

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 井上 謙吾

Carbazole (CAR)は原油中に含まれ、染料、殺虫剤などの原料として広く使用されている化合物であるが、環境中では難分解性を示し、それ自身が変異原性を有する環境汚染物質でもある。本研究開始以前に *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 CAR 代謝遺伝子(*car* 遺伝子)・酵素が明らかになっていた。それによると CAR は初発酸化酵素 carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO terminal oxygenase CARDO-O [Oxy]、ferredoxin CARDO-F [Fd]、ferredoxin reductase CARDO-R [Red]の3つのコンポーネントから成る)により angular dioxygenation と呼ばれる酸素添加反応を受けるが、この angular dioxygenation を触媒する酵素の報告例は非常に少ない。CARDO は Rieske non-heme iron oxygenase system (ROS)と称される酵素に属し、ROS は電子伝達コンポーネントのタイプにより IA、IB、IIA、IIB、IIC、III の6つの class に分類される。CA10 株、J3 株、KA1 株の CARDO はそれぞれ class III、III、IIA に分類される。本研究は、CARDO の多様性について詳細に明らかにすることを当初の目的として新規 CAR 資化菌のスクリーニングを行い、その過程で電子伝達系の異なる第3の CARDO を発見し、その電子伝達系について解析を行ったものである。

既知の CAR 代謝系と ROS について概説した序章に引き続き、2章では新規 CAR 資化菌 27 株を単離し、その中でも *Nocardioides* 属に分類された 1 株(IC177 株と命名)はグラム陽性の CAR 資化菌として初めての報告例となった。

第3章ではグラム陽性の CAR 代謝系を明らかにすることを目指し IC177 株ゲノムから *car* 遺伝子をクローニングし、各 *car* 遺伝子の characterization を行った。IC177 株の *car* 遺伝子群の機能解析、オペロン構造、転写誘導性に加え、CARDO の基質特異性を解析し、IC177 株の CAR 代謝経路はグラム陰性細菌と同じであることを明らかにしたのみならず、転写様式が異なること、既知の CARDO とは基質特異性が異なることを示した。また、IC177 株は ROS の分類において class IIB に属する新規な CARDO を持つことを明らかにした。

以上から CARDO は ROS の中では珍しく多様な電子伝達系を持つことが明らかになったため、ROS の電子伝達系の解明において CARDO が格好の研究材料であると考えられた。そこで、第4章では、CARDO の電子伝達メカニズムを機能面から解析を試みた。IC177 株由来の CARDO の各コンポーネントを調製し、同様に調製した class III の CARDO の各コンポーネントを用いて電子伝達コンポーネントの互換性を再構成系にて解析した。結果、Fd は異なるクラスの Red から電子を受け取ることができ、一方、Oxy は異なるクラスの Fd からは電子を受け取りにくいことが明らかになり、この結果は、Red と Fd 間の特異性は低く、Fd と Oxy 間の特異性は高いことを示していた。

本論文第 5 章では Oxy と Fd 間の高い特異性を決める要因を明らかにするべく構造面からの解析を行った。IC177 株由来の Oxy と Fd の X 線結晶構造解析を行い、それぞれ最大分解能 2.3 Å、2.0 Å の構造を決定した。IC177 株の Oxy は全体構造としては既知の J3 株、KA1 株と良く似ていたが、基質ポケットの形状は異なり、これが他の CARDO との基質特異性の違いを生む要因であることが示唆された。以前解析された class III の Oxy と Fd の複合体の立体構造から予想した、タンパク質間相互作用をする領域においては、class III の Oxy とは異なる点が複数見いだされた。IC177 株の Fd の全体構造も既に明らかになっている CA10 株の Fd と良く似ていたが、同様に Fd においても class III と IIB では Oxy との相互作用をするであろう領域に違いが見いだされ、それら class III と IIB で保存性の低いアミノ酸残基こそが Oxy と Fd 間の高い相同性を生み出していることを示唆していた。

以上本論文は、新規 CAR 資化菌を多数単離・解析するとともに、当時初めての報告となったグラム陽性 CAR 資化菌から新規 CARDO を見出し、その機能を酵素学的・構造生物学的に明らかにしたもので、学術上ならびに応用上貢献するところ大である。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。