

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 16 年度博士課程 進学
氏名 井上 謙吾
指導教員 山根 久和

論文題目 グラム陽性細菌由来新規 carbazole 代謝系の解析

カルバゾール(CAR;図 1)は原油やコールタール中に含まれ、染料、殺虫剤、潤滑油などの原料として産業面で広く使用されているが、難分解性、変異原性を有する環境汚染物質でもある。CAR はその化学構造からダイオキシン類のモデル化合物としても注目され、環境浄化への応用へ向けた CAR 分解菌の精力的な研究が行われてきた。これまでに *Pseudomonas resinovorans* CA10 株、*Janthinobacterium* sp. J3 株、*Sphingomonas* sp. KA1 株などグラム陰性 CAR 分解菌の CAR 代謝経路とそれに関わる遺伝子・酵素が明らかになっている。CAR は初発酸化酵素である carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO)により、1 位と 9a 位の炭素に 2 原子酸素が添加され(図 1)、後の代謝経路によってアントラニル酸(AN)まで分解される。CARDO は①基質に酸素を直接添加する terminal oxygenase CARDO-O (*carAa* にコードされる)、②CARDO-O に電子を伝達する ferredoxin CARDO-F (*carAc*)、③NADH からの電子を CARDO-F に伝達する ferredoxin reductase CARDO-R (*carAd*)の 3 つのコンポーネントから成る(図 1)。このような電子伝達鎖を有し、かつ、terminal oxygenase に Rieske type [2Fe-2S] cluster を持つ酵素は Rieske non-heme iron oxygenase system (ROS)と称される一群の酵素に属する。ROS はその電子伝達コンポーネントのタイプにより class IA、IB、IIA、IIB、III の 5 つに分類される。CA10 株、J3 株、KA1 株の CARDO はそれぞれ class III、III、IIA に分類され¹⁾、ROS の中では珍しく、“terminal oxygenase は同じ化合物を基質とし、互いに有意な identity (>45%)を示す一方で、電子伝達コンポーネントのタイプが少なくとも 2 つある”、という多様性が存在する。

本研究では、応用面・学術面でも興味深い特徴を有する CARDO の多様性について追求するため、新規 CAR 資化菌の単離を試みると共に、その結果、グラム陽性細菌としては初の報告例となった CAR 資化菌の CAR 代謝系について遺伝学的・酵素学的解析を行った。

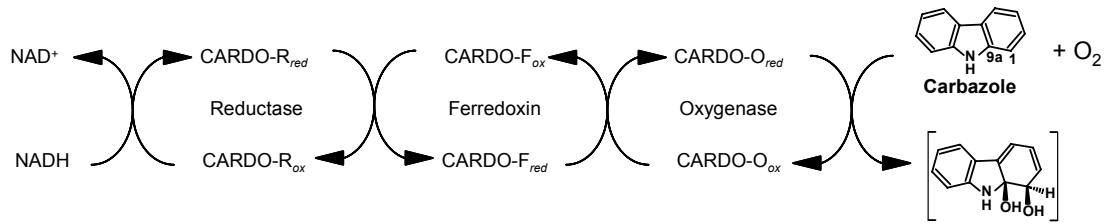


図 1. CARDO の 3 コンポーネントシステムと触媒する反応

グラム陽性 carbazole 資化菌の取得²⁾

新規 CAR 代謝系遺伝子群(*car* 遺伝子群)を取得するため、全国各地から採取した 71 サンプルを単離源とし、CAR 分解菌のスクリーニングを行った結果、27 株の CAR 資化菌の単離に成功した。単離した CAR 資化菌の属種を決定したところ、*Acinetobacter*、*Acromobacter*、*Erythrobacter*、*Nocardioides*、*Stenotrophomonas*、*Marinobacterium* 属など、これまでに CAR 資化菌として単離された報告のない属が含まれていた。中でも *Nocardioides* 属に分類された 1 株(IC177 株と命名)はグラム陽性の CAR 資化菌としては唯一の例となり、その CAR 代謝系に興味を持たれた。そこで、degenerated PCR により、IC177 株ゲノムから *carAa* 遺伝子ホモログの一部を取得した。その推定アミノ酸配列は既知の CarAa の相当する領域と 49~45%程度と低いながらも有意な identity を有していた。

IC177 株の *car* 遺伝子群の解析³⁾

IC177 株の *car* 遺伝子群の全容を明らかにするべく、IC177 株ゲノムのコスミドライブラリーを構築し、上記の *carAa* 遺伝子断片を含むクローンを取得した。そのインサート 17.5 kb のシーケンス解析を行ったところ、既知の *car* 遺伝子と有意な相同性を有する *carAaCBaBbAcAd* 遺伝子群とその上流に存在する *carDFE* 遺伝子群が見いだされた。これら *car* 遺伝子の推定アミノ酸配列は既知のグラム陰性細菌のものとは 29~67%の identity を有し、それらとは遺伝子の並びが異なるなど、興味深い特徴を有していた。*carAaCBaBbAcAd* 及び *carDFE* 両遺伝子群の直上流には IclR family に属する転写制御因子様の遺伝子がそれぞれ見いだされ、両遺伝子群が転写レベルの発現調節を受けていることが示唆された。*carAaCBaBbAcAd* と *carDFE* 遺伝子群について各々 RT-PCR 解析を行ったところ、CAR 生育時に各遺伝子群はそれぞれが 1 つのオペロンとして共転写されていることが明らかになった。発現の誘導性を明らかにするため、CAR、AN、およびコハク酸を与えた IC177 株の *carAa* と *carD* について定量的 RT-PCR を行ったところ、CAR を与えた時のみ両遺伝子の転写の誘導が認められた。一方、IC177 株の *car* 遺伝子の機能を解析するため、*carAaAcAd* の 3 遺伝子(それぞれ CARDO-O、-F、-R をコードする)を全て発現する大腸菌を作成し、実際に CAR 初発酸化能を持っていることを明らかにした。この結果に加えて、*carAaAcAd* の推定アミノ酸配列より予想される電子伝達鎖の特徴から、IC177 株は、ROS の分類において class IIB に属する新規な CARDO を持つことが明らかとなった。また、様々な芳香族化合物を基質として用いて、IC177 株の CARDO を発現する大腸菌による休止菌体反応を行った

ところ、IC177 株は CAR やナフタレン、ジベンゾ-*p*-ダイオキシンには高い活性を有していたのに対し、ピフェニルやジベンゾフランには低い活性しか示さず、これらの化合物に高い活性を有する CA10/J3 株や KA1 株の CARDO とは基質特異性が異なっていることが示された。

IC177 株と CA10/J3 株由来 CARDO の互換性の解析

本研究により、CA10/J3 株、KA1 株、IC177 株由来 CARDO はそれぞれ異なるタイプの電子伝達系を持つことが明らかとなった。それぞれの terminal oxygenase コンポーネント同士は高い相同性を有するが、その電子伝達コンポーネントは異なるという CARDO が持つ特徴は、今まで詳細な解析がなされてこなかった ROS の電子伝達メカニズムの解明に向けた格好の研究材料であるといえる。そこで、CARDO の電子伝達について機能と構造の面から解明を試みることにした。まずは、IC177 株 CARDO の 3 つのコンポーネントそれぞれについて His タグ融合タンパク質として大腸菌内で大量に発現させ、FPLC にて精製酵素を調製し、同様に CA10/J3 株の各 CARDO コンポーネントも精製した。次に、電子伝達コンポーネントの互換性を解析するため、CARDO の再構成系に続いて活性検定系を構築した。その系にて電子伝達コンポーネントを入れ替えるなどして、互換性を解析した結果、CARDO-O のみを入れ替えたものでは活性が検出されなかったことから、CARDO-O と-F 間の特異性が高いことが明らかになった。一方、CARDO-R のみを入れ替えたものでは、活性が 61~69%程度下がったものの、有意な活性を有していたことから、CARDO-F と-R 間の特異性は低く、互換性があることが明らかになった。

IC177 由来 CARDO の X 線結晶構造解析

前述のように CARDO-O と-F 間の電子伝達には高い特異性があったが、タンパク質の立体構造はその特異性を決める決定的な要因の一つと考えられる。J3 株の CARDO-O と CA10 株の CARDO-F の構造はすでに明らかになっていたので、本研究では IC177 株由来の CARDO-O と-F の単体状態での X 線結晶構造解析を行った。CARDO-O と-F をそれぞれ結晶化し、放射光施設 Photon Factory にて、それぞれ分解能 2.3、2.0 Å の反射データを収集し⁴⁾、すでに明らかになっている KA1 株の CARDO-O (Katsuki et al., 未発表データ)、CA10 株の CARDO-F の構造をモデル分子とした分子置換法による構造決定に成功した。

IC177 株の CARDO-O は 3 つの subunit がドーナツ様の構造を形成しており、全体構造としては J3 株、KA1 株の CARDO-O と似ていた。しかし、基質ポケットの入り口付近は、他の CARDO-O とは異なり狭く、これが他の CARDO との基質特異性の違いを生む要因と考えられた。IC177 株の CARDO-F は monomer で、全体構造は楕円の球状であり、電子伝達に必要な[2Fe-2S]クラスターは分子の末端の溶媒に露出する部分に存在していた。以前の研究で、class III 型 CARDO-O と-F (J3 株由来 CARDO-O と CA10 株由来 CARDO-F)の複合体(CARDO-O の trimer 1 つに対し 3 つの CARDO-F が結合)の立体構造が解かれ、タンパク質間で相互作用をするアミノ酸残基が明らかになっている(図 2A、2C)⁵⁾。そこで、class III 型 CARDO-O と-F の結合に関与する残基に相当するアミノ酸残基が IC177 株のものでは立体構造上どこに位置するのかを調べたところ(図 2B、

2D)、class III 型では結合に関与するアミノ酸残基はある程度集中して存在していたのに対し、IC177株 CARDO では、-O、-F 共に結合位置が class III 型と同じと考えるならば、結合に関与する可能性が低い位置に見いだされるものがあり(図 2D 矢印)、class III 型と IC177 株の CARDO-O と-F 間で結合に関与するアミノ酸残基は異なる可能性が考えられた。

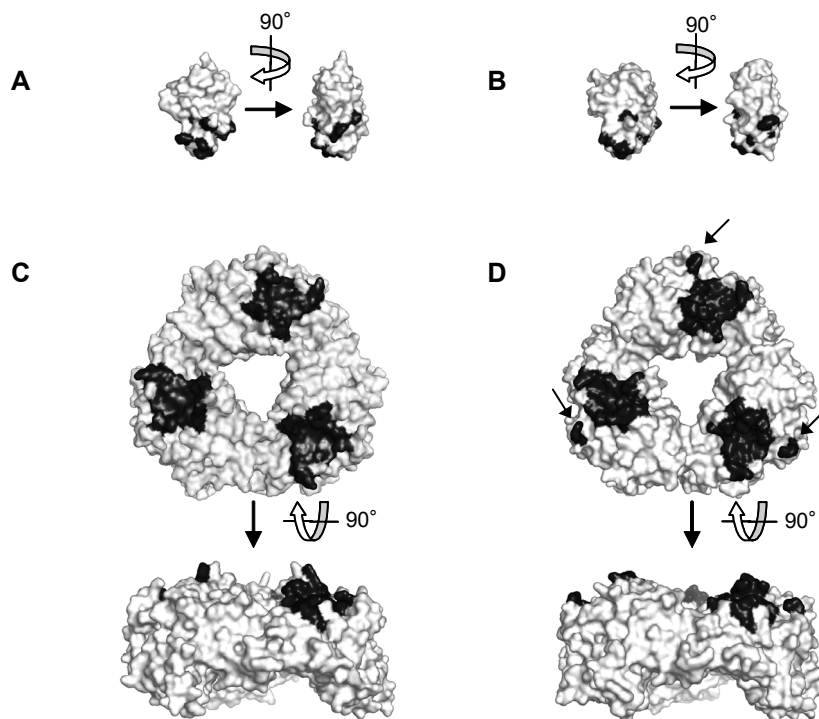


図 2. CA10 株の CARDO-F (A)と J3 株の CARDO-O (C)間の結合に関与するアミノ酸残基の位置(黒色部分)と、それに基づいて推定された IC177 株 CARDO-F(B)、IC177 株の CARDO-O (D)における相当するアミノ酸残基の位置(黒色部分)。

今後、IC177 株の CARDO-O と-F の複合体の構造解析やコンポーネント間の親和性の解析など生化学的解析を行うことで、CARDO の電子伝達メカニズムについてのさらなる詳細が明らかになるものと期待される。これまでの ROS の研究は反応特性や基質特異性が中心であり、電子伝達系に焦点をあてた研究は極めて少なく、構造に基づいた分子レベルでの解明を試みた例は皆無に等しい。本研究による CARDO を用いた先駆的な研究成果は、この分野に重要な知見を与え、植物、昆虫など広く分布する ROS 類縁酵素の研究にも影響を与えるものと考えられる。

文献

- 1) Inoue et al., 2004. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68, 1467-1480.
- 2) Inoue et al., 2005. FEMS Microbiol. Lett. 245, 145-153.
- 3) Inoue et al., 2006. Appl. Environ. Microbiol. 72, 3321-3329.
- 4) Inoue et al., 2006. Acta Cryst. Sect. F 62, 1212-1214.
- 5) Ashikawa et al., 2006. Structure DOI:10.1016/j.str.2006.10.004.