

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 芦川 雄二

細菌による芳香族化合物の好氣的分解は、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）から始まる例が多く、初発酸化反応は全体の進行を左右するという意味で芳香族化合物分解系の鍵反応と言える。この反応を触媒する酵素は、酸素添加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、電子伝達系から酸素添加酵素に電子が伝達することで酸素分子中の2つの酸素原子を *cis* 型の2つの隣接した水酸基の形で芳香環に導入する。この反応は2つの酸素原子が添加される位置によって名称が異なり、carbazole (CAR) やダイオキシンの構造類縁体の核間とそれに隣接する炭素原子に2つの酸素原子が添加される場合は angular dioxygenation (AD)、それ以外の芳香環の隣接する炭素原子に添加される場合は lateral dioxygenation (LD) と呼ばれている（図1）。

ROS に属する CAR 代謝系初発酸化酵素である carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) は、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) のにより構成される。CARDO は CAR や低塩素化ダイオキシンに対して AD を、naphthalene などに対しては LD を触媒する。また、dibenzothiophene に対しては sulfoxidation

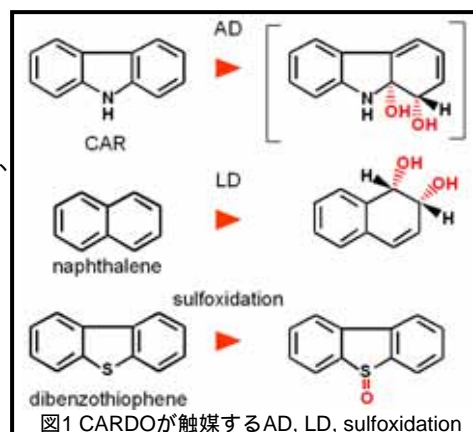


図1 CARDOが触媒するAD, LD, sulfoxidation

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、i) CARDO-Oは既知のROSのterminal oxygenaseとは相同性が非常に低く、新規性の高い酵素である。ii) 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。iii) 多くのROSのterminal oxygenaseが $\alpha_3\beta_3$ 型構造を取るのに対し、CARDO-Oは α_3 型構造を取る、といった興味深い特徴を有している。

本論文はCARDOを材料にCARDO-Oの特異な構造の解明、ADに必須な基質認識機構の解明、CARDO-OとCARDO-F間の電子伝達様式と相互作用の解明、さらに触媒サイクルの構造生物学的解明を行った研究であり、6章から成っている。

第1章では、ROSの諸性質や分類、CARDOの特徴、酸素添加反応触媒機構に関して、研究開始時までの知見をまとめ、本論文の研究の意義と目的を述べている。

第2章では、基質を認識すると共に酸素添加反応を触媒するCARDO-Oの構造解析を行っている。申請者は*Janthinobacterium* sp. J3株由来のCARDO-Oを用い、立体構造を得ることに成功した。CARDO-Oは分子中央に広い空間をもつドーナツ様の構造をとっていた。構

造解析により、 $\alpha_3\beta_3$ 型構造にはない特徴的な構造を見出し、これが安定化に寄与するとされている β サブユニットを持たない α_3 型の特有の構造であることを明らかにした。さらに、CARDO-OとNDOのterminal oxygenase (NDO-O)の基質ポケット構造を比較することで、特異な基質結合ポケットの構造が明らかになった。

第3章では、CARDO-OとCARDO-F間の電子伝達や相互作用を解明するために、複合体X線結晶構造解析を行っており、世界で初めて酸素添加酵素とその電子伝達タンパク質の複合体構造を決定している。複合体構造では、CARDO-Oの各サブユニット境界付近に3つの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、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を見出し、この変化がCARDO-OとCARDO-Fの電子伝達及び相互認識機構に重要である可能性を明らかにした。

第4章では、第3章で得られたCARDO-O: CARDO-F複合体結晶を用いてCARDOの基質認識機構及び触媒サイクルの解明を行っている。ソーキング法によりCARを含む三者複合体結晶を取得し、基質複合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いることから、CARの平面な環に対して下側から酸素添加が起こると推定した。また、CARの結合によりポケットの入り口及び結合部位周辺の残基が構造変化しており、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關与する基質認識機構であることを示唆した。次に、NDO-Oで推定されている触媒サイクルを基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、反応中間体複合体及び生成物複合体を除く各反応段階の立体構造の取得に成功した。得られた構造から、NDO-Oでは見られなかった触媒機構中での構造変化を見出し、基質、酸素分子の順で結合するのが主な反応プロセスであることを提唱した。さらに、反応時の酸素種がperoxideであることも推定した。

第5章では、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ている。以前は、タンパク質の不安定性が原因で結晶化には成功していなかったが、申請者は比較的安定な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、結晶化に成功し、cryo条件化で2.9 Åの分解能のデータを得ることに成功した。

第6章では、全体の総括と今後の展望が述べられている。

以上、本論文は、CARDOのX線結晶構造解析から、特異な構造を明らかにするとともに、基質認識機構、酸素添加酵素-フェレドキシン間での電子伝達機構・相互認識、酸素添加反応触媒機構を解明したものであり、CARDOをはじめとするROSの機能を理解し将来的に環境浄化・有用物質生産へと応用しようとする研究として、学術上ならびに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のあるものと認めた。