

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 12 年度博士課程入学
氏名 岩田 健一
指導教官名 大森 俊雄

論文題目

グラム陰性細菌の carbazole 代謝系酵素の構造と機能の解析

当研究室では、難分解性の含窒素芳香族化合物であり、発ガン性・変異原性等の毒性を有する carbazole (CAR) を唯一の炭素源、窒素源、エネルギー源として生育する *Pseudomonas* 属を中心とするグラム陰性細菌を、複数種土壌・活性汚泥から単離し、解析してきた。そのうちの一株である、*Pseudomonas resinovorans* CA10株のCAR分解経路を明らかにし、そのCAR分解系遺伝子群の塩基配列の決定とそれら酵素の機能解析を行ってきた。CARは初発酸化酵素 (CAR 1,9a-dioxygenase; CARDO)、メタ開裂酵素 (CarBaBb)、加水分解酵素 (CarC) により最終的にはTCAサイクルまで分解される。

CARDOは非常に広い基質特異性を持つのに加え、報告例の少ないangular dioxygenaseとしての働きを持つ新規性の高い酵素であり、その基質認識と反応機構について興味を持たれる。CARDOはterminal oxygenase (CarAa)、ferredoxin (CarAc)、ferredoxin reductase (CarAd)から成るマルチコンポーネント dioxygenase である。CARDOでは電子がNADHからferredoxin reductase、ferredoxin、terminal oxygenaseを経由して伝達されることで基質の酸化が起こると考えられる。これらのコンポーネントは既に精製されており、CarAaは現在、結晶化およびX線結晶構造解析が行われている。将来タンパク質工学的な手法で、より高い活性を示す変異酵素系を構築しようとする場合、その電子伝達機構についての情報が必要になることが予想される。このような背景から、本研究では、ferredoxin コンポーネントの立体構造から得られる情報を基に、CARDOの反応機構を明らかにすることを最終的な目的として、CarAcの結晶構造解析を行った。

一方、CarBはCarBaとCarBbの2つのサブユニットを必要とするメタ開裂酵素であり、そのcatalytic subunitと考えられるCarBbの配列比較から class IIIに分類される。Class IIIに属するメタ開裂酵素は他の2グループと比べお互いの相同性が低く、また、多くのメタ開裂酵素の中でCarBとLigAB (PDB accession no. 1B0U) のみが酵素活性の発現に2つのサブユニットを

必要とする点から考えてもCarBは非常に新規性が高く、2つのサブユニットの結合様式、基質の認識様式、反応触媒機構について興味を持たれる。また、加水分解酵素CarCは、推定アミノ酸配列から単環芳香族化合物分解系の加水分解酵素に類縁である可能性が示唆されている。しかし、CarCはbiphenyl分解系のメタ開裂物質に対する活性が高く、単環芳香族化合物のメタ開裂物質に対する活性は非常に弱いという相同性解析の結果と相反する基質特異性の特徴を有している。芳香族化合物の加水分解酵素の基質認識は単環芳香族化合物分解系とbiphenyl分解系において非常に厳密であり、CarCの基質認識様式には興味を持たれる。そこで本研究ではCarBaBb、CarCについて大量発現系の構築・精製を行い、精製酵素による各酵素の動力学的解析を行った。また、我々のグループでは、既にCarCについて構造解析が行われ、結晶構造が解かれているので、本研究ではX線結晶構造解析によりCarBaBbの3次元的な構造を明らかにすることを目的として、CarBの結晶構造解析を行った。

1. CarAc の結晶構造解析

His融合タンパク質として発現後・精製した、*P. resinovorans* CA10株由来のCarAcは、0.2 M 硫酸アンモニウム、0.1 M 酢酸ナトリウムpH 4.4-4.8、15-25% PEG MME 2000の範囲で蒸気拡散法により結晶化した。添加剤として0.02 M 塩化マグネシウムを加えることで、0.2 x 0.2 x 0.2 mm程度の結晶を得た (Fig. 1)。この結晶の回折強度データは高エネルギー加速器研究機構のビームラインBL6Aで測定した。Cryo条件下で、1.9 Å までの回折強度データが得られ、この結晶は立方晶系に属し、空間群は $P4_132$ ($a=b=c=98.28$ Å)であった。構造決定はピフェニル分解系初発酸化酵素であるBphF (PDB accession no. 1FQT) をモデル分子とした分子置換法によって行い、結晶構造を分解能 1.9 Å、結晶学的 R 因子20.2%、 R_{free} 因子23.6%で決定した。

CarAcはBphFと同様にbasalドメインとcluster bindingドメインの2つのドメインからなっており、全体構造は主に β シートから成っていた (Fig. 2)。また、Rieskeタイプの[2Fe-2S]クラスターはCys46、His48、Cys65、His68と結合し、cluster bindingドメインの先端に位置していた。サーチモデルとして使用したBphFやcytochrome bc_1 complex (ミトコンドリア) とcytochrome b_d complex (葉緑体) のRieske fragmentと同様に結合に関与するHis ligandは溶媒側に露出していた。CarAcとBphFは全体の $C\alpha$ の折り畳み構造が良く似ており、プログラムQUANTAを用いてCarAcとBphFのアミノ酸配列のアラインメントおよびsuperimpositionを行った結果、アミノ酸配列のホモロジーは34%、rmsdは0.742 Å であり、[2Fe-2S]クラスターと $C\alpha$ の位置が両タンパク質間においてよく一致していた。

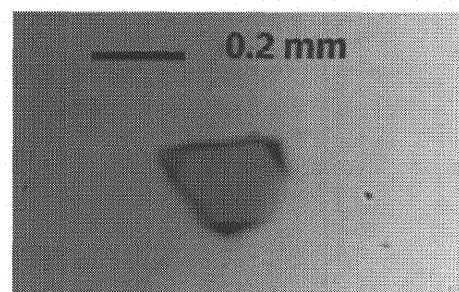


Fig. 1 His-tagged CarAc の結晶 (0.2 x 0.2 x 0.2 mm)

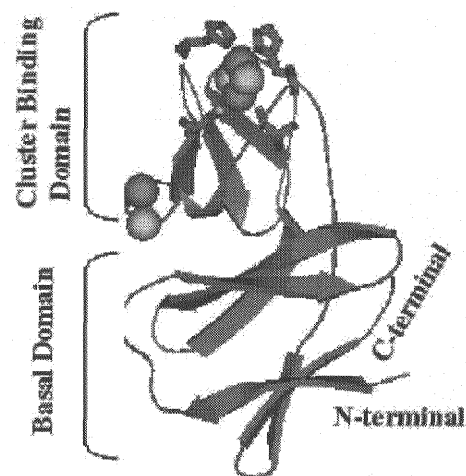


Fig.2 His-tagged CarAcの構造

また、結晶学的な3回軸の近傍であるGlu55の外側の空間にタンパク質由来ではない大きな電子密度が見つかり、その大きさなどから[3Fe-3S]クラスター由来の電子密度であること推測された。これは溶液中に分離された鉄と硫黄がタンパク質の結晶化の際にクラスターを形成したもので、生物学的な役割は持たないが結晶化に重要な役割を果たしたものと予想された。鉄硫黄クラスターのリガンドを形成するアミノ酸に関してはCysが一般的であるが、Hisが関与する場合もあり、Rieskeタイプの [2Fe-2S]クラスターはHisが関与する代表的な例である。CarAcで認められた[3Fe-3S]クラスターの様に、Aspが関与する[3Fe-4S]クラスターに関する報告もあるが、Gluが関与するものは現在まで報告されていない。

2. CarBaBb の発現、精製

P. resinovorans CA10 株の CarBa、CarBb 各々のサブユニットを native な形で同時に発現するベクターの構築を行った。CarB_{CA10} の大量発現のために、CarBa、CarBb それぞれに大腸菌内で最も効率よく働くSD配列を付加した遺伝子断片をPCR反応と制限酵素処理にて作成し、発現ベクターpUC119のマルチクローニングサイトにタンデムに2つ挿入した(pUCA503)。次に、pUCA503を用いた場合の宿主大腸菌、生育温度、IPTG終濃度等の生育・誘導条件の違いがCarB_{CA10}の可溶性タンパク質としての発現量に及ぼす影響について検討した。その結果、BL21(DE3)株を宿主として用い2YT培地、37°CでOD₅₅₀が2.0になるまで生育させた後に、終濃度1mMのIPTGを添加して10時間生育させる条件により、CarB_{CA10}タンパク質を大量に可溶性タンパク質として発現させることに成功した。大腸菌から抽出したCarB_{CA10}は4°CにてÄKTA FPLC (Amersham Biosciences) を用いて精製を行った。精製には10% glycerolを含む20mM Tris-HCl (pH 7.5) bufferを使用し、HiPrep DEAE (Amersham Biosciences)、SOURCE 15Q (Amersham Biosciences) カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーとHiLoad Superdex 200 (Amersham Biosciences) カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーを行い、600mlの培養液から約25mgの精製酵素を得た。

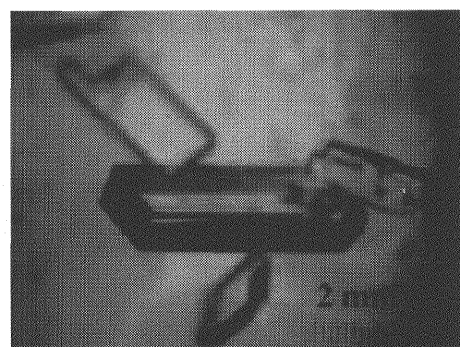
3. CarBaBb、CarC の基質特異性

CarB_{CA10}とCarC_{CA10}の精製酵素を用いて動力学的パラメーターを調べた結果、2,3-dihydroxybiphenylに対するCarB_{CA10}の K_m 及び k_{cat}/K_m はそれぞれ1.9 μM 、 $3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり、2-hydroxy-6-oxo-6-phenyl-hexa-2,4-dienoic acid (6-phenyl-HODA) に対するCarC_{CA10}の K_m 及び k_{cat}/K_m はそれぞれ2.5 μM 、 $8.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。CarB_{CA10}およびCarC_{CA10}は、catechol等の単環芳香族の分解経路中のそれぞれの基質よりもCAR、biphenyl、dibenzofuranの分解経路中の基質に対して非常に高い親和性を示した。CAR、biphenyl、dibenzofuranの分解経路においては、芳香環上の2'位の置換基 (CAR, -NH₂; dibenzofuran, -OH) が異なるがこの官能基の種類・有無により各酵素に若干の基質特異性が認められ、CarBaBbの場合-H (73.2 U/mg) > -OH (61.7 U/mg) > -NH₂ (60.6 U/mg)、CarCの場合-NH₂ (2.44 U/mg) > -H (1.99 U/mg) > -OH (1.05 U/mg)であった。

4. CarBaBb の結晶化

2. で精製したCarB_{CA10}の結晶化条件の検討を行った結果、0.2 M calcium acetate、0.1 M

sodium cacodylate (pH 6.5)、18% PEG 8000 の条件で結晶の生成が認められたが、再現性が悪く添加剤を加えるなど様々な条件を試みたものの改善されなかった。ところで、アミノ酸残基が1つでも異なるタンパク質は結晶化した場合の振る舞いが native なもの異なる例も多く知られている。当研究室で取得された他のカルバゾール資化菌 *Sphingomonas sp.* KA1 株の CarB_{KA1} は CarB_{CA10} と約 40% の identity を示す (CarBa: 36%、CarBb: 42%)。CarB_{KA1} と CarB_{CA10} をそれぞれの CarBb の C 末端側に 6 つの His を付加した his-tagged protein (ht-CarB) として発現するようプラスミドを再設計し、native の CarB_{CA10} と同様に培養したところ、精製・結晶化に十分な量の発現に成功した。各々の ht-CarB は、Hitrap Chelating (Amersham Biosciences) カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー、SOURCE 15Q カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーと HiLoad Superdex 200 カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーを行い、CarB_{CA10} については 1.6 L の培養液から約 80 mg の、CarB_{KA1} については 1.6 L の培養液から約 10 mg の精製酵素を得た。それらの結晶化条件の検討を行った結果、ht-CarB_{CA10} において蒸気拡散法により 0.04-0.07 M calcium chloride、0.1 M Bis-Tris (pH 5.5-7.0)、25-35% PEG MME 550 の範囲で結晶の生成が認められた。Fig.3 に示す 0.6 x 0.2 x 0.05 mm 程度の四角柱状結晶については、cryo 条件下で約 2.3 Å までのデータセットが得られた (空間群: P2₁2₁2₁)。LigAB (1B0U) をモデルとした分子置換法を試みたがホモロジーの低さから正しい解は得られなかったため、MAD 法による構造決定を行うための ht-CarB_{CA10} のセレノメチオニン置換体の結晶を作成中である。



**Fig. 3 CarB_{CA10}の結晶
(0.6 x 0.2 x 0.05 mm)**

5. まとめと展望

本研究ではCAR分解系初発酸化酵素の電子伝達コンポーネントであるCarAcの立体構造を明らかにした。我々のグループではCarAaの構造解析に最近成功したので、残るCarAdの構造が明らかになればCarAdからCarAc、およびCarAcからCarAaへの電子伝達機構が構造に基づいて議論できるようになる。また、メタ開裂酵素CarBの構造が明らかになればCAR分解に関与する酵素のタンパク質間相互作用の解明も酵素の構造に基づいて研究することが可能になる。CARDO、CarBaBb、CarCについては、ダイオキシシンに対してもCAR分解経路での反応と同様な反応を触媒できる事が明らかにされている。本研究及び、今後の研究で得られる先にあげた様な情報は、CARや構造類似のダイオキシシン類を分解するより強力な酵素系をタンパク質工学的に設計するための重要な示唆を与えるものと期待できる。