

2S2p06 チオシアネート分解細菌の硫化カルボニル分解酵素の特性と構造解析

○片山 葉子
(農工大・院・農)
katayama@cc.tuat.ac.jp

チオシアネート ($\text{N} \equiv \text{C-S}^-$) の自然発生源は植物の配糖体であるグルコシノレートの分解物が挙げられるが、人為起源としては鉱山・製錬廃液やコークス廃液などに含まれるシアン化物の毒性を下げるために生成されたもの、農薬・染料製造などの化学合成など多岐に及ぶ。チオシアネートは比較的安定で限られた細菌種による分解が報告されているのみであるが、代謝中間体として硫化カルボニル (COS) を経る COS 系路とシアン酸塩を経る CNO^- 系路が知られる。COS 系路の最初の反応は触媒するチオシアネート加水分解酵素 (SCNase, EC 3.5.5.8) は *Thiobacillus thioeparus* から見出された新規酵素で、コバルトを活性部位に含むニトリルヒドラーゼに類似するが、無機のニトリルを唯一の基質にするなど、ユニークな特性を有する。SCNase は *Thiohalophilus* 属などの他のチオシアネート分解細菌にもその存在が確認されている。

SCNase の反応産物である COS は常温で気体の、 H_2S に類似する有毒物質である。自然界での COS 分解は CO_2 のアナログとして光合成反応に取り込まれる系路など、気体を基質とするいくつかの酵素で副次的反応が知られるが、硫酸化に関わる反応は不明であった。一方、*T. thioeparus* は COS を H_2S と CO_2 に分解し、前者は電子供与体としてエネルギー生成にリンクする。本菌から得られた COS 加水分解酵素 (COSase) は、 β ファミリーカーボニックアンヒドラーゼ (β -CA) に類似するが、 CO_2 の水和反応がみられないなど、これまでの CA にはないユニークな特徴を示す。基質認識や反応の詳細を明らかにするために、COSase の結晶構造解析を行った結果、全体構造は β -CA に類似しており、5本の β ストランドからなるオープン β シートと α ヘリックスにより構成される α/β 構造を形成し、非対称単位中に COSase 一分子が存在し、互いに垂直に交わる2本の結晶学的2回軸で関係づけられる分子間で tetramer を形成することが示された。活性部位の存在が予想される平行 β シートの C 末端近傍に亜鉛イオンと考えられる電子密度が観測され、金属含量の測定結果とも一致した。活性部位の空間は構造既知の β -CA に比べ狭く、また溶媒領域からほとんど遮蔽されるという特色を有し、基質認識との関連が考えられる。

COS は大気中の硫黄化合物の中で最大の濃度で存在し、成層圏で光分解され硫酸エアロゾル生成の要因となるため、地球の気候変動に影響を及ぼす。人為起源が大気への放出量の約 1/3 を占め、更なる増加が予想される一方、COS は硫黄系不純物として精密加工において問題となることから、今後は本酵素を用いた効率的な COS 除去へ向けた研究が重要であると考えている。

本研究は、科学研究費補助金基盤研究 B18310020 の支援を受け行なわれた。

Biochemical characterization and crystal structure determination of carbonyl sulfide degrading enzyme found in thiocyanate assimilating bacteria

○Yoko Katayama
(Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words thiocyanate hydrolase, carbonyl sulfide hydrolase, chemolithoautotrophic *Thiobacillus*, crystal structure

2S2p07 メタゲノムを活用した新規酵素の探索

○宮崎 健太郎
(産総研・生物プロセス)
miyazaki-kentaro@aist.go.jp

従来、微生物の生産する酵素を探索する方法としては、土壌なり海水なり環境を分離源として微生物をスクリーニングするという手法がとられてきた。ところが近年の分子生態学的解析等により、自然環境中に存在する微生物の実に 99% は、分離・培養されたことのない未知微生物であることが明らかとなってきた。我々がこれまで目にしてきた微生物は氷山の一角であり、環境中には見たこともない微生物が膨大な量存在しているのである。この事実を踏まえると、これまでの分離培養を介した酵素の探索方法は、微生物の培養自体が大きなバイアスとなっており、環境に備わった微生物多様性が十分に生かされていなかったことがわかる。「酵素」という分子が探索の対象であるならば、微生物を丸ごと生け捕りにすることはない。それよりも酵素をコードする「遺伝子」を対象に、これまでアクセスできなかった難培養性微生物にまで探索の開口を広げるのが有効ではなからうか。— これを実現するのがメタゲノミクス (metagenomics) の手法である。本講演では、未利用微生物の探索手法として有効なメタゲノミクスについて概説する。また、レポーターアッセイに基づくスクリーニング法 SIGEX (Substrate-Induced Gene Expression)¹ 及び PIGEX (Product-Induced Gene Expression)² について紹介する。

SIGEX は化合物に依存した遺伝子発現ユニットをスクリーニングする方法である。メタゲノムライブラリーを構築する際、遺伝子断片の挿入位置下流に GFP などの高感度レポーターを配置しておくことで、化合物により応答するスイッチ (転写因子など) があれば、下流の GFP が運動して発現するという仕組みである。Uchiyama らは安息香酸の存在下で大腸菌を宿主としたメタゲノムライブラリーをスクリーニングし、安息香酸特異的な新規転写因子 BenR を取得することに成功した。ただしこの方法は、酵素ではなく転写因子をスクリーニングのターゲットとしている。そこで演者らは、酵素を直接のターゲットとする PIGEX を開発した。

PIGEX では生成物に依存して発現する遺伝子ユニットを使う。これは SIGEX で得たものを用いる。我々は、BenR の下流に GFP を連結したユニットを使い、安息香酸アミドを安息香酸に変換する酵素 (アミダーゼ) のスクリーニングを行った。BenR-GFP 遺伝子ユニットを含む大腸菌をセンサー細胞として用意し、これとは別にメタゲノムライブラリーを構築しておく。センサー細胞とメタゲノムライブラリーを安息香酸アミドの存在下、96 穴マイクロプレート内で共培養する。安息香酸アミドを安息香酸に変換する活性があれば、培養液に安息香酸が蓄積し BenR が動作する。その結果、GFP の遺伝子が発現し、蛍光シグナルとして現れるという仕組みである。このような方法で、新規遺伝子 3 種を含む 10 種余りのアミダーゼを取得することができた。

上記、SIGEX/PIGEX を活用した酵素スクリーニング法は活性スクリーニングと相補的に活用することができるが、遺伝子発現ユニットの取得が律速となっている。現在我々は、汎用性の拡大を目指した発現ユニットの取得、改変を行なっている。

【参考文献】

1. Uchiyama T, Abe T, Ikemura T, Watanabe K. (2005) Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nat Biotechnol.* 23(1):88-93.
2. Uchiyama T, Miyazaki K. (2010) Product-induced gene expression, a product-responsive reporter assay used to screen metagenomic libraries for enzyme-encoding genes. *Appl Environ Microbiol.* 76(21):7029-35.

Metagenomic screening for novel enzymes

○Kentaro Miyazaki
(Bioproduction Res. Inst., AIST)

Key words metagenomic libraries, screening