

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 21 年度博士課程 進学
氏 名 梅田 隆志
指導教員名 山根 久和

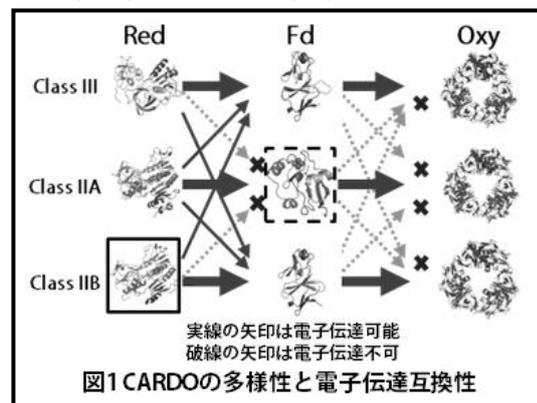
論文題目

芳香環二水酸化酵素の電子伝達機構の解明

Carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO)は、細菌によるカルバゾール(CAR)分解の初発酸化酵素であり、CAR の 1 位及び 9a 位の炭素に対する二原子酸素添加反応を触媒する。CARDO は実際に水酸化反応を触媒する oxygenase (Oxy)と、NADH からの電子を Oxy に伝達する ferredoxin reductase (Red), ferredoxin (Fd)の三つのコンポーネントから構成される (図 1)。

CARDO は Oxy が非ヘム鉄及び Rieske 型[2Fe-2S]クラスタを持つことから、Rieske non-heme iron oxygenase (RO)という酸化酵素群に属する。RO は電子伝達系の数と種類の違いにより、IA, IB, IIA, IIB, III の 5 つのクラスに分類される。当研究室では、CAR 資化菌として *Novosphingobium* sp. KA1 株、*Nocardioides aromaticivorans* IC177 株、*Pseudomonas resinovorans* CA10 株を単離しているが、それらに由来する

CARDO は、Oxy が互いに高い相同性を示し (一次配列で >44% identity, >75% similarity)、かつ同一の化合物を主要な基質としているにも関わらず、Fd と Red の



特徴の違いからそれぞれクラス IIA, IIB, III に分類される。主要な基質が同一な RO において電子伝達系に多様性がある例は他になく, CARDO は RO の電子伝達機構を明らかにする上で格好の材料であると言える。

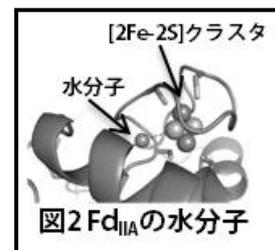
また, 以前の電子伝達系の互換性の解析から, CARDO においては, Oxy-Fd 間の認識は厳密で異なるクラスの組み合わせだと電子が伝達されない一方, Fd-Red 間の選択性が低くクラスの異なる組み合わせでも電子が伝達されることが明らかになったが, これは他の RO と同様の傾向であった。しかし興味深いことに, KA1 株由来 Fd は特異的に他のクラスの Red からは電子を受け取ることが出来ない。すなわち, クラス IIA 型 Fd は電子伝達のカウンターパートとの認識が厳密であるという他にない特徴を持つことが明らかとなっていた (図 1)。

本研究では, CARDO コンポーネントの結晶構造解析, コンポーネント間相互作用の親和性の解析を行うことにより, RO に普遍的なコンポーネント間相互作用の分子メカニズムを明らかにすること, また, クラス IIA CARDO の例外的な相互作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

クラス IIA 型 Fd の結晶構造解析

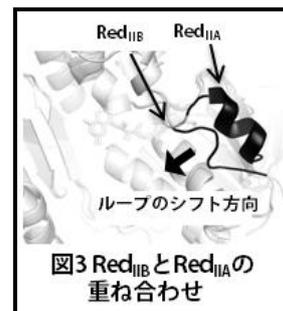
PEG MME550 を用いて嫌気条件下において Fd_{IIA} (以降, CARDO が属するクラスに基づき各々の株由来各コンポーネントを Fd_{IIA} のように表す)の結晶を取得し, 分解能 1.9 Å で構造を決定した (図 1 破線四角)。

Fd_{IIA} の主鎖全体構造は, 過去に報告がある, Fd_{IIA} と同じタイプである Proteo-type ferredoxin と類似していたが, Fd_{IIA} においてのみ [2Fe-2S] クラスタとクラスタ結合ループの間に水分子が存在していた (図 2)。Fd_{IIA} では, この水分子の存在により [2Fe-2S] クラスタ周辺に他とは異なる水素結合ネットワークが形成されていた。さらに, 水分子が [2Fe-2S] クラスタのリガンドである Cys の硫黄原子と水素結合を形成していた。



クラス IIB 型 Red の結晶構造解析

酒石酸カリウムナトリウムを用いて Red_{IIB} の結晶を取得し, 分解能 3.54 Å で構造を決定した (図 1 実線四角)。分解能が低いため, アミノ酸側鎖の詳細な議論は出来ないが, 主鎖構造を Red_{IIA} と比較した。Red_{IIB} は Red_{IIA} と比べて, 推定相互作用領域に存在するループが内側にシフトしていた (図 3)。Fd_{IIB} は Fd_{IIA} と比べて矢じりのような形に近く, 相互作用領域が狭い (図 1)。Red_{IIB} は当該ループをシフトさせて相互作用領域を狭めることで Fd_{IIB} と適切な複合体形成が行えると考えられる。



電子伝達複合体のドッキングシミュレーション

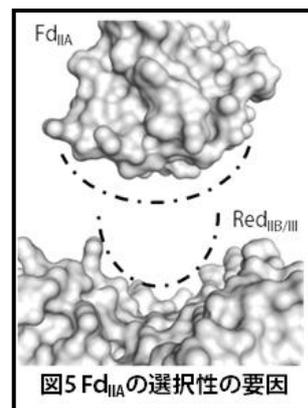
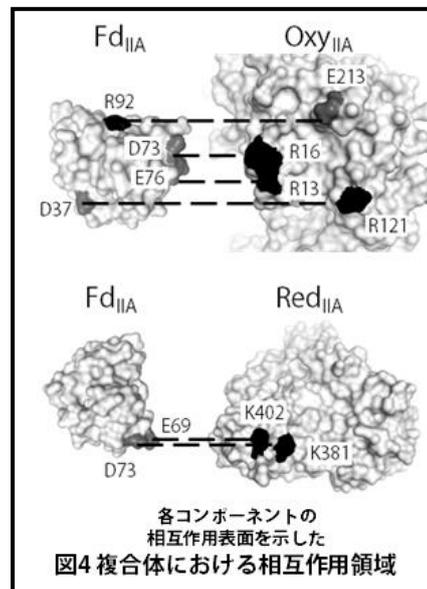
前任者により Oxy_{IIA}, Red_{IIA} の結晶構造が明らかとされているため, Oxy_{IIA}, Fd_{IIA}, Red_{IIA} の単体構造を基に ZDOCK による Oxy_{IIA}:Fd_{IIA}, Fd_{IIA}:Red_{IIA} 複合体のドッキングシミュレーションを行った。

推定相互作用領域では Oxy_{IIA} の窪んだ領域に対して Fd_{IIA} がはまり込むように結合しており, 鍵と鍵穴のように両者の形状が相補的になっていた。加えて,

Oxy_{IIA}の正に帯電している領域とFd_{IIA}の負に帯電している領域が接近するように結合しており局所的な電荷の対が形成されていた(図4上). この領域において, 水素結合や塩橋を形成しているアミノ酸残基が特に多く存在しており, 相補的な形状に加えて表面電荷の相補性が, Oxy_{IIA}:Fd_{IIA}複合体形成に重要な役割を果たすと考えられた.

また, OxyとFdの結合表面は, 各クラスのもので異なる形状と異なる電荷分布を持つ. このため, CARDO_{IIA}について本研究で示したような両者の相補性が各クラス特異的な複合体形成(各クラスのOxy-Fd間での厳密な相互認識)を引き起こす原因であり, 異なるクラス間での電子伝達を不可能にする要因と言える.

一方, Fd_{IIA}:Red_{IIA}複合体の推定相互作用領域ではOxy_{IIA}:Fd_{IIA}複合体と同様に形状が一致するように結合していた. しかし, 表面電荷の相補性はOxy_{IIA}:Fd_{IIA}と比べてそれほど観察されなかった(図4下). Red_{IIA}は他のクラスのFdへ電子を渡すことが可能であることを考え合わせると, Fd:Red複合体形成の可否には表面電荷の相補性は主要な要因ではなく形状の一致の有無に大きく依存する可能性が示唆された. Fd_{IIA}は他のクラスのFdと比べて相互作用領域が嵩高い形状をしており, これに対応するようにRed_{IIA}の窪み(相互作用領域)が, 構造が報告されているクラスIIBに属するreductaseよりもすり鉢状に広がっている. すなわち, Fd_{IIA}が他のクラスのRedから電子を受け取ることが出来ない理由は, 他のクラスRedの結合領域(窪み)が小さいために結合自体が起こらず電子伝達中心同士が接近出来ないからであると予想された(図5).



コンポーネント間相互作用の親和性の測定

上で, 電子伝達選択性の可否を決定する要因をタンパク質の立体構造の面から予測したが, “電子が伝達されない”ことが“複合体を形成しないから”なのか, あるいは“複合体は形成されても電子伝達が起こらないから”なのかは, 実験的に証明されていない. そこで, 等温滴定型熱量計 (ITC : Isothermal Titration Calorimetry)を用いてコンポーネント間の解離定数などを求めることで結合状態を物理パラメーターを用いて評価した.

OxyとFdの本来のクラス間の組み合わせでは滴定に伴い吸熱反応が起きていることが確認され, 解離定数はIIA型, IIB型, III型でそれぞれ74.1 μM, 465 μM, 224 μMと弱い親和力をもち, 相互作用の主な駆動力は疎水性相互作用であることが示された. 一方, 異なるクラス間のOxyとFdの組み合わせでは滴定に伴う明確な熱量変化が観測されず, 複合体自体が形成されないことが明らかとなった. FdとRedの本来の組み合わせでは, Oxy-Fdと同様に吸熱反応が観測され, 解離定数はIIA型, IIB型, III型でそれぞれ53.6 μM, 125 μM, 296 μMであった. Fd-Redの

異なるクラスの組み合わせでは、Fd_{IIB}-Red_{IIA}の組み合わせでのみ熱量変化が観察され、解離定数は 516 μM であった。他の組み合わせでは、相互作用はかなり弱い。そのため、電子が伝達されるものであっても解離定数を決定するには至らなかった。先述のように、複合体構造予測や親和性の測定結果から Fd-Red 間の相互作用は疎水性相互作用を駆動力とすることが示唆されたが、疎水性相互作用は非特異的に起こる場合が多い。このため、Fd と Red のクラスの異なる組み合わせでの電子伝達は電子伝達中心が接近しうる場合に偶発的に起こる可能性が考えられた。

クラス IIA 型 Fd の酸化還元電位の測定

Cyclic voltammetry を行った結果、Fd_{IIA} は +107 mV という酸化還元電位を示した。Fd_{IIA} のように鉄硫黄クラスタが Cys のみで配位される ferredoxin では、一部の [4Fe-4S] 型 ferredoxin が高い酸化還元電位を示し、high potential iron-sulfur protein (HiPIP) と呼ばれているが、[2Fe-2S] 型では類似の報告は知る限りなく、Fd_{IIA} は初めての [2Fe-2S] 型 HiPIP の例であることが明らかとなった。この高い酸化還元電位は、Fd_{IIA} が特異的に水分子を [2Fe-2S] クラスタ近傍に有することに起因すると考えられる。クラスタ近傍の水素結合ネットワークは ferredoxin の酸化還元電位を決定するのに重要な因子であると考えられているが、Fd_{IIA} は水分子の存在により他の Proteo-type ferredoxin と比べて異なる水素結合ネットワークを有し、かつ水分子が [2Fe-2S] クラスタと直接水素結合を形成しており、還元型 [2Fe-2S] クラスタの安定化に寄与するためであると推測される。

また、水分子が Fd_{IIA} の酸化還元電位が高い要因であるということは、水分子のプロトン化状態の違いにより酸化還元電位が変化する可能性が考えられた。事実、[2Fe-2S] クラスタが二つの His と二つの Cys により配位される Rieske-type ferredoxin では酸化還元電位の pH 依存性が見られる。一方、[2Fe-2S] クラスタが Cys のみで配位される ferredoxin では酸化還元電位に pH 依存性は見られないが、Fd_{IIA} は pH が 1 上昇すると酸化還元電位が約 60 mV 低下するという結果が得られた。このことから、水分子が Fd_{IIA} の高い酸化還元電位の要因になっていることが明らかとなった。

総括

本研究では、今まで構造解析が完了していなかった CARDO コンポーネントの結晶構造を明らかにし、RO のコンポーネント間相互作用をシミュレーションと ITC を用いて解析することで電子伝達選択性の要因を提唱した。また、Fd_{IIA} が世界で初めての [2Fe-2S] 型 HiPIP であることを発見し、その高い酸化還元電位の理由を提唱した。P450 の電子伝達系は RO と共通するものもあるが、電子伝達選択性は異なり、酸化酵素-ferredoxin 間でも電子が伝達されるものも多い。このため、RO と P450 のコンポーネント間相互作用様式の違いを見出すことで、RO のみならず、より包括的な、電子伝達タンパク質間相互作用のメカニズムに迫ることが期待される。

公表論文

Umeda et al., Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a novel ferredoxin involved in the dioxygenation of carbazole by *Novosphingobium* sp. KA1. *Acta Crystallogr. Sect. F* **64**:632-635 (2008).