

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 宇佐美 裕亮

カルバゾール (CAR) 代謝における初発酸化酵素として働く carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) は広い基質特異性を有する。加えて、反応の種類としても CAR 等に対してはヘテロ原子に隣接する炭素原子とその隣の炭素原子への二水酸化、ナフタレン等の多環芳香族炭化水素に対しては分子の空間的に空いた位置への二水酸化を触媒し、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一水酸化を触媒するという反応種選択性を示す。基質に特異的な反応を CARDO が選択的に触媒する理由を明らかにするため、CARDO において酸化反応を触媒する CARDO-O の構造を元に基質ポケットを構成する 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ている。本論文は、基質特異性の変化した変異酵素の基質・酸素複合体の構造を X 線結晶構造解析・モデリングにより決定し、CARDO が多様な反応を触媒する際の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ている。さらに、ヘテロ多量体構造を有する CAR 分解系のメタ開裂酵素の新規な基質認識と四次構造を X 線結晶構造解析により明らかにすることを第二の目的としている。

芳香族化合物の細菌による分解についてジオキシゲナーゼを中心に概説した序論に引き続き、第二章では、基質複合体の構造を得るための前段階として、5 種類の変異酵素の立体構造を明らかにした。

第三章では、第二章で得られた変異酵素を用いて基質複合体の構造を明らかにした。その結果、CAR に対して野生型酵素と同様の活性を示す F275W において、CAR は野生型酵素とほぼ同じ位置に結合しており、9a 位と 1 位の炭素原子が水酸化されることが示唆された。一方、CAR から 1-hydroxycarbazole への変換効率が上昇した I262V および Q282Y においては CAR の近傍に新たな水分子が見出され、それに伴って結合位置が変化していた。その結果、両変異酵素においては 1 位と 2 位の炭素原子が水酸化されることが示唆された。I262V においては酸素基質複合体の構造も明らかにした結果、得られた構造では CAR は野生型酵素とほぼ同じ位置に結合していた。このことから、CAR に対する活性が変化した変異酵素では基質が 2 通りの結合をするため、野生型酵素とは異なる変換産物が出来ることが示された。また、野生型酵素ではほとんど反応しない FN を 4-hydroxyfluorene へと変換する活性が上昇した F275W と FN の複合体の構造を明らかにした結果、F275W においては FN の 3 位と 4 位の炭素原子が酸化されることも示された。さらに、DBT に対する一水酸化機構を明らかにするため、野生型酵素と DBT の複合体構造を明らかにしたところ、DBT の芳香環が活性中心上に存在しており、推定 monohydroxy 体が生成する際の結合状態と考えられた。一方、酸化されうる位置にスルフィド硫黄は存在していなかった。このことから、DBT-5-oxide は野生型酵素に DBT を与えた場合の主生成物であるが、活性中心上で活

性化された酸素原子の攻撃により生成するのではなく、酸素の活性中心で一度活性化された酸素が基質水酸化に用いられずに過酸化水素として離脱する反応が起き、生じた過酸化水素と DBT の間で起こる化学反応によって生成した可能性が示された。

第五章では、CARDO による初発酸化反応後の産物 (2'-aminobiphenyl-2,3-diol) に対してメタ開裂反応を触媒する CarBaBb の立体構造を明らかにした。白金原子誘導体結晶を用いた SIRAS 法にて分解能 1.6 Å にて構造を明らかにした。CarBaBb の基質ポケットはビフェニル環を有する基質への酸化反応を行うため広がった構造をしていた。モデリングにて基質の結合様式を推定した結果、His117 が基質の位置の決定と活性に必須なアミノ酸残基である可能性が示唆された。加えて、他の類縁酵素において基質の脱プロトンに関与する His 残基は His185 として保存されていたが、酵素のみの構造では基質の水酸基と水素結合を形成できる位置に存在していなかった。このことから、基質結合時には His185 が移動して基質の水酸基との水素結合を形成し、脱プロトンに関与するものと推測された。

以上、本論文は CARDO 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共に、特異なメタ開裂酵素の構造解明を行ったものであり、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。