

Carbazole 1,9a-dioxygenase system の電子伝達複合体の X 線結晶構造解析

芦川 雄二(0008805)

東京大学大学院農学生命科学研究科 D3

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

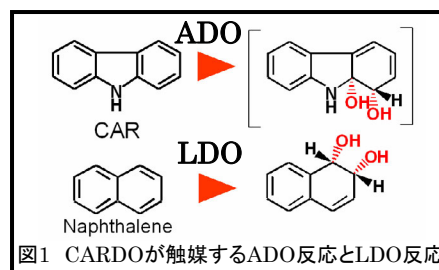
電話番号 03-5841-3064, Fax 03-5841-8030

E-mail aa37089@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

<背景及び目的>

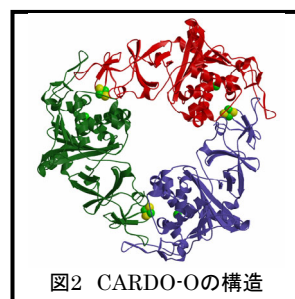
近年、難分解性化合物による環境汚染は深刻さを増し、重大な問題となっている。この難分解性化合物の自然環境中における分解には迅速な環境適応能を有している細菌が重要な役割を果たしている。難分解性化合物の一種である芳香族化合物の細菌による分解は、芳香環に酸素原子を水酸基として導入する反応（初発酸化反応）から始まり、環開裂反応、加水分解反応が起こる事で芳香環が分解する場合が大多数である。一連の反応の中でも初発酸化反応は非常に重要であり、芳香族化合物分解系の鍵反応と言えるため、細菌による難分解性化合物の **bioremediation** に関する研究の中で、初発酸化反応は特に精力的に研究がなされている。

我々の研究グループは、ヘテロ環式芳香族化合物を中心とする難分解性化合物に対する分解系酵素群について詳細に研究を行っており、特に *Pseudomonas resinovorans* CA10 株、*Janthinobacterium* sp. J3 株、*Sphingomonas* sp. KA1 株等、種々のグラム陰性細菌のダイオキシン・カルバゾール (CAR) 分解系酵素群の研究において世界的な成果を挙げている。上述したこれら 3 株の保持する、CAR の初発酸化酵素 (CAR 1,9a-dioxygenase [CARDO]) はいずれも、本来の基質である CAR 以外に、dibenzo-*p*-dioxin や dibenzofuran (ダイオキシンのモデル化合物) に対して、核間とそれに隣接する炭素原子に二酸素原子を添加する反応(angular dioxygenation [ADO])を触媒する (図 1)。CARDO は塩素置換基を有するダイオキシンそのものに対しても ADO を触媒することができ、ダイオキシン分子の平面骨格は崩壊され、その毒性はわずか一段階の反応で劇的に低下する。また、CARDO は naphthalene 等の多環芳香族化合物に対しては核間とは異なる位置に lateral dioxygenation [LDO]を触媒する (図 1)



一方、dibenzothiophene に対しては sulfoxidation を触媒するなど、広い基質特異性を有している。また、CARDO は酸化酵素と電子伝達系で構成される Rieske non-heme iron oxygenase system (ROS) に属しており、基質を認識すると共に酸素添加反応を実際に触媒する terminal oxygenase (CARDO-O)と、CARDO-O に電子を伝達する ferredoxin (CARDO-F)、NADH から CARDO-F へと電子を伝達する ferredoxin reductase (CARDO-R)の3つのタンパク質により構成される。CARDO-O には先に述べた広い基質特異性を有すること以外に挙げる興味深い特徴がある。i) 既知の ROS の terminal oxygenase とは相同性が非常に低く、アミノ酸配列を基にした分子系統解析の結果から新規性の高い酵素であることが示されている。ii) 300 種以上の既知 ROS の中で、ADO を触媒できる ROS の報告は 5 種程度であり、なぜこの反応を触媒できるのか興味を持たれる。iii) 他の多くの ROS の terminal oxygenase が $\alpha_3\beta_3$ 型の構造を取るのに対し、CARDO-O は α_3 型の構成を取る。また、CARDO-F-CARDO-R 間の相互認識はあまり厳密ではないが、CARDO-O-CARDO-F 間のそれは厳密であることも確認されている。

CARDO system のうち CARDO-O と CARDO-F については既に立体構造の解明に成功している。得られた立体構造から、CARDO-O と CARDO-F の厳密な相互認識や電子伝達に関与している残基が推定され、その残基の置換体を作製することでその相互認識及び電子伝達に関する知見を得るための実験を計画中である。しかしながら、現在までに terminal oxygenase と ferredoxin の相互認識や電子伝達を原子レベルで明らかにした例は無く、非常に興



味が持たれるところである。また、CARDO の電子伝達機構について詳細を原子レベルで理解できれば、CARDO の環境汚染物質酸化能（ダイオキシン等に対する）を、電子伝達系を効率化することで上昇させることが原理的には可能になる。すなわち、生物を利用した環境修復（バイオレメディエーション）のための新たな手段開発へと繋がる可能性も考えられる。

このような背景から、本研究では CARDO の component 間の複合体立体構造情報を得ることで、立体構造を基にした相互認識及び電子伝達機構を解明することを目的として、CARDO の component 間の複合体立体構造について X 線構造解析に取りかかることにした。これまでの研究では、CARDO を構成する 3 つのタンパク質の複合体 (CARDO-O: CARDO-F, CARDO-F: CARDO-R, CARDO-O: CARDO-F: CARDO-R) の結晶化を行い、CARDO-O: CARDO-F 複体の結晶化に成功している。しかし、実験室レベルの X 線装置で構造解析を行えるほど十分な分解能は得られていない。このため、放射光の使用により、高分解で良質なデータが得られることで、より詳細な構造解析を行うことが可能となることから、SPring-8 のビームライン (BL41XU) を使用する実験を計画した。また、未だ CARDO-O の基質複合体構造が得られていないことから、この複合体結晶を用いて、ADO 反応機構や基質認識機構を解明するための基質複合体構造や酸素基質複合体構造の取得も試みた。

<今回のビームタイム以前までの結果>

SPring-8 のビームライン (BL41XU) を使用する前に、高エネルギー加速器研究機構において CARDO-O: CARDO-F 複合体の立体構造を決定した (分解能 1.9 Å)。非対称単位中に 1 分子の CARDO-O とそれに突き刺さる様に 3 分子の CARDO-F が存在していた (図 3)。

この立体構造中において、お互いの電子伝達に

関与している [2Fe-2S] cluster 同士が近接しており、CARDO-F から

CARDO-O への電子伝達が可能であると

考えられた。また、活性中心付近の立体構造は単体の CARDO-O と比較して殆ど

変化が見られず、この結晶を用いて基質複合体を

求めるのは問題ないと考えられた。

ここで、現在までに得られている知見から、ADO 反応機構を推定した (図 4)。ADO 反応は活性中心の鉄原子が還元されている状態 (Fe^{2+}) から始まると考えられている [図 4 中の (1)]。この状態の酵素が CARDO-F から 1 つ電子をもらうことで [2Fe-2S] cluster も還元状態になる [図 4 中の (2)]。さらに、基質 (carbazole) と酸素が結合 [図 4 中の (3)、(4)] し、反応中間体を形成する [図 4 中の (5)]。最終的にもう 1 つの電子とプロトンを受け取り、反応生成物が放出され、反応開始の状態に戻ると推定した。BL41XU を使用する以前に、高エネルギー加速器研究機構で上記の構造 [図 4 中の (1)] と、結晶を処理することで、還元状態 CARDO-O: CARDO-F 複合体構造 [分解能 1.8 Å、図 4 中の (2)]、酸化状態での基質複合体構造 [分解能 2.0 Å、図 4 中の (3)]、酸素複合体構造 [分解能 1.85 Å、図 4 中の (4)] と考えられる立体構造も取得した。

以上のことから、今回のビームタイムでは得られた立体構造のさらなる高分解能データの取得を試みた。さらに、まだ得られていない図 4 中の (3) と (5) の立体構造を取得するも試みた。

<方法>

各タンパク質 (CARDO-O と CARDO-F) を別々に精製し、タンパク質濃度 20 mg/ml でモル比が CARDO-O: CARDO-F = 約 1 : 6 の条件で混合して 2 つの結晶化条件 (1: 0.05 M Bis-Tris pH6.5, 14% PEG MME2000, 1-2 mM sodium dithionite, 2: 0.1 M ammonium acetate, 0.05 M Bis-Tris pH5.5, 12.5% PEG 3550) で結晶化を行った (hanging-drop 法, 20°C)。還元状態の基質複合体結晶は、上記の条件で得られた結晶を 20 mM sodium dithionite 及び 5% の DMSO 飽和 CAR を含む結晶化 buffer に 20 分間ソーキングすることで調製した。また、酸素基質複合体結晶は、基質複合体結晶を空气中に

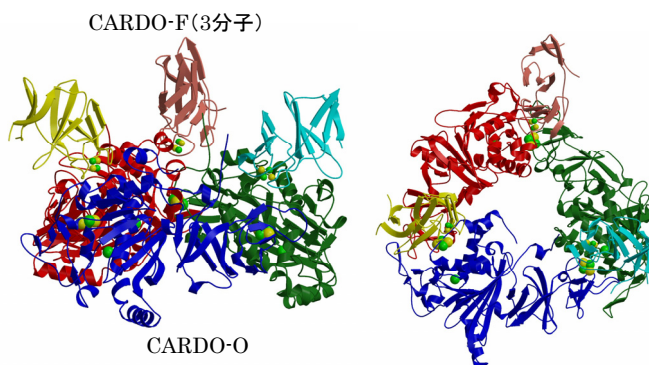


図3 CARDO-O: CARDO-F複合体構造

(左: 横から見た図、右: 上から見た図)

5分以上曝すことで調整した。得られた回折データは、ラインの HKL2000 でデータ処理をし、CCP4 と CNS を用いて構造解析を行った。

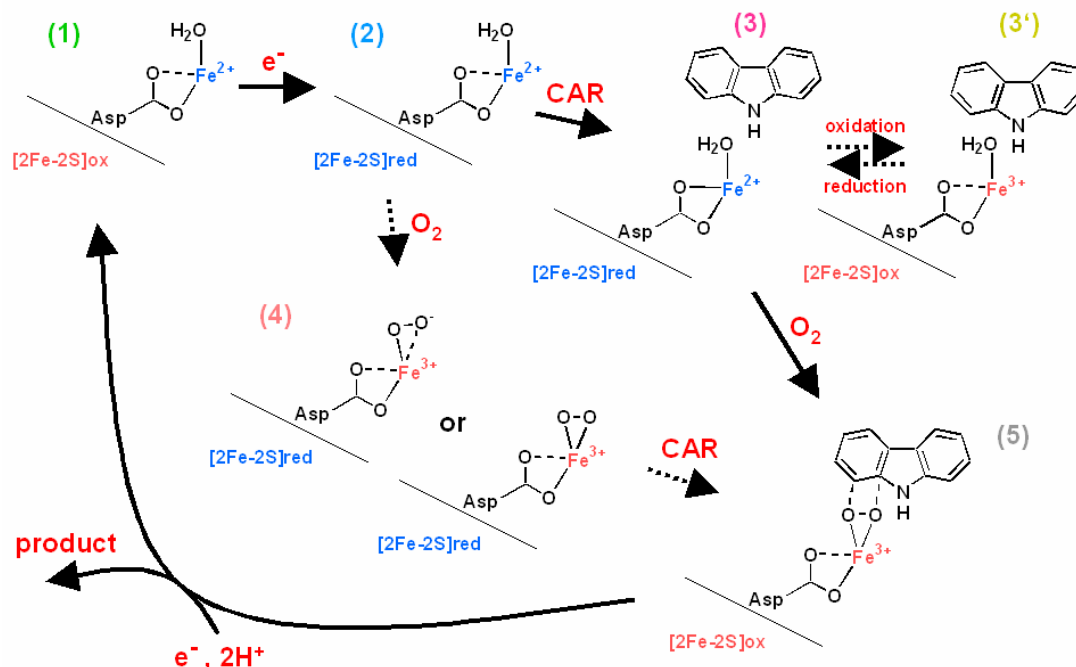


図4 推定ADO反応機構

活性中心の鉄原子とそれに配位しているAsp及び[2Fe-2S] clusterだけを示した

<結果及び考察>

まず、以前得られた構造のさらなる高分解能データの取得を試みたが、前以上の分解能データは得ることができなかった。

方法に記した方法で、図4中の(3)と(5)の立体構造と思われる立体構造の取得に成功した[図4中の(3):分解能2.1 Å、(5):分解能2.0 Å]。しかしながら、(5)の状態から反応が進んだ酸素基質反応中間体の立体構造は得ることができなかった。原因としては、結晶をソーキングしている溶液のpHが低すぎる事が考えられた。Sodium dithioniteを添加して還元状態にする際に同時にpHも低下してしまったため、反応が進まなかった可能性が挙げられる。

以前取得したデータと今回のビームタイムで取得した立体構造から、CARDOにおけるADO反応機構での活性中心付近の構造変化が明らかになった。

- i) 鉄原子に配位しているAspはタンパク質が完全な還元状態になると二配位に近づき、還元状態で基質が結合すると二配位になる。タンパク質が酸化状態になるに従い、元の一配位に戻る。
- ii) 基質複合体では、酸化還元状態で鉄原子と基質間の距離が変化する。すなわち、基質pocket内の基質の結合位置は変わらないが、鉄原子が基質から離れるように構造変化

- を起こす。これは、基質と鉄原子の間に酸素原子を導入するための動きだと思われる。
- iii) 酸素複合体における酸素の結合様式は **side-on** 様である。これは、既に報告のある **naphthalene dioxygenase** と同様であった。
 - iv) 酸素基質複合体と思われる立体構造では、結合している酸素原子がさらに **side-on** 様になっている。この構造変化により、基質に二原子酸素が導入することが可能な構造になると考えられる。