

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 15 年度博士課程 進学

氏名 芦川 雄二

指導教員 山根 久和

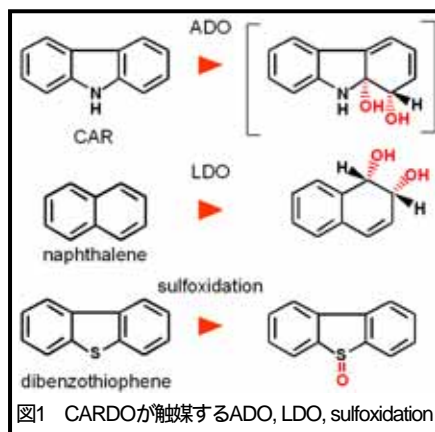
論文題目

芳香環二原子酸素添加酵素における電子伝達及び触媒機構に関する構造生物学的研究

細菌による芳香族化合物の分解は、芳香環に酸素原子を水酸基として導入する反応（初発酸化反応）から始まり、その後メタ開裂反応、加水分解反応が起こることで進行する例が多い。一連の反応の中でも初発酸化反応は全体の進行を左右するという意味で非常に重要であり、芳香族化合物分解系の鍵反応と言える。そのため、細菌による難分解性化合物汚染の bioremediation を目的とした研究の中で、初発酸化反応は特に精力的に研究がなされてきた。

当研究室では、変異原性を有するカルバゾール(CAR)を対象に資化性細菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10 株、*Janthinobacterium* sp. J3 株、*Sphingomonas* sp. KA1 株などを単離し、代謝経路、分解遺伝子群、分解酵素群について解析してきた。CAR 代謝経路の初発酸化酵素である carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) は CAR の窒素原子に隣接した位置 (angular position) の炭素原子と隣接する炭素原子に二原子酸素添加反応を触媒する (図 1) ことから angular dioxygenase と呼ばれている。

CARDO は酸化酵素と電子伝達系で構成される Rieske non-heme iron oxygenase system (ROS) に属しており、基質を認識すると共に酸素添加反応を実際に触媒する terminal oxygenase (CARDO-O) と、CARDO-O に電子を伝達する ferredoxin (CARDO-F)、NAD(P)H から CARDO-F へと電子を伝達する ferredoxin reductase (CARDO-R) の 3 つのタンパク質により構成される。また、CARDO は本来の基質である CAR 以外に、dibenzo-*p*-dioxin や dibenzofuran (共にダイオキシンの骨格) に対しても、angular dioxygenation (ADO) を触媒することができる (図 1)。CARDO は低塩素化ダイオキシンに対しても ADO を触媒可能であり、ダイオキシンの毒性の原因の 1 つとなる平面骨格を一段階の反応で破壊することができる。また、CARDO は naphthalene などの多環芳香族化合物に対しては核間とは異なる位置に lateral dioxygenation (LDO) を触媒する一方、dibenzothiophene に対しては sulfoxidation を触媒するなど、広い基質特異性を有している (図 1)。



さらに、CARDOには以下に挙げる興味深い特徴がある。i) CARDO-Oは既知のROSのterminal oxygenaseとは相同性が非常に低く、アミノ酸配列を基にした分子系統解析の結果から新規性の高い酵素であることが示されている。ii) 電子伝達鎖において、CARDO-OとCARDO-Fの特異性は高く、他のferredoxinからの電子伝達は認められないが、CARDO-FとCARDO-Rとの特異性は比較的低い、つまり、言い換えれば、CARDO-F - CARDO-R間の相互認識はあまり厳密ではないが、CARDO-O - CARDO-F間のそれは厳密である。iii) 1000 種以上の既知ROSの中で、ADOを触媒できるROSの報告は5 種程度であり、なぜこの反応を触媒できるのか興味を持たれる。iv) 他の多くのROSのterminal oxygenaseが $\alpha_3\beta_3$ 型の構造を取るのに対し、CARDO-Oは α_3 型の構成を取る。

現在までにROSにおける研究はnaphthalene 1,2-dioxygenase (NDO) を中心に進んでいるが、構造生物学的な研究としては各コンポーネントの構造解析やLDO触媒機構に関するものであり、電子伝達機構やタンパク質間相互作用及びADO触媒機構についてはほとんど報告がない。そのため、これらの解明は学術的に極めて重要な知見を提供すると期待された。以上の背景から、構造生物学的にCARDOの電子伝達能や基質酸化能の解明を試みることにした。本研究開始までに、CARDO systemのうちCARDO-Fの立体構造は既に解明されていたことから¹、本研究では相互に相同性が非常に高く、機能的な違いは認められないCA10株とJ3株由来のCARDOを用いて、CARDO-Oの立体構造解析、CARDO-O: CARDO-F複合体の結晶化・立体構造解析、ADO触媒機構の各段階の構造解析による反応機構の解明、CARDO-Rの結晶化及びX線結晶構造解析、を行った。

1. CARDO-Oの立体構造解析²

以前の研究でCA10株由来のCARDO-Oは結晶化までは成功していた。しかし、CARDO-Oは当時唯一構造が明らかになっていたNDOのterminal oxygenase (NDO-O)と相同性が低く、分子置換法では構造が得られていなかった。そこで、J3株由来のCARDO-Oを用い、多波長異常分散法により初期位相を求め、分解能1.95 Åの立体構造を得ることに成功した(図2)。

CARDO-Oは分子中央に広い空間をもつドーナツ様の構造をしていた。各サブユニットは239-251番目の残基から成るフック様構造により相互作用していたが、これは他の類縁酵素でみられるようなβサブユニット(安定化に寄与するとされている)を持たないCARDO-O特有の構造であることが明らかになった。サブユニットは2つのドメインから成り、相互作用する領域には鉄硫黄クラスターと隣のサブユニットの活性中心が隣接していた。これはNDO-Oと同様であり、鉄硫黄クラスターと活性中心間で効率よく電子伝達できる距離となっていた。CARDO-OとNDO-Oの基質ポケット内の構造を比較すると、共にポケットの入り口側は疎水性残基が多く、芳香族基質に対する嗜好性と一致していた。しかし、CARDO-Oでは活性中心の鉄のさらに奥側に空間が存在し、そこには親水性残基が多く含まれていた。また、ポケットを構成するアミノ酸残基の違いにより、ポケットの形状やサイズも異なっていた。基質ポケットのサイズはCARDO-Oの方がNDO-Oよりも広く、これは主に2環の芳香族化合物を基質とするNDO-Oと3環の芳香族化合物を基質とするCARDO-Oの基質認識機構の違いを示していると考えられた。このようなポケットの形状やサイズ、さらにポケット内での鉄原子の位置の違いが、CARのようなヘテロ環を持つ化合物の認識(もしくはADOという特異な反応の触媒能)に関連しているものと考えられた。

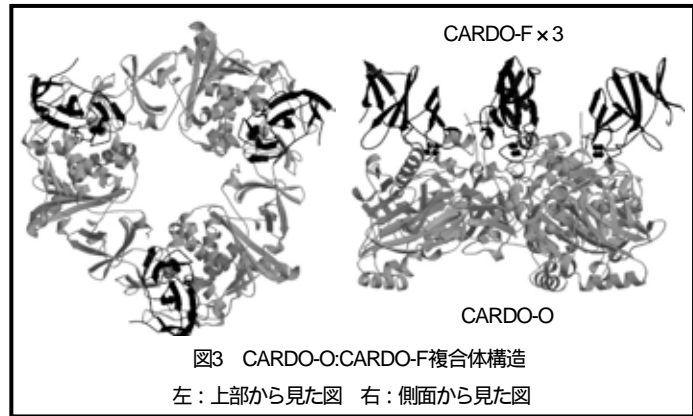


2. CARDO-O: CARDO-F複合体の結晶化・立体構造解析^{3,4}

上述したようにCARDO systemにおいてCARDO-OとCARDO-Fの相互作用認識は厳密である。そのことを立体構造の観点から明らかにするために複合体X線結晶構造解析を行った。

J3株由来CARDO-OとCA10株由来CARDO-Fを別々に精製し、混合割合及び濃度を変え結晶化を行ったところ、2つの条件でX線結晶構造解析に適した結晶を取得することができ、CARDO-OとCARDO-Fのそれぞれの立体構造を用いた分子置換法により複合体構造を決定することに成功した(図3)。複合体構造では、CARDO-Oの各サブユニットの境界付近に3分子のCARDO-Fが突き刺さるような形で結合しており、お互いの鉄硫黄クラスターは電子伝達を効率よく行える距離に存在していた。また、複合体構造を取るにあたり、単体構造と比較してCARDO-O及びCARDO-Fでいくつかの部位で構造変化が起きていた。特にCARDO-OのLys12-Trp15とそれと相互作用するCARDO-FのPro66-Gly70の構造変化は大きく、この変化がCARDO-OとCARDO-Fの相互認識機構及び電子伝達に重要である可能性が明らかになった。さらに、いくつかの残基にお

いて複合体の構造安定化のために、側鎖がシフトして塩橋や水素結合を形成していた。複合体構造に基づいて i) His48 Asn352O HOH Leu70O-His71, ii) His68 Glu353OE2-OE1 Tyr344OH Arg72NE2-NH1 HOH Asp359OD1-OD2 His71 という2つの電子伝達経路が推定された。



3. ADO触媒機構の各段階の構造解析による反応機構の解明

CARDO の基質認識機構及び反応機構を解明するために、CARDO-O のみを用いて基質複合体の取得を試みたが、成功しなかった。そこで、CARDO-O 単体での場合と比較して基質ポケットの構造に変化が見られない CARDO-O: CARDO-F 複合体を用いて基質複合体構造の解明を試みた。あらかじめ調製した CARDO-O: CARDO-F 複合体結晶を CAR を含む溶液に浸すことで、基質を含む三者複合体結晶を得ることができ、立体構造を解明することに成功した。CAR は活性中心の鉄原子の上部に存在しており、ヘテロ環の窒素原子が Gly178O と水素結合していたため、ADO は CAR の平面な環に対して下側から起こると予想された。また、CAR が基質ポケットに結合することでポケットの入り口及び結合部位周辺の残基が大きく移動しており、この変化が基質の結合安定化及び反応中の基質の流失防止に関与していることが示唆された。

次に、NDO-O で推定されている LDO 触媒機構を基に ADO 触媒機構を推定した(図4)。ADO は、まず CARDO-O の鉄硫黄クラスターが還元された後、基質と酸素が鉄原子に配位し、反応が起こる。その後、活性中心の鉄原子が還元されることで生成物が離脱すると考えられる。この ADO 触媒機構を解明するために、各反応段階に相当する立体構造の取得を試みた。その結果、上述した三者複合体を含めて図4の(1)~(5)に相当する立体構造を得ることができた。

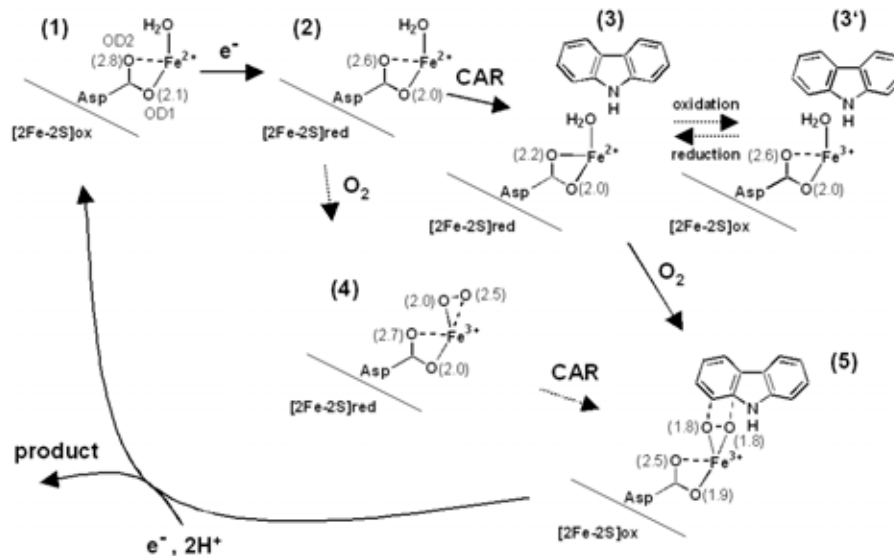


図4 推定ADO触媒機構
活性中心の鉄原子とそれに配位しているAsp及び鉄硫黄クラスターだけを示した括弧内の数字は酸素原子と鉄原子の距離(Å)

還元状態構造【図4・(2)】では、鉄硫黄クラスターが還元されることで、活性中心の鉄原子と配位子である Asp333 の側鎖の距離が 0.1-0.2 Å 近づいていた。この状態に基質が結合すると【図4・(3)】、鉄原子と Asp333 の OD2 間が 0.4 Å 短くなり、Asp333 の側鎖の配位が変化した(1配位から2配位へと変化した)

た。また、基質複合体において還元状態と酸化状態【図4・(3)と(3')】によって、鉄原子及び Asp333 の位置が変化することも明らかになった。基質ポケット内での基質の位置に変化は無いが、還元されることで鉄原子と Asp333 が基質から 0.4 Å 離れるように動いていた。この動きは、酸素を結合するための空間を作り出す意義があると考えられた。酸素複合体【図4・(4)】では二酸素原子が side-on 様に配位していた。これは、NDO-O の酸素複合体と類似しているが、酸素原子の配位する位置や酸素原子と鉄原子の距離は異なっていた。酸素基質複合体と思われる立体構造【図4・(5)】では、基質と鉄原子の間に2つの酸素原子の存在が見られた。この(5)の立体構造はまだ疑わしい点があるが、この位置に酸素原子らしきものが存在する可能性は高いと思われる。この2つの酸素原子は、酸素複合体の酸素原子と比較して鉄原子に 0.2-0.7 Å も近づいており、二原子酸素添加反応直前の構造と考えられた。これらの立体構造から、ADO 触媒機構中での活性中心付近の構造変化が明らかになった。

4. CARDO-Rの結晶化及びX線結晶構造解析

CARDO system において、CARDO-R は他の ferredoxin reductase に置き換えることができるため、ferredoxin との特異性は高くないと考えられている。しかしながら、その理由は変異体酵素や立体構造による知見がないために明らかになっていない。また、現在までに ROS において3種類の reductase の立体構造が決定されているが、CARDO-R とそれらとの相同性は低く、ドメイン構造や相互作用するタンパク質が異なっているため、その立体構造に興味を持たれた。そこで、CARDO の中で唯一立体構造が決定していない CARDO-R の立体構造の取得を試みた。

以前の研究から、CA10 株と J3 株由来の CARDO-R を用いて精製及び結晶化が行われていたが、その不安定さから結晶化には至っていなかった。そこで、比較的安定な J3 株由来の CARDO-R を使用して、精製条件の再検討を行った。その結果、以前より安定した状態でタンパク質が精製でき、結晶化にも成功した。得られた結晶はオレンジ色の板状のもので、cryo条件化で 2.9 Å の分解能を示した。空間群は $P4_22_1$ 、格子定数は $a=b=157$ Å, $c=81$ Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ であった。現在、結晶化条件の最適化を行うのと同時に benzoate dioxygenase reductase をモデル分子とした分子置換法を行っているが、上述したように相同性が低いいため、重原子置換同形法や多波長異常分散法による初期位相の決定を予定している。

本研究により、興味深い特徴を持つ新規性の高い酵素である CARDO の CARDO-O 及び CARDO-O:CARDO-F 複合体の立体構造が決定された。CARDO-O の構造から α_3 型の terminal oxygenase 特有のサブユニット間相互作用が示され、複合体構造から oxygenase と ferredoxin のタンパク質間相互作用が明らかになり、電子伝達機構やそれに関わる残基が推定できた。さらに、この複合体結晶を使用して ADO 触媒機構中での活性中心付近の構造変化も明らかにした。今後は、変異体の作成と比較解析を通して相互認識や電子伝達に関与する残基を完全に同定できると思われる。さらに、X線結晶構造解析によって未だ成功していない ADO の反応中間体構造や生成物との複合体構造を取得することで、より詳細に触媒サイクルを理解できると期待される。また、先に述べた CARDO の基質特異性の決定メカニズムも各種基質の結合状態の解明を通して明らかにできると期待される。

References

1. Nam, Noguchi, Fujimoto, Mizuno, Ashikawa *et al.*, (2005). *Proteins* **58**, 779-789.
2. Nojiri, Ashikawa *et al.*, (2005). *J. Mol. Biol.* **351**:355-370.
3. Ashikawa *et al.*, (2005). *Acta Crystallogr. Sect. F* **61**:577-580.
4. Ashikawa *et al.*, submitted.