S₄-intermediate（S₄I）経路と言い、代謝中間体であるチオ硫酸2分子を酸化してテトラチオン酸（S₄O₆²⁻）を生成する経路である。このテトラチオン酸は、テトラチオン酸ヒドロラーゼ（4THase）によって加水分解され、チオ硫酸の再生に加えて硫黄、硫酸を生成する。この経路は、好酸性の硫黄酸化細菌において確認されており、*Acidianus ambivalens*のような超好熱好酸性アーキアにも存在する。

鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* のテトラチオン酸ヒドロラーゼ（Af-Tth）

好酸性鉄硫黄酸化細菌 *A. ferrooxidans* は、還元型無機硫黄化合物の他に二価鉄イオンも酸化できる硫黄酸化細菌である。本菌の異化的硫黄代謝について研究を進めるにあたり、テトラチオン酸を基質として培養することによって比較的高い菌体収量を得ることができた。またこの菌体より高い4THase活性が検出されたことから、まずは4THaseを精製し諸性質の検討を行った。4THase活性は、膜画分に局在したが、硫酸の添加やpHの変化によって可溶化することができ、疎水およびゲル濾過クロマトグラフィーによって電気泳動的に単一に精製できた。本酵素は、50 kDaのサブユニットからなるホモ二量体構造であり、反応至適pH 3.0、氷上でpH 1.0の緩衝液に1時間曝してもほぼ100%の残存活性を有する酸に

極めて安定な酵素であった。このような好酸性の特徴を示すことと膜面に局在したことから、本酵素は外膜タンパク質であると推定された。さらに反応に伴って溶液は硫黄の生成で白濁すること、基質のテトラチオン酸の減少量と等量のチオ硫酸が生成することから、次の反応を触媒すると推定された。



さらに精製した 50 kDa サブユニットタンパク質の N-末端アミノ酸配列を決定し、本菌の全ゲノム配列からこれをコードする遺伝子 (AFE_0029) を同定した。意外なことに我々が同定した AFE_0029 は、機能未知の外膜タンパク質として登録されており、他の生物には類するものがない新規構造を有するタンパク質をコードした遺伝子として報告されていた。この遺伝子は大腸菌で組換え発現させたが、不溶性の封入体を形成し、4THase 活性は検出できなかった。しかしこの封入体より抗体を作成し、これを利用した Western Blot 解析の結果、本抗体は *A. ferrooxidans* より精製した 4THase を特異的に認識した。これによって免疫学的にも本遺伝子が 4THase をコードすることが証明できたことから、これを *Af-tth* とした。興味深いことに、抗 *Af-Tth* 抗体を用いた Western Blot 解析から、二価鉄で生育した *A. ferrooxidans* 菌体細胞では *Af-Tth* は確認できず、硫黄やテトラチオン酸を基質として生育した場合に、その遺伝子が発現する誘導酵素であることが分かった。

大腸菌において不溶性の封入体として得られた組換え型 *Af-Tth* は、6 M 塩酸グアニジンによって可溶化し透析による refolding 処理により、その活性を回復した。この refolding 処理は、これまで多くの酵素が中性の緩衝液内で行われたのに対し、pH 4 の酸性条件下で行った場合にのみ活性の回復が認められることから、本酵素はペリプラズム空間 (*A. ferrooxidans* の場合 pH 3-5 と推定される) において成熟 (folding) し、外膜に局在するものと考えられた。事実、*Af-Tth* のアミノ酸配列を調べると、開始から 32 アミノ酸は Sec 型のシグナル配列であった。この酸性 refolding 処理は、好酸性菌由来の本酵素の生理的背景を上手く反映した手法であり、好酸性菌由来の他の細胞質外酵素の組換え発現にも、その有効性が期待できる。

Af-Tth は、ユニークな一次構造とテトラチオン酸の加水分解という特殊な反応を触媒するため、その立体構造や反応機構の解明は極めて興味深い。酸性 refolding 処理によって必要十分量の活性型酵素を獲得できたことから、その結晶化を試みた。結晶化スクリーニングキットを用いて 200 以上の条件から結晶化に成功した。条件を最適化し、得られた結晶を大型放射光施設 SPring-8 において X-線照射 2.15Å の分解能で回折像データを得ることができた。さらに Se-Met 置換した *Af-Tth* の結晶を同様に作成し、MAD 法により解析し位相を決定した。これらより得られたデータを解析した結果、*Af-Tth* 結晶は空間群 $P3_2$ であり、本酵素は Class において All beta proteins、Fold において 8-bladed beta-propeller に構造分類されることが分かった。酵素-基質複合体の結晶から得られた X-線回折データは、基質のテトラチオン酸と推定される電子雲の存在を確認できたが、その電子雲に基質分子を当てはめられる分解能のデータは得られなかった。したがって、基質に関係するアミノ酸残基を特定することは今後の重要な課題である。一方で、無機硫黄化合物を基質とする酵素は、これまで数種類が様々な硫黄酸化微生物から研究されているが、その反応機構はおしなべて、活性中心に保存されたシステイン残基が基質の硫黄原子とジスルフィド結合を形成することで、反応を触媒している。そこで *Af-Tth* の一次構造におけるシステイン残基を調べたところ、Cys301 が唯一のシステイン残基であった。これに部位特異的の変異を導入した *Af-Tth* C301A を作成し活性測定などを行ったが、野生型とほとんど変わらない値を示した。このことから、本酵素はこれまで報告された全ての無機硫黄化合物を基質とする酵素とは全く異なる新規なシステイン非依存型の反応機構によって、テトラチオン酸の加水分解反応を触媒していることが期待された。

謝辞

本研究は、主に岡山大学農学部微生物機能学研究室にて行われたものであり、上村一雄教授をはじめ本研究に関わった学生諸氏に深く感謝致します。また共同研究者の玉田太郎博士 (量子科学技術研究開発機構) に心より御礼申し上げます。

参考文献

- Kanao T, Kamimura K and Sugio T, *J Biotechnol*, 132, 16-22 (2007)
- Kanao T, Matsumoto C, Shiraga K, Yoshida K, Takada J and Kamimura K, *FEMS Microbiol Lett*, 309, 43-47 (2010)
- Kanao T, Kosaka M, Yoshida K, Nakayama H, Tamada T, Kuroki R, Yamada H, Takada J and Kamimura K., *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 69(Pt 6), 692-694 (2013)
- Kanao T, Nakayama H, Kato M and Kamimura K, *Biosci Biotechnol Biochem*, 78, 2030-2035 (2014)