

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 岩田 健一

カルバゾール(CAR)は発ガン性・変異原性等の毒性を有する有害な難分解性含窒素芳香族化合物である。これまでに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が、複数種土壌・活性汚泥から単離されている。そのうちの一株である、*Pseudomonas resinovorans* CA10 株の CAR 分解経路は詳細に解析されており、その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が行われてきた。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 terminal oxygenase (CarAa)、ferredoxin (CarAc)、ferredoxin reductase (CarAd) から成る multicomponent dioxygenase であり、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るため、その基質認識と反応機構について興味を持たれる。CarBaBb 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。多くのメタ開裂酵素の中で CarBaBb と LigAB (PDB accession no. 1B0U) の類縁酵素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、CarBaBb 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おり、CarC の基質認識様式には興味を持たれる。本研究はカルバゾール分解に関与する酵素群の基質認識と反応機構を明らかにする事を最終的な目的として、CARDO の ferredoxin component (CarAc) の X 線構造解析、ならびに CarBaBb、CarC の機能解析を行ったもので全 6 章からなる。

第 1 章の序論に引き続き、第 2 章では CARDO の ferredoxin である CarAc を His 融合タンパク質として発現させた後、精製、結晶化条件を確立した。X 線結晶構造解析により、cryo 条件下で 1.9 Å までの回折強度データが得られ、空間群は  $P4_132$  ( $a=b=c=98.28$  Å) であった。ピフェニル分解系初発酸化酵素の ferredoxin 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、分解能 1.9 Å、結晶学的  $R$  因子 20.2%、 $R_{free}$  因子 23.6% で CarAc の結晶構造を決定した。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  $\beta$  シートから成っていた。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おり、結合に関与する His ligand は溶媒側に露出していた。CarAc と BphF のアミノ酸配列のアライメントを行った結果、34% の identity であり、superposition における rmsd は 0.742 Å

と C $\alpha$ の折り畳み構造が良く似ていた。

第 3 章では CarBaBb の発現、精製条件を確立した。CarBaBb を大量発現できるプラスミドを構築するために CarBa、CarBb 各々のサブユニット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 反応で増幅させ、CarBa、CarBb それぞれが同じ大腸菌内で同時に発現可能な *carBaBb* 遺伝子カセットを作製した。また、この *carBaBb* 遺伝子カセットをタンデムに 2 つ持つプラスミドを作成した結果、CarBaBb を大量に発現させることに成功した。さらに宿主大腸菌、生育温度、IPTG 終濃度等の生育・誘導条件を検討結果、BL21(DE3)株を宿主として用い 2YT 培地、37°C で OD<sub>550</sub> が 2.0 になるまで生育させた後に、終濃度 1 mM の IPTG を添加して 10 時間生育させる条件により、CarBaBb 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。2 種類の陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーに供することでほぼ単一に精製され、600 ml の培養液から約 25 mg の精製酵素を得ることに成功した。

第 4 章では CarBaBb と CarC の機能解析として CarBaBb、CarC の精製酵素を用いて、CarBaBb については動力学的パラメーターを、CarC については基質特異性の検討を行った。CAR の代謝経路中で生じる本来の基質と考えられる 2'-aminobiphenyl 2,3-diol と 6-(2'-amonophenyl)-HODA、ジベンゾフランの代謝経路で生じる 2,2',3-trihydroxybiphenyl、6-(2'-hydroxyphenyl)-HODA を調製し、市販の基質とともに活性測定を行った。CarC の活性測定においては、6-(2'-amonophenyl)-HODA と 6-(2'-hydroxyphenyl)-HODA は環状化を起こす報告があり半減期も短いため、CarBaBb をアッセイ系中で同時に用いて 2 段階の酵素反応を行うことで、活性評価できる系を構築した。CarBaBb、CarC とともに 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。また、芳香環上の 2'位の官能基の種類(CAR, -NH<sub>2</sub>; dihydroxybipenyl, -H; dibenzofuran, -OH)により各酵素に若干の活性の相違が認められ、CarBaBb の場合-H (73.2 U/mg) > -OH (61.7 U/mg) > -NH<sub>2</sub> (60.6 U/mg)、CarC の場合-NH<sub>2</sub> (2.44 U/mg) > -H (1.99 U/mg) > -OH (1.05 U/mg)であった。

第 5 章では CarBaBb の機能解析の一環として X 線結晶構造解析を行った。第 3 章で精製した CarBaBb を用いて結晶化条件の検討を行ったが結晶生成の再現性が悪かったため、精製時間を短縮することを目的として His 融合タンパク質として発現させ、精製、結晶化を行った。またアミノ酸残基が異なるタンパク質は結晶化した場合の振る舞いが異なることが報告されていることから CA10 株由来の CarBaBb と約 40%の相同性を示す *Sphingomonas sp.* KA1 株の CarBaBb についても同様に行った。結果として、CA10 株の ht-CarBaBb から四角柱状の結晶が得られ、X線構造解析により cryo 条件下で、2.3 Å までのデータセットが得られた。空間群は P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2 (a=49.5 Å b=123.1 Å c=144.6 Å)であった。LigAB をモデルとした分子置換法を試みたが相同性の低さから正しい解は得られなかった。多波長異常分散法を用いることで結晶構造が明らかになることが期待されるためセレノメチオニン置換体変異酵素を作製し、結晶化条件の検討を行っている。

以上、本論文は、CAR 分解に関与する初発酸化酵素 ferredoxin component の結晶構造を明らかにするとともに、メタ開裂酵素、加水分解酵素の精製、機能解析を行って、さらにメタ開裂酵素については結晶化条件を確立するなど、カルバゾール分解系酵素の構造に関する新知見を与えたものとして学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと判断した。