

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 14 年度博士課程 進学

氏 名 浦田 雅章

指導教員 山根 久和

## 論文題目

*Sphingomonas* 属細菌由来 carbazole 分解系プラスミド pCAR3 上にコードされる carbazole 1, 9a-dioxygenase の解析

当研究室では、変異原性を有する含窒素芳香族化合物である carbazole (CAR) の資化性細菌として *Pseudomonas resinovorans* CA10 株、*Janthinobacterium* sp. J3 株、*Sphingomonas* sp. KA1 株等を単離し解析を行ってきた。特に CA10 株の CAR 分解系遺伝子群 (*car* 遺伝子群)、CAR 分解系酵素群については詳細に解析が行われてきた。その過程で、CAR 代謝経路の最初の反応を触媒する carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) は、触媒活性部位を持つ terminal oxygenase (CarAa<sub>CA10</sub>) と電子伝達鎖である ferredoxin (CarAcc<sub>CA10</sub>)、ferredoxin reductase (CarAd<sub>CA10</sub>) から成る three-component system であり (図 1)、① CAR の窒素原子に隣接した位置 (angular position) の炭素原子とその隣の炭素原子に二原子酸素を添加する angular dioxygenation を触媒する (図 1)、② 電子伝達鎖において terminal oxygenase と ferredoxin の特異性は高く他の ferredoxin からの電子伝達は確認されていないが、ferredoxin と ferredoxin reductase との特異性は比較的低い、という興味深い特徴を持つことが明らかにされた。このため、その立体構造に興味をもたれ、現在までの研究により、CarAa<sub>CA10</sub> 単体、CarAa<sub>J3</sub> 単体、CarAcc<sub>CA10</sub> 単体、CarAa<sub>J3</sub>・CarAcc<sub>CA10</sub> 複合体の立体構造が決定されている。

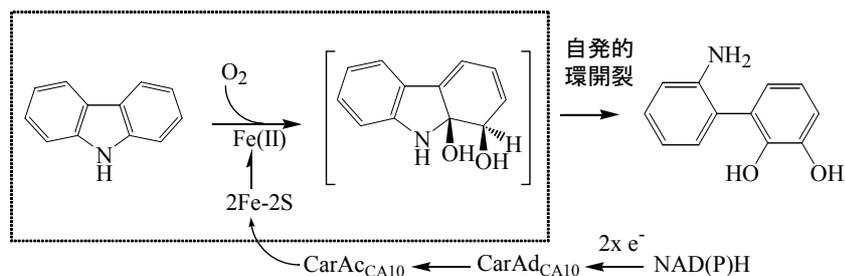


図 1 CARDO<sub>CA10</sub> による angular dioxygenation (CarAa<sub>CA10</sub> の触媒する反応は点線枠で示した)

一方、*Sphingomonas* sp. KA1 株は CAR 分解系 plasmid pCAR3 上に *car* 遺伝子群を持つが、その *car* 遺伝子群は、CA10 株を含めた *Pseudomonas* 属 CAR 資化菌の *car* 遺伝子群とは低い相同性しか示さないことが知られていた。*car*<sub>KA1</sub> 遺伝子群及び CARDO<sub>KA1</sub> の興味深い特徴として、① terminal oxygenase (CarAa<sub>KA1</sub>) は CarAa<sub>CA10</sub> とはアミノ酸レベルで約 60% と比較的高い相同性を示すものの、CarAa<sub>KA1</sub> に電子を伝達する CarAc<sub>KA1</sub> は putidaredoxin 型 ferredoxin (鉄硫黄クラスターが C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>n</sub>-C motif の 4 つの Cys に配位する) であり、Rieske 型 ferredoxin (鉄硫黄クラスターが 2 つの Cys、2 つの His に配位する) の CarAc<sub>CA10</sub> とは異なるタイプに分類される、② CarAc<sub>KA1</sub> に電子を伝達する ferredoxin reductase をコードすると考えられる遺伝子が *car*<sub>KA1</sub> 遺伝子群内、及び近傍約 5-kb の範囲には見られない、ことが明らかにされた。即ち、CARDO<sub>KA1</sub> は CARDO<sub>CA10</sub> とは異なる電子伝達鎖を持つ可能性が示唆され、CARDO<sub>KA1</sub> の機能・構造を明らかにし、詳細に機能・構造が解析されている CARDO<sub>CA10</sub> と比較することで、CARDO の立体構造の違いに伴うその機能、特に電子伝達機構の変化について重要な知見が得られることが期待された。

以上の背景より、本研究では KA1 株の CAR 初発酸化の実体を明らかにする観点から、① pCAR3 上の CARDO component の同定、② CARDO<sub>KA1</sub> と CARDO<sub>CA10</sub> の電子伝達機構及び基質特異性の比較、③ CarAa<sub>KA1</sub> の結晶化、を行った。

## 1. CAR 分解系 plasmid pCAR3 上の CARDO component の同定

### pCAR3 上の推定 CARDO component の探索

*carAa*、*carAc* 両遺伝子は pCAR3 上にあるため、ferredoxin reductase をコードする遺伝子も pCAR3 上にあると予想された。pCAR3 の全塩基配列が解析された結果、推定 CARDO component 遺伝子が 4 つの locus で発見された (図 2)。既知の *car*<sub>KA1</sub> 遺伝子群とアミノ酸レベルで約 50-60% の相同性を持つ第二の *car* 遺伝子群が見出され、既知の *car*<sub>KA1</sub> 遺伝子群を *car*-I 遺伝子群 (図 2、locus A)、新たに発見された *car* 遺伝子群を *car*-II 遺伝子群 (図 2、locus B)、と命名した。また、locus C (図 2) には putidaredoxin 型 ferredoxin をコードする *fdx1* 遺伝子が、putidaredoxin 型 ferredoxin に電子を伝達すると考えられる ferredoxin reductase をコードする *fdr1* とクラスターを成す形で見出された。Locus D (図 2) にも Fdr1 と同じタイプの ferredoxin reductase をコードする *fdr2* が他の遺伝子とクラスターを成す形で見出された (図 2、locus D)。

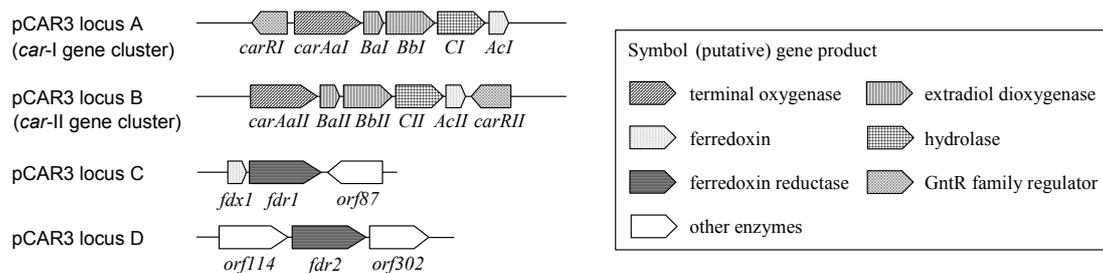


図 2 pCAR3 上に発見された (推定) CARDO component 遺伝子

## 推定 CARDO component 遺伝子の転写解析

Succinate または CAR で生育させた KA1 株から抽出した total RNA を template とした RT-PCR により、推定 CARDO component 遺伝子の転写解析を行った。その結果、*carAaI*、*carAcI*、*carAaII*、*carAcII*、*fdx1*、*fdr1*、*fdr2* の全てについて CAR 生育時における転写が確認され、これらの遺伝子が KA1 株の CAR 初発酸化に関与している可能性が強く示唆された。また、*carAaI*、*carAcI*、*carAaII*、*carAcII* については、succinate 生育時に比べ、CAR 生育時における転写の増大が確認され、*car-I*、*car-II* 遺伝子群内にコードされる GntR-type 転写制御因子 CarRI、CarRII (図 2) を介して転写レベルで発現が制御されている可能性が考えられた。

## 推定 CARDO component protein の機能解析

CAR 生育時における転写が確認された遺伝子がコードするタンパク質が、どのような組み合わせで CARDO として機能するのかを明らかにするため、休止菌体反応による解析を行った。pUC119 を用いた推定 CARDO component の発現・共発現用 plasmid シリーズを構築し、これらを保持する大腸菌を用いて、CAR を基質とし、CARDO 活性を評価した。その結果、同じ遺伝子クラスター内にコードされる CarAaI・CarAcI 及び CarAaII・CarAcII のセット (図 2) に ferredoxin reductase Fdr1、Fdr2 を共発現させた場合に、顕著な CARDO 活性の増大が観察され、転写解析の結果と併せて、KA1 株ではそれらが CARDO として生理的に機能していることが示された (図 3、CarAaI・CarAcI・[Fdr1 or Fdr2] 及び CarAaII・CarAcII・[Fdr1 or Fdr2])。また terminal oxygenase、ferredoxin とは別 locus にコードされ (図 2)、異なる発現調節がなされている ferredoxin reductase を利用可能なことも明らかにされた。また、CarAcI は CarAaII に、CarAcII は CarAaI に電子を伝達することも可能であることも示された。以上の結果より、推定アミノ酸配列から予想されたように、CARDO<sub>KA1</sub> は CARDO<sub>CA10</sub> とは異なるタイプに分類される電子伝達鎖を有することが実験的に示された (図 3)。

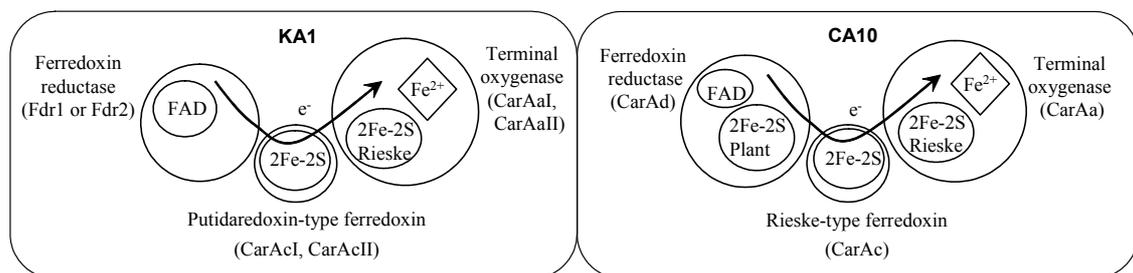


図 3 KA1 株由来 CARDO system と CA10 株由来 CARDO system の比較

## 2. CARDO<sub>KA1</sub> と CARDO<sub>CA10</sub> の電子伝達能及び基質特異性の比較

### CARDO<sub>KA1</sub> と CARDO<sub>CA10</sub> 間における電子伝達鎖の interchangeability 解析

CarAa<sub>J3</sub> (CarAa<sub>CA10</sub> とアミノ酸レベルで 99.2% の相同性を持ち、立体構造的にも CarAa<sub>CA10</sub> と同等と見なせるタンパク質) と CarAa<sub>KA1</sub> について、His-tag を付加する形で、

大腸菌内で大量発現させた後、常法に従い精製した。各精製酸化酵素に対して、CarAcCA10・CarAdCA10を共発現させた大腸菌の粗酵素抽出液を加え、*in vitro*でCARDOを再構成した場合、精製CarAaJ3を用いた系でのみ酸化活性が検出された。反対に、CarAcIKA1・Fdr2KA1を共発現させた大腸菌の粗酵素抽出液を加えCARDOを再構成した場合、精製CarAaKA1を用いた系でのみ酸化活性が検出された。このことから、CARDOCA10、CARDOKA1の電子伝達鎖において、terminal oxygenaseがアミノ酸レベルで約60%と比較的高い相同性を示すものの、全く異なるタイプのferredoxinを各々正確に選択し、電子を受け取っていることが示された。現在、CARDO componentの全てを精製酵素で再構成した系で、より詳細に電子伝達鎖のinterchangeability解析を行っている。

### CarAaI、CarAaIIの基質特異性

大腸菌を用いた休止菌体反応により、CarAaI、CarAaIIの基質特異性をCarAaCA10と比較した。その結果、CarAaI、CarAaIIの基質特異性は、CarAaCA10とアミノ酸レベルで比較的高い相同性を示すことから推測されたように、CarAaCA10と同様の傾向を示した。CarAaI、CarAaII共にCAR、dibenzofuran、dibenzo-*p*-dioxinに対しangular dioxygenationを効率良く触媒する一方で、9-fluorenone、dibenzothiophen-sulfoneに対するangular dioxygenationの触媒効率は低いことが示された。また、fluoreneに対しmonooxygenationを、biphenyl、naphthaleneに対してはlateral dioxygenationを触媒できることも示された。

### 3. CarAaIの結晶化

精製CarAaIを使用し、結晶化条件の検討を行った結果、複数の条件下でタンパク質と思われる結晶が確認された。結晶化条件の最適化を行った結果、10-20 mg/ml CarAaI (5 mM Tris-HCl, pH7.5) と reagent (0.2 M CaCl<sub>2</sub>, 0.1 M MES [pH 5.6], 1-2% PEG6000) を用いたhanging drop 蒸気拡散法による結晶化において最も良好な結晶が確認された。この結晶のX線結晶構造解析を行ったが、分解能が最大3.5 Åと、解析には不十分な結果であったため、現在、より良好な反射の得られる結晶が生長するための条件を検討中である。

本研究においてKA1株のCARDOの3つのcomponentを同定することに成功した。CARDOKA1のferredoxin reductaseはterminal oxygenase、ferredoxinとは別locusにコードされていることが示された。また、CarAaIKA1はCarAaCA10とはアミノ酸レベルで比較的高いもの、異なるタイプに分類されるferredoxinを正確に認識し電子を受け取っていることが明らかにされた。今後は、より詳細にCARDOKA1とCARDOCA10間における電子伝達鎖のinterchangeability解析を行うと共に、CarAaIKA1、CarAcKA1のX線結晶構造解析を進めて、その結果をCARDOCA10の結果と比較することで、terminal oxygenaseのどのような構造的・機能的変化が、ferredoxinの選択性を変化させているのかについて明らかにすることができるものと期待される。