

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 董 雪松

本論文は、クメン（イソプロピルベンゼン）を唯一の炭素源として資化できる菌として分離された *Pseudomonas fluorescens* IP01 株の、クメン分解経路に関わる酵素群の X 線結晶構造解析による立体構造の解明を主な目的とし、分子レベルでの反応機構の解明に繋がる基礎的な研究を行ったもので、序論のほか 3 つの章から構成される。

序論では、芳香族炭化水素により引き起こされる環境汚染の浄化対策として用いる Bioremediation が有効であることを述べ、*P. fluorescens* IP01 株のクメン分解酵素系酵素群のうち、初発酸化酵素である 1,2-ジオキシゲナーゼ、フェレドキシンレダクターゼ及びメタ開裂酵素エクストラジオール型ジオキシゲナーゼの X 線結晶構造解析を行う意義を述べた。

第一章では、1,2-ジオキシゲナーゼ (CumA1A2) の結晶構造解析について述べた。CumA1A2 はクメン分解系の初発酸化酵素であり、2 原子酸素添加反応により、クメンをジヒドロキシジオール体に変換する。CumA1A2 の基質特異性はクメン分解系全体の基質特異性を決定する。これまで CumA1A2 複合体酵素の結晶化に成功し、最大分解能 2.2 Å の反射データの収集を行った。その後、naphthalene 1,2-Dioxygenase (NDO) をサーチモデルとして、分子置換法で初期位相を決定した。CumA1A2 の全体構造は $\alpha_3\beta_3$ 型のヘキサマー構造を示し、CumA1A2 には Ferredoxin Reductase (CumA4) と、Ferredoxin (CumA3) から電子を受け取る Rieske [2Fe-2S] クラスタと活性中心である non-heme Fe(II) を含んでいた。活性中心の non-heme 鉄と Rieske [2Fe-2S] クラスタは同じ α サブユニットに存在する。Rieske [2Fe-2S] クラスタを構成する Fe(II) は Cys101, Cys121, His103, His124 と結合していた。また、Fe(II) には His234, His240, Asp388 が配位結合していた。Rieske [2Fe-2S] クラスタと Fe(II) の位置関係を考えると電子は一個の Rieske [2Fe-2S] クラスタから、隣の α サブユニットの活性中心に Fe(II) 伝達されると考えられる。電子伝達の経路は NDO と同様、Rieske [2Fe-2S] クラスタの鉄と Fe(II) のリガンドの両方と水素結合をしている Asp231 を通して行われると見られる。CumA1A2 の基質結合ポケットとなりうる残基を選択し、NDO、BphA1A2 と比較しながら、解析を行った。その中特に基質結合ポケットの構成残基である M232、I326、F378、Y384 は基質結合ポケットのサイズや疎水性などを左右することが予測され、CumA1A2 の分解活性に影響することが考えられている。

一般に基質のサイズによって、反応性が異なることから、CumA1A2 の立体構造を用いて、モデリングを試みた。クメン、ビフェニルをそれぞれ基質として、基質結合ポケットに Soaking した結果、大きいサイズのビフェニル、基質結合ポケットにうまく入り、反応性を有することが予想された。これは実際に CumA の休止菌体反応から得た結果と一致した。

第二章では、エクストラジオール型ジオキシゲナーゼ (CumC) の X 線結晶構造解析について

て述べた。CumCは芳香族化合物の分解代謝に重要な鍵酵素である。CumA1A2と同様に酸素添加酵素で、カテコール型ジオール化合物の隣接した水酸基の外側を開裂させ、メタ開裂反応を起こす。反応産物は特徴的な黄色化合物であり、ほとんどの難分解物質はこの段階で微生物に利用されやすくなる。CumCは分子量約270kの8量体酵素であった。本酵素はN末端ドメインとC末端ドメインから構成され、活性中心にノンヘム 2 価鉄を含み、C末端ドメイン内に活性中心のノンヘム鉄を有していた。N末端ドメインとC末端ドメインとも $\beta\alpha\beta\beta$ 型モチーフの重複を持つバレル様構造であった。活性中心を構成するアミノ酸残基はすべてC末端ドメイン内に存在しているから遺伝子重複に生じた2つのドメインのうち、N末端ドメインが進化の過程で活性を失ってしまった可能性が考えられる。CumCの全体構造はドーナツ状の4量体から、上下2段重なって、8量体を形成していた。活性中心のノンヘム鉄はHis147、His211、Glu280と配位結合しており、これらの残基は類縁酵素間で完全に保存されており、類縁酵素では共通の活性部位構造を持つことが明らかである。BphCの基質複合体構造を合わせてモデリングした結果、酵素の活性や基質結合に関与と見られるHis196、His261、Tyr270もよく保存され、酵素活性に必須であることから、触媒塩基としての働きをもつHis196はプロトンの引き抜きにより3-イソプロピルカテコールのC1-C2間の芳香環の開裂が起こる可能性が示唆された。Tyr270は直接酵素活性に関わっていないが、3-イソプロピルカテコールのC2の水酸基と水素結合していると見られ、さらに基質のベンゼン環とこれを囲む疎水残基との疎水作用も基質結合の安定化に寄与していると考えられる。

第三章ではフェレドキシンレダクターゼ (CumA4) のX線結晶構造解析について述べた。CumA4はマルチコンポネント酵素CumAに含まれており、CumA1A2の2原子酸素添加反応時にNADHからの電子はCumA4 (フェレドキシンレダクターゼ) を介して、CumA3 (フェレドキシン) に渡り、CumA1A2の活性中心の鉄に到達する。CumA4には補酵素がFADを持つ分子量約45kのフェレドキシン還元酵素である。CumA4はハンギングドロップ蒸気平衡拡散法を用いて、25°Cで黄色結晶を得た。高エネルギー研究所において、データ収集を行い、2.3Åの分解能の回折像を得た。結晶は空間群C2221に属しており、格子定数は $a = 79.1 \text{ \AA}$ $b = 178.3 \text{ \AA}$ $c = 236.8 \text{ \AA}$ 、 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ であった。BphA4 (PDB: 1F3P) をサーチモデルとして、分子置換法で初期位相を決定した。この初期位相を基に分子モデルを構築し、立体構造の精密化を進めている。精密化の途中であるため、詳細な構造はまだ分かっていないものの、現段階の結果から、CumA4はダイマー構造をしており、BphA4と同様、FAD結合ドメイン、NADH結合ドメイン、C末端ドメインを含む3つのドメインからなることが分かった。

以上本論文は、クメン分解系酵素群のCumA1, A2、CumA4、CumCについて構造解析を行い、各酵素の基質との相互作用、反応機構等を検討したもので、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。