

論文内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 13 年度博士課程進学
氏名 李 愚哲
指導教官 田之倉 優

論文題目 Crystal structures of dibenzothiophene desulfurization enzymes
BdsA, DszB and DszC
(脱硫酵素 BdsA、DszB、DszC の結晶構造解析)

石油に含まれる硫黄化合物は燃焼により大気中に放出され、酸性雨など様々な環境問題を引き起こす。原油の中でも比較的到高沸点画分である軽油に含まれている硫黄化合物は除去が困難である。軽油の硫黄化合物の主な成分はジベンゾチオフェン(DBT)の基本構造を採っており、DBT をモデルとする脱硫研究が活発に行われている。*Rhodococcus* sp. IGTS8から同定された*dsz*オペロンはDBTをDBT スルホン、2'-(2'-ヒドロキシ)ビフェニルスルフィン酸、2,2'-ジヒドロキシビフェニルと亜硫酸まで分解する酵素 DszA、DszB、DszC のクラスターである。これらの酵素により DBT の硫黄原子のみが亜硫酸として微生物に代謝され、炭素骨格は燃料として残るような理想的な脱硫が可能となる。*dsz* 遺伝子群の脱硫反応機構を原子レベルのモデルから理解するために、これら酵素の結晶構造解析を行った。

1. DszC の結晶構造

脱硫の初発反応を行う DszC は FMN 依存性モノオキシゲナーゼであり、全長 417 残基(分子量約 4 万 5 千)である。DszC は 2 回の一酸素添加反応により DBT を DBT スルホンまで変換する。本酵素はアミノ酸配列上、脂肪酸代謝の β 酸化経路でアシルコエンザイム A のチオエステル基を脱水素する ACD デヒドロゲナーゼ(ACD)に相

同性を持つ。生化学的解析により、FAD を補酵素とする ACD デヒドロゲナーゼとは異なり、DszC は FMN 酸化還元酵素との共役反応による還元 FMN の供給が必須であることが明らかにされている。DszC の還元 FMN 認識及び DBT 環の一酸素添加機構を理解するため DszC の結晶構造解析を行った。

精製 DszC のままでは FMN の黄色を持たない結晶が析出するが 1 mM の FMN 存在下では黄色の結晶が得られた。これらの結晶を用いて結晶構造解析を行った。DszC はラット由来の ACD (Protein Data Bank ID: 1IVH、アミノ酸の相同性は約 24%) をモデルとした分子置換法により構造解析を行った。DszC は 4 量体であり、プロトマーは N 末端、C 末端側の α ヘリックスドメイン、中央部の β バレルドメインで構成されている(図1、左)。FMN 複合体構造では FMN のリビトール基と相互作用する β 鎖 A と B の間のループ部分の構造が異なり、FMN が外れやすくなっていることがわかった。

フラビンを補酵素とするモノオキシゲナーゼは還元型イソアロキサジン環の C4A 炭素原子が酸素分子と共有結合し、反応中間体のヒドロペルオキシフラビンを形成する。FMN のイソアロキサジン環の *si* 面には His92、His391、Tyr96 などの残基が位置し、反応中間体の形成にかかわることが示唆された。変異体の解析で H92A 変異体は活性を有しないことからヒドロペルオキシフラビンの形成の時に水素を提供する残基と推定される。ピリジン環付近の α ヘリックス 5 と β バレルの間には DBT が結合できる空洞が存在する。DBT の結合モデリングから、DszC 相同タンパク質の中で保存されている Gly91、Gly95、Gly164 残基が DBT の結合に重要であることが示唆された(図2、右)。

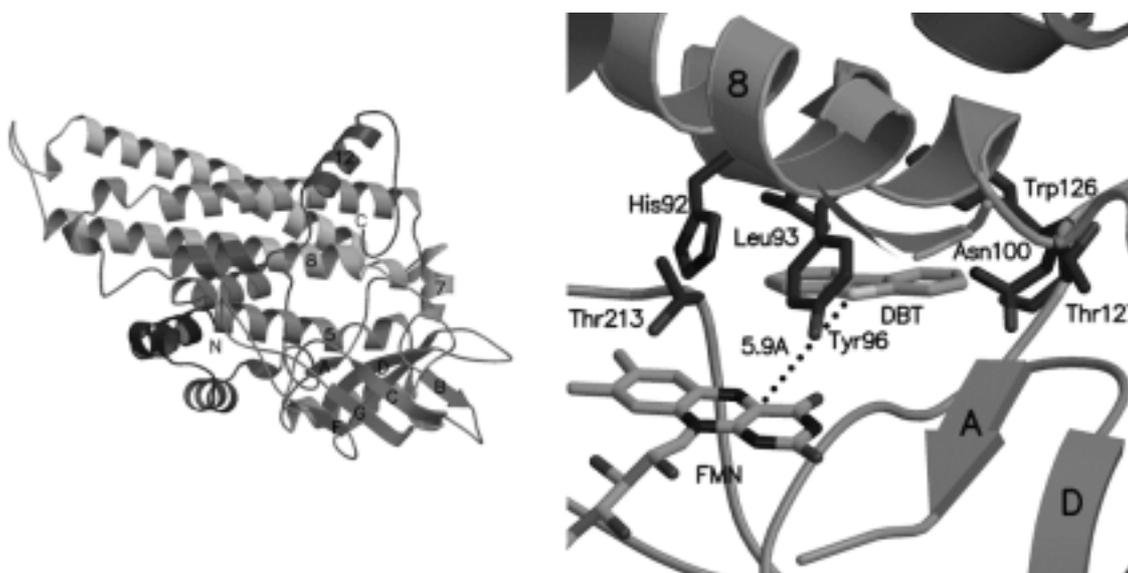


図1. DszC 単量体のリボンモデル(左)とその活性中心部位(右)

2. BdsA の結晶構造

脱硫反応の第2段階を触媒する BdsA は FMN 酸化還元酵素から供給された還元 FMN と酸素分子から DBT スルフォンの C-S 結合に一酸素添加を行う反応を触媒し、2-(2'-ヒドロキシ)ビフェニルスルビン酸を生成する活性を持つ。PSI-BLAST によるタンパク質のアミノ酸配列データベースの検索によると、DszA は NTA モノオキシゲナーゼ、pristinamycin IIA 合成酵素、EDTA モノオキシゲナーゼなど、TIM (β/α)₈ バレル (TIM バレル) を基本構造とする FMN 依存性モノオキシゲナーゼファミリーに属する。また、DszA は N 末端部分が海洋性発光細菌のルシフェラーゼとアミノ酸配列の相同性を持つ。

DszA 相同体である *Bacillus subtilis* 由来の BdsA の結晶構造解析はセレノメチオニンの異常分散効果を用いた単波長異常分散法により行った。BdsA は結晶の非対称単位の中で四量体を形成しており、各々のサブユニットは TIM バレル、 β ヘアピン、 α ヘリックスバンドルにわけることができる (図3、左)。BdsA の構造には FMN が含まれていないため、活性中心を特定することは難しいが、ルシフェラーゼとの立体構造比較により保存されている Arg159 残基周辺が FMN のリン酸基を認識することが示唆された (図3、右)。四量体同士の重ね合わせでは α ヘリックスバンドルドメインの移動度が高いため反応中心を溶媒から隔離するような働きをしているものと考えられる。

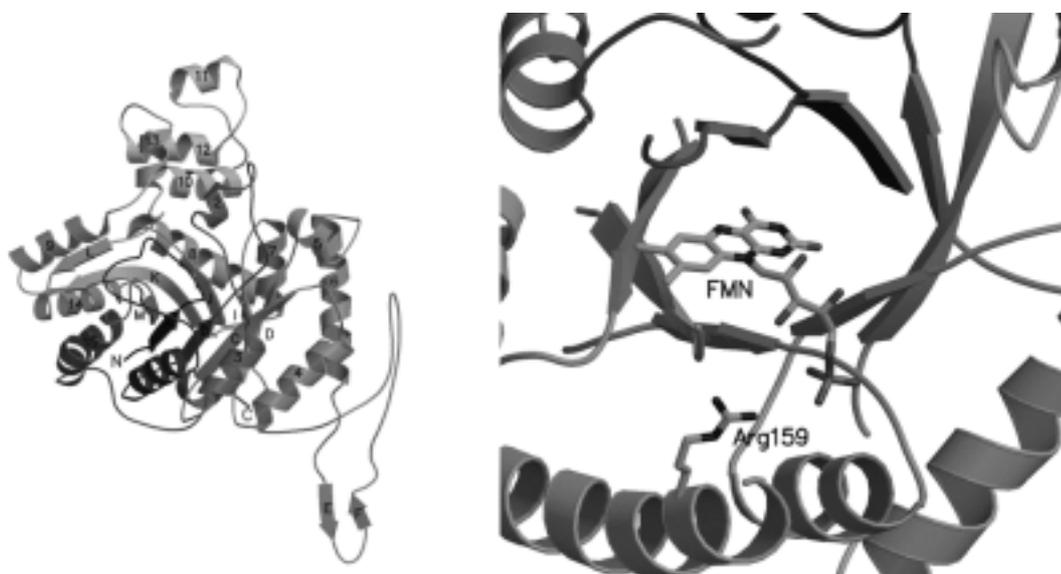


図2. BdsA 単量体のリボンモデル(左)と活性中心における FMN との結合モデル(右)

3. DszB の結晶構造

脱硫反応の最終ステップを触媒する DszB は 2-(2'-ヒドロキシ)ビフェニルスルフィン酸を 2,2'-ヒドロキシビフェニルと亜硫酸に加水分解する。DszB は分子質量約 39kDa のタンパク質であり、水溶液中では単量体として存在する。DszB は全 365 アミノ酸残基の中で相同体において保存された Cys27 が唯一硫黄原子を含む残基であり C27S 変異体は活性が認められない。DszB は活性が非常に低く、脱硫反応の律速酵素である。DszB の基質認識機構や反応機構を理解するためその結晶構造解析を行った。

DszB は重原子同型置換体の単波長異常分散解析により構造解析を行った。Dali データベースによる類似立体構造の検索では、ペリプラズム基質結合タンパク質である硫酸結合タンパク質とラクトフェリンなどと 3 次元構造が類似していることが分かった (図3、左)。Cys27 を含む活性中心は基質結合タンパク質と同様、二つの $\alpha\beta$ ドメインの間に位置している。DszB の C27S 変異体と基質 2-ビフェニルスルフィン酸 (BPSi) の複合体の結晶化により、基質のビフェニル環は Phe61、Phe203、Pro28、Trp255 と疎水性相互作用により結合していることが明らかとなった。基質結合による $\alpha\beta$ ドメイン間の位置変化はなく、活性残基である His60 を含むループ部分の構造変化による基質導入機構が示唆された。さらに、BPSi のスルフィン酸基は Ser27、His60、Arg70 と水素結合を形成していることがわかり、システインプロテアーゼのようなシステイン-ヒスチジン dyad の求核反応によるアシル中間体形成を介した触媒機構が示唆された (図3、右)。保存された Arg70 は反応中間体の負電化を安定させる役割をしていると思われる。

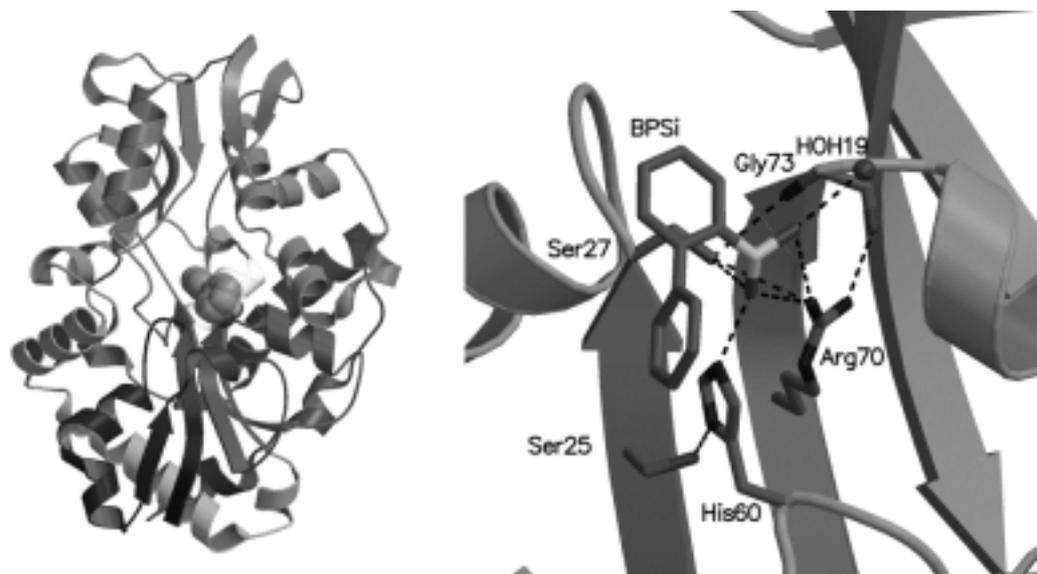


図3. DszB の C27S 変異体 (リボンモデル) と BPSi (CPK モデル) の複合体の構造図 (左) と活性中心における基質 BPSi と活性残基との相互作用図 (右)