

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 浦田 雅章

Carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) は細菌による carbazole 分解系の最初の反応を触媒する酵素で、carbazole の angular position (9a 位) の炭素原子とそれに隣接する炭素原子に酸素を添加する angular dioxygenase である。 *Pseudomonas resinovorans* CA10 株由来の CARDO (CARDO_{CA10}) は、carbazole 分解系 *car* 遺伝子群にコードされており、酸化反応を行う oxygenase (CarAa_{CA10})、oxygenase に電子を渡す ferredoxin (CarAc_{CA10})、NADH から ferredoxin へと電子を伝達する reductase (CarAd_{CA10}) の 3 つのタンパク質から成る。以前の研究において、*Sphingomonas* sp. KA1 株のプラスミド pCAR3 上に含まれる *car* 遺伝子群が、CA10 株の *car* 遺伝子群とは比較的低い相同性を示す遺伝子群として単離された。KA1 株由来 CARDO (CARDO_{KA1}) の注目すべき特徴としては、① ferredoxin (CarAc_{KA1}) が putidaredoxin-type に分類され、Rieske-type の CarAc_{CA10} とは異なるタイプであること、② reductase をコードする遺伝子は *car* 遺伝子群内及びその近傍には存在しないことが明らかになっていた。以上の背景に基づき、本論文では、pCAR3 上から CARDO コンポーネント遺伝子を同定するとともに、CARDO_{KA1} の oxygenase (CarAa_{KA1}) が効率良く電子を受け取れる ferredoxin のタイプは CarAa_{CA10} とは全く異なることを実験的に証明することを目的とした。さらに、CARDO_{KA1} の基質特異性を調べ、CARDO_{KA1} の CARDO_{CA10} との機能面での類似点、相違点を明らかにした。

まず、第一章で CARDO を含めた multicomponent dioxygenase system の諸性質と研究の背景について概説した後、第二章では KA1 株の pCAR3 上にコードされる CARDO コンポーネントの同定を行っている。pCAR3 の塩基配列情報をもとにアノテーションを行った結果、CARDO コンポーネント候補をコードする遺伝子を 7 つ見出した。これらについて、RT-PCR による carbazole 生育時の KA1 株での発現解析を行い、発現が検出された遺伝子に関して大腸菌を用いた休止菌体反応による機能解析を行った。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 oxygenase・ferredoxin のセットと、異なる locus に見出された reductase (FdrI、FdrII) が KA1 株の生理的な CARDO として機能していることが示された。以上の結果から、CARDO_{KA1} は CARDO_{CA10}

とは全く異なるタイプの電子伝達鎖を有することが実験的に証明された。

第三章では、CARDO_{CA10} と CARDO_{KA1} 間の電子伝達系の互換性の解析、及び基質特異性の比較を行っている。各 CARDO コンポーネントを精製し、精製酵素を使用して *in vitro* で CARDO 活性を比較することで ferredoxin 互換性について解析した。その結果、CA10 型 CarAa は Rieske-type ferredoxin から、KA1 株由来 CarAaI、CarAaII は putidaredoxin-type ferredoxin から、効率良く電子を受け取ることが明らかになった。このことから、CARDO_{KA1}、CARDO_{CA10} においてそれぞれの oxygenase がアミノ酸レベルの相同性が約 60% と比較的高いにもかかわらず、異なるタイプの ferredoxin を正確に認識し、効率良く電子を受け取れることが実験的に証明された。また、CARDO_{KA1} の基質特異性について解析した結果、CARDO_{CA10} と良く似ていることも示された。

第四章では、CARDO_{KA1} における oxygenase の ferredoxin 選択の特異性に関する知見を得ることの一環として CarAaI_{KA1} の X 線構造解析を行うことを目的とし、CarAaI_{KA1} の結晶化を行った。X 線構造解析に使用できる程の結晶の取得に成功し、現在 X 線構造解析を試みている。

以上、本論文は KA1 株由来 CARDO コンポーネントの同定を行い、既に解析が進んでいる CARDO_{CA10} との比較のもと、CARDO_{KA1} の電子伝達系・基質特異性について詳細な解析を行ったものであり、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認めた。