

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 王 翌 霞

細菌による含窒素芳香族化合物カルバゾール (CAR) の好氣的分解経路における初発酸化反応は、芳香環二原子酸素添加酵素 (Rieske non-heme iron oxygenase) の一種である carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) により触媒される。この酵素は、反応を触媒する酸化酵素 (Oxy) と、NADH から電子を受け取る還元酵素、その電子を Oxy に渡すフェレドキシン (Fd) により構成される。CARDO は、CAR に対し分子状酸素を 2 つの *cis* 型水酸基として導入する反応を触媒するが、効率的な酸化反応の進行には、二度の Fd と Oxy の結合解離を含む基質取り込みと反応産物生成・放出のサイクルが円滑に進む必要がある。CARDO の反応サイクルは、Oxy が Fd から電子を受け取り、鉄硫黄クラスターが還元されることで開始する。この状態の Oxy に CAR と酸素分子が結合すると、CAR の反応産物である 2'-aminobiphenyl-2,3-diol (ABP-diol) が生成する。ここで再度 Oxy が Fd から電子を受け取ることで活性中心鉄が還元され、ABP-diol の解離が起こり、Oxy は次の反応サイクルへ入る準備が整う。本論文は、この反応サイクルにおける Oxy の構造変化を結晶構造解析により明らかとすることを目的としている。

本論文は 4 章から成り、第 1 章では序論として芳香族化合物による環境汚染や Rieske non-heme iron oxygenase に関する研究の現状、CARDO に関する過去の研究について述べられている。CARDO については、上述の反応サイクルのうち、酸化型 Oxy の構造、酸化型 Fd が還元型 Oxy に結合した構造 (Fd が Oxy に結合し電子が渡った直後の構造に相当する) と、そこから Fd が解離した還元型 Oxy の構造が既に明らかになっており、本研究ではその次の反応以降を研究対象とすることが述べられている。

第 2 章では (1)還元型 Oxy に基質である CAR が結合した構造、(2)酸素分子が結合した構造、(3)CAR の中間代謝産物と反応産物である ABP-diol が結合した構造、について議論されている。(1)については嫌気チャンバー内で調製した還元型 Oxy の結晶をカルバゾールにソーキングすることで、(2)については還元型 Oxy の結晶を純酸素に曝露させることで、(3)については(1)で調製した結晶を純酸素に曝露させることで結晶が取得され、いずれも分解能 2.2 Å で構造が決定された。その結果、Oxy に CAR が結合すると活性部位の入口が閉じるようにタンパク質表面が動くことで CAR をトラップし、CAR がアルキルペルオキシ型の中

間体を経て ABP-diol に変換されるとこの入口が再び開くことで ABP-diol の解離に備えることが明らかとなった。

第 3 章では、CARDO の反応サイクルにおいて上述の(3)の次のステップに相当する、(4) 反応産物生成後の Oxy に酸化型 Fd が結合した構造 (Fd が Oxy に結合し電子が渡った直後の構造に相当する)、(5)そこから Fd が解離した構造、について議論されている。ABP-diol は市販されていなかったため、本章では類似した構造を持つ biphenyl-2,2',3-triol (BP-triol) 及び biphenyl-2,3-diol (BP-diol) が使用された。(4)については Oxy と Fd の複合体の結晶に BP-triol と BP-diol をそれぞれソーキングすることにより、また(5)については Oxy の結晶に同様にソーキングすることにより結晶が調製され、それぞれ分解能 1.9~2.3 Å 程度で構造が決定された。その結果、反応産物生成後に Fd から Oxy に電子が渡ること、活性中心鉄に固定されていた反応産物の芳香環が自由に動くようになり、反応産物が解離する過程が結晶構造中で観察された。また、反応産物生成時に大きく開いた活性中心の入口は、反応物解離後に少し小さくなって元のサイズに戻ることも明らかとなった。

以上の結果を踏まえ、第 4 章では CARDO の反応サイクルについて、活性中心とその入口の動きに焦点を当てて一連の反応過程が解説された。Rieske non-heme iron oxygenase は研究例の多い酵素であるが、大半は酵素の基質特異性についての研究であり、構造についても Oxy 単体しか解かれていないものがほとんどである。最も有名な研究例であるナフタレンジオキシゲナーゼでさえも反応サイクルの一部分しか解明されていない。本研究において CARDO の反応サイクルに出現する全ての構造が明らかにされたことは、他の Rieske non-heme iron oxygenase の反応過程を考える上でも極めて重要な意味を持ち、学術上応用上寄与するところが少なくない。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。