

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 宇佐美 裕亮

指導教員 山根 久和

論文題目

Carbazole 代謝系酵素の構造と機能に関する研究

カルバゾール (CAR) 産生菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10 株の有する CAR 代謝経路の初発酸化酵素 carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) は、terminal oxygenase (CARDO-O)、ferredoxin (CARDO-F)、reductase (CARDO-R) から構成される Rieske non-heme iron oxygenase system (ROS) に属する酵素である。CARDO は CAR の窒素原子に隣接する 9a 位 (angular 位) の炭素原子 (C9a) と 1 位の炭素原子 (C1) に二つの水酸基を導入する反応 (angular dioxygenation, AD) を触媒することから angular dioxygenase と呼ばれる。CAR は AD により不安定なヘミアセタール中間体へと変換され、自発的に分子中央のヘテロ環が開裂することで反応産物として 2'-aminobiphenyl 2,3-diol (A-diOH-BP) が生成する (図 1)。その後、メタ開裂酵素 CarBaBb によりカテコール環が開裂し、下流の代謝系へと移行する。CARDO は CAR 意外にも他の多くの芳香族化合物酸化能を示すとともに、反応の種類としても、AD に加えてナフタレン (NAH) 等の多環芳香族炭化水素等に対しては芳香環上の空間的に空いた位置に lateral dioxygenation (LD) を、フルオレン (FN) のメチレン炭素やジベンゾチオフェン (DBT) のスルフィド硫黄に対しては monooxygenation (MO) を触媒するという反応種選択性を示す。最近、当研究室では CARDO-O 単体、CARDO-O:CARDO-F 複合体の X 線結晶構造解析に成功し、CARDO-O 活性中心に対する CAR の AD 特異的結合様式が明らかにされた。一方、各種基質に特異的な種類の反応を CARDO-O が選択的に触媒する理由を明らかにするため、CARDO-O の構造を元に基質ポケットを構成する 4 つのアミノ酸残基 (I262, F275, Q282, F329) に対して点変異が導入され、基質特異性変異酵素が複数取得された。それらの中で、I262V, F275W, Q282N では、CAR を基質とした場合に野生型酵素ではほとんど生成しない 1-hydroxycarbazole (1-OH-CAR) への変換能が上昇しており、F275W および I262L ではそれぞれ FN および DBT への酸化位置選択性が変化していた。さらに、F275A ではフルオランテンへの酸化活性そのものが上昇すると共に酸化位置選択性も変化していた。

本研究では活性の変化したこれらの基質特異性変異酵素の基質・酸素複合体の構造を決定し、

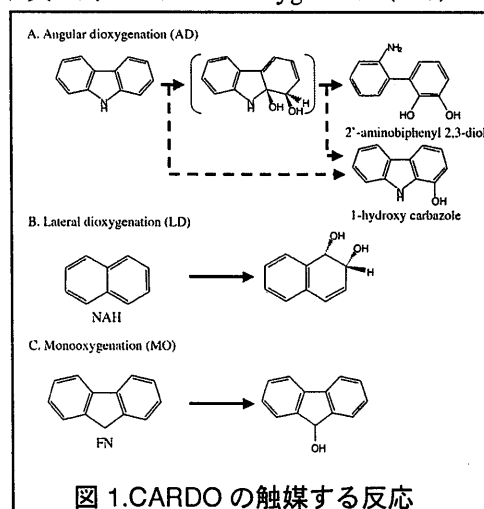


図 1. CARDO の触媒する反応

CARDO が多様な反応を触媒する際の特異的な基質認識メカニズムを立体構造に基づき明らかにすることを第一の目的とした。なお、以前の研究で、CARDO-O 単体結晶の安定性は悪く基質のソーキングには耐えられない事が経験的に明らかになっていたので、本研究では基質・酸素複合体の作製には変異 CARDO-O:CARDO-F 複合体の結晶を用いた。また、合わせてヘテロ多量体構造という珍しい特徴を有する CAR 分解系のメタ開裂酵素の X 線結晶構造解析も行った。

1. 各変異酵素を用いた 1-OH-CAR 生成機構の解明

I262V (A-diOH-BP 生成率, 27%; 1-OH-CAR 生成率, 25%), F275W (A-diOH-BP 生成率, 93%; 1-OH-CAR 生成率, 5%), Q282Y (A-diOH-BP 生成率, 48%; 1-OH-CAR 生成率, 42%) と CARDO-F, CAR との 3 者複合体結晶を調製し、それぞれ分解能 2.1, 1.95, 2.15 Å にて構造を決定した。F275W への CAR 結合位置は野生型と一致していたものの、I262V, Q282Y においては基質ポケットの形状変化に伴い CAR の結合位置が F275 側に 1 Å 移動しており、加えて C8 近傍に新たな水分子の存在が確認された (図 2ab)。野生型酵素、F275W では CAR のイミノ基は G178 の O 原子と水素結合しており、これにより酸化位置が固定されている。この結合位置は AD の触媒と A-diOH-BP の自発的な生成に適した位置ということができるが、F275W の 1-OH-CAR 生成率が低いことを考えれば、F275W 変異酵素での CAR 結合位置は妥当と言えることができる。一方、I262V, Q282Y においては水分子の存在により、G178 の O 原子と CAR のイミノ基の距離は遠ざかり、水分子を介した水素結合ネットワークが形成されていた。この結果は、I262V, Q282Y の基質結合ポケット内では、A-diOH-BP を効率的に生成するための結合位置へ CAR が安定に結合できないことを示している。

次に、I262V:CARDO-F 複合体結晶を還元処理し CAR と酸素をソーキングすることで、酸素基質四者

複合体 (I262V:CAR:O₂) の構造を分解能 2.0 Å で明らかにした。予想に反して、I262V:CAR:O₂ では CAR の C8 近傍の水分子は消失しており、酸素原子および CAR は野生型酵素、F275W とほぼ同じ位置に存在していた (図 3a)。この結果は、I262V 変異酵素であっても還元状態では野生型と同様の位置に CAR が結合しやすいことを示している。この場合、酸素原子 (O1, O2) と CAR の推定酸化位置との距離は O1-C1, 2.9 Å; O1-C2, 3.5 Å; O2-C9a, 3.0 Å であったことから、この状態では C9a と C1 が水酸化されるものと推測された。還元状態では図 2b に示した酸化状態での CAR の結合構造は得られていない。しかし、CAR の結合位置が揺らいでいることを考えると、一部では酸化型

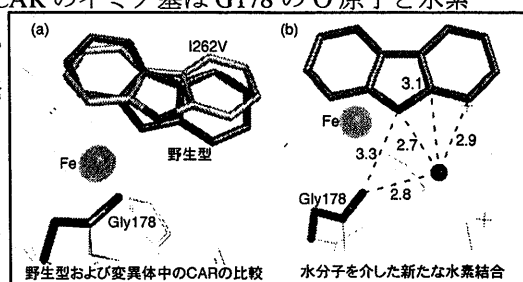


図 2. I262V, Q282Y で見られた水分子

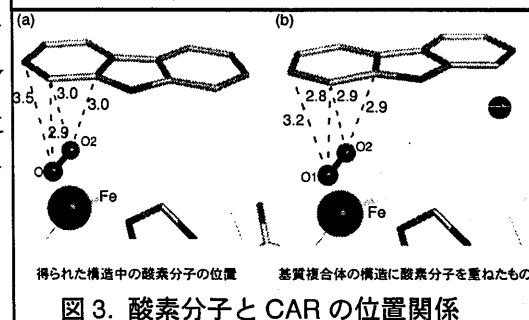


図 3. 酸素分子と CAR の位置関係

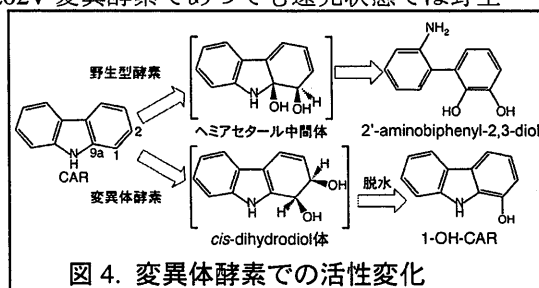
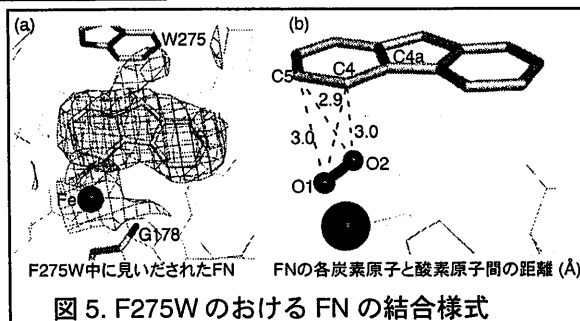


図 4. 変異体酵素での活性変化

での結合様式で結合した CAR に対して酸素の攻撃が起こっている可能性が考えられる。この仮説が正しいとすれば、図 3b に推定構造を示すように C1, C2 位に二水酸化が起こる可能性がある。すなわち、図 4 に示すように、変異酵素では酸素が攻撃する部位が一部 C1, C2 位に移ることで、脱水の後 1-OH-CAR が生成するものと考えられる。

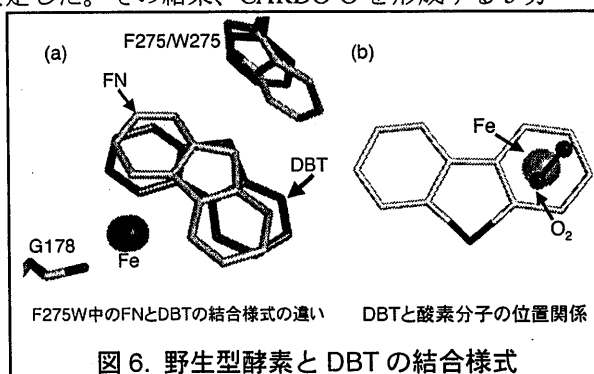
2. F275W における FN からの 4-hydroxyfluorene 生成機構の解明

F275W:CARDO-F 複合体結晶を用いて FN との 3 者複合体の構造を分解能 2.1 Å で決定した。その結果、FN は CAR の結合の向きとは反転した状態で結合していた (図 5)。これに伴い、FN の C4 が活性中心と最も近接する位置に存在していた。この結果は F275W により FN から 4-hydroxyfluorene (4-OH-FN) が生成することと一致する結果であった。酸素基質四者複合体の結晶は得られていないものの、I262V:CAR:O₂ で観察された酸素分子の位置を重ね合わせて各炭素原子との距離を測定したところ、C3, C4 との距離は 2.9-3.0 Å であった。このことから、F275W 変異酵素にて 4-OH-FN が生成される際には、C3 と C4 に LD が触媒された後に C3 に結合した水酸基が脱水されて生成される経路が考えられた。



3. DBT に対する sulfoxidation 機構の解明

CARDO の触媒する sulfoxidation の機構を解明するため、野生型 CARDO-O:CARDO-F 結晶を用いて DBT との三者複合体の構造を 1.9 Å で決定した。その結果、CARDO-O を形成する 3 分子の subunit で異なる位置に DBT が結合していた。Chain A においては他の 2 分子とは異なり活性中心から約 6 Å 離れて存在していたことから、実際には酸化されない状態である事が示された。一方、chain B, C においては、図 5 と同様に CAR の結合状態とは反転した状態で DBT が結合していた (図 6a)。酸素基質四者複合体の立体構造は得られていないものの、I262V:CAR:O₂ で観察された酸素分子を重ね合わせて測定した活性中心近傍側の芳香環炭素原子との距離は 2.7-3.1 Å であり、この芳香環上のどの炭素原子に対しても酸素を添加することが出来る距離であった。このことは野生型酵素において、DBT の *cis*-diol 体、monohydroxy 体 (*cis*-diol 体の脱水生成物と考えられる) が複数種検出される結果と一致する。一方、chain B, C での結合位置では酸素-硫黄間の距離は 4.2 Å となり CARDO-O が DBT に対して行う主反応である硫黄原子の酸化は説明できなかった。Sulfoxidation の進行には硫黄原子の高い反応性が重要であることも推測され、今後の検討が必要である。

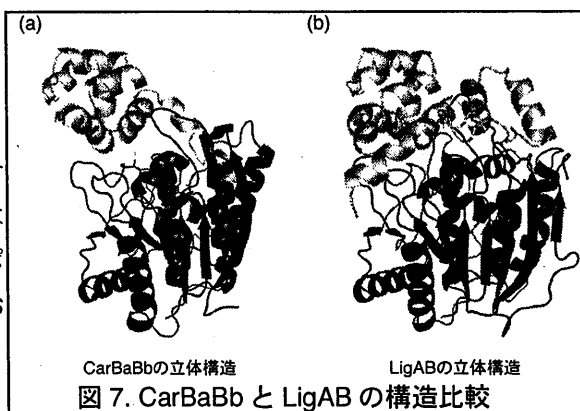


このことは野生型酵素において、DBT の *cis*-diol 体、monohydroxy 体 (*cis*-diol 体の脱水生成物と考えられる) が複数種検出される結果と一致する。一方、chain B, C での結合位置では酸素-硫黄間の距離は 4.2 Å となり CARDO-O が DBT に対して行う主反応である硫黄原子の酸化は説明できなかった。Sulfoxidation の進行には硫黄原子の高い反応性が重要であることも推測され、今後の検討が必要である。

4. $\alpha\beta$ 型メタ開裂酵素 CarBaBb の立体構造解析

メタ開裂酵素 (extradiol dioxygenase)の研究は歴史も古く、反応メカニズムの解明から反応サイクルの構造解明に至るまで研究が進んでいる。しかし、反応の進行に複数のサブユニットを必要とする heteromultimeric なメタ開裂酵素の研究例は少ない。CAR 分解経路の第 2 の酵素である CarBaBb も $\alpha\beta$ 型メタ開裂酵素であり、本研究では CarBaBb の反応触媒機構の解明を目指して X 線結晶構造解析を行った。以前の研究で CarBaBb は結晶化までは成功していたが、CarBaBb は $\alpha\beta$ 型メタ開裂酵素で唯一構造が報告されている protocatechuate (PCA) 4,5-dioxygenase (LigAB) とは相同性が低く、分子置換法では構造解明には至らなかった。そこで、本研究では重原子誘導体を用いた SIRAS 法にて CarBaBb の構造を分解能 1.6 Å で決定することに成功した。

CarBaBb は非対称単位中に 2 分子存在しており、複数の全く異なるループ構造などが認められるものの、LigAB と類似した核構造を有していることが明らかとなった (図 7)。また、LigB で活性中心の鉄原子に配位しているアミノ酸残基は H12, H53, E230 として保存されていた。基質ポケットは CarBa と CarBb の境界面に存在しており、CarBa の H59-K69 のヘリックスと CarBb の H117-M126 および A227-S241 のヘリックスの一



部によって構成されていた。基質ポケットの分子表面を比較したところ、単環の化合物に水酸基を導入する LigAB と比較して CarBaBb は大きく広がった構造を有している事が示された。加えて基質結合モデリングの結果、LigAB の基質である PCA とは水素結合できない位置に存在する H117 が A-diOH-BP のアミノ基との間に水素結合を形成しうる距離に存在する事から、H117 と基質間で形成される水素結合が基質の安定化と活性に必須である可能性が示唆された。

本研究は、酵素学的にも応用面からも興味深い酵素である CARDO-O の新規な基質認識機構の一端を構造生物学的に解明するとともに、特異なメタ開裂酵素の構造解明を行ったものである。CAR 分解系酵素は、環境修復・有用物質生産の両面で重要であり、本研究の成果に引き続き活性の変化した変異体を用いた動力学的な解析と新たな基質複合体の立体構造解析を通して、CARDO の反応機構の全貌が明らかとなるものと期待される。また、基質認識機構の深い理解を深めることで、将来的には反応特性をデザインされたジオキシングナーゼの創成が可能になるものと期待される。加えて、CarBaBb の立体構造が明らかにされたことにより、相同性を持たないタンパク質間の収束進化について詳細に解析できるものと思われる。