

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 梅田 隆志

---

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、oxygenase (Oxy) と電子伝達タンパク質である ferredoxin (Fd)、Fd reductase (Red) の三つのコンポーネントから構成される Rieske non-heme iron oxygenase (RO) の一種である。現在までに由来の異なる3種の CARDO が得られているが、それらは電子伝達様式の違いからクラス IIA、IIB、III に分類されている。これらを用いたコンポーネント互換性の解析から、Oxy-Fd 間の認識は厳密で異なるクラスの組み合わせでは電子が伝達されない一方、Fd-Red 間の選択性は低くクラスの異なっても電子が伝達されることが明らかになっている。これは、他の RO と同様の傾向である。なお、クラス IIA 型 Fd は例外的に他のクラスの Red からは電子を受け取れず、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も合わせて明らかとなった。このような背景に引き続き、本博士論文研究は、RO に普遍的なコンポーネント間相互作用の分子機構を明らかにすることと、クラス IIA 型 Fd の例外的な相互作用様式を詳らかにすることを目的として行われた。

本論文は3章からなり、第1章では序論として電子伝達に関する RO 研究の現状を、構造生物学的・生化学的観点から述べている。

第2章ではクラス IIA 型 Fd が他と比べて著しく高い酸化還元電位を取ることを示し、クラス IIA 型 Fd が Cys 配位型[2Fe-2S] ferredoxin として世界で初めての高電位鉄硫黄タンパク質であることを明らかにした。次に、結晶構造解析とアミノ酸置換体の解析に基づいて高い酸化還元電位をとる構造的要因が、[2Fe-2S] クラスタ近傍に存在する水分子であることを明らかにした。また、クラス IIB 型 Red の結晶構造解析にも成功し、電子伝達選択性に構造的考察を加えている。

第3章ではクラス IIA 型の CARDO における Oxy:Fd、Fd:Red 複合体の構造予測を行い、コンポーネント間相互作用様式を推定した。Oxy と Fd の推定相互作用領域では、Oxy の窪んだ領域に対して Fd 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されていること、Oxy の正に帯電している領域と Fd の負に帯電している領域が近接しており、局所的な電荷の対が形成されていることを示した。このことから、Oxy と Fd の特異的相互作用には形状が一致することと表面電荷が相補されることの双方が重要であることが明らかに

なった。Fd と Red の推定相互作用領域では、Oxy と Fd の場合と同様に形状が一致する様子が見られたが表面電荷はあまり相補的ではなく、形状が一致することで電子伝達中心どうしが近づけることが最も重要であることも示された。一方、クラス IIA 型 Fd は他と比べてかさ高い相互作用領域を持ち、それに対応するようにそのカウンターパートは幅の広い相互作用領域を持っていた。クラスを組み替えた場合、かさの小さい Fd は幅の広い相互作用領域をもつ Red と幅の狭い相互作用領域を持つ Red の両方へと近づくことは可能であるが、かさ高いクラス IIA 型 Fd は狭い相互作用領域をもつ Red へは近づくことが出来ないために電子を受け取ることが出来ないという、クラス IIA 型 Fd に特異な電子伝達選択性の原因も明らかにした。

本論文では、さらに“電子が伝達されない”ことが“複合体を形成しないから”なのかを実験的に検証するため、コンポーネント間の結合状態を等温滴定型カロリメトリ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、弱い親和力を持つことが示された。また、異なるクラス間の Oxy と Fd の組み合わせでは複合体自体が形成されないと思われる結果が得られた。一方、Fd と Red の本来の組み合わせでは、Oxy-Fd と同様に弱い親和力を持つことが示され、異なるクラスの組み合わせでは、クラス IIB 型 Fd-クラス IIA 型 Red の組み合わせでのみ親和性が観察され、他の組み合わせでは相互作用の検出には至らなかった。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支持された。

以上、本研究は、難分解性物質の分解系によく見られる芳香環水酸化ジオキシゲナーゼのモデルとして CARDO を用い、これまでに明らかとされていなかった RO の電子伝達選択性の要因を提唱したもので、産業上、応用上重要なものである。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。