

審査の結果の要旨

氏名 蔡 弼丞

Rieske non-heme iron oxygenase (RO) は、非ヘム鉄と Rieske 型 [2Fe-2S] クラスターを持つ酸化酵素 (Oxy) と、NADH からの電子を Oxy へと伝達する電子伝達コンポーネントから構成される。電子伝達コンポーネントはレダクターゼ (Red) のみで構成されるものと、Red とフェレドキシン (Fd) の二つのコンポーネントで構成されるものの二種類がある。Oxy には 3 つの α サブユニットからなるホモ 3 量体構造、あるいは α サブユニットと β サブユニット 3 つずつからなるヘテロ 6 量体構造のものがある。Fd と Oxy の電子伝達時の結合様式については、 α_3 構造の Oxy を有する carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) において詳細な解析が行われ、Fd は Oxy のドーナツ状構造の上側の α サブユニットの境界面に結合することが明らかになっている。しかし、 $\alpha_3\beta_3$ 構造の Oxy では Fd 結合様式がドッキングシミュレーションで推測されているのみであり、Oxy の α サブユニットの境界面に上側から結合する可能性 (CARDO の場合と同様な結合様式) と側面の α サブユニットと β サブユニットの境界面に結合する可能性の二つが示唆されていた。この様な背景を受け、本論文は、cumene 分解菌である *Pseudomonas fluorescens* IP01 株由来の cumene dioxygenase (CDO) を材料に、Fd と $\alpha_3\beta_3$ 型 Oxy 間の電子伝達機構を実験的に解明することを目的としたもので、第 1 章の序論、第 4 章の総括と展望を含め、4 章からなる。

第 1 章で過去の当該領域の研究動向についてまとめた後、第 2 章では、まず CDO の Fd (CDO-F) と CDO の Oxy (CDO-O) の結合部位を予測するため、ドッキングシミュレーションを行っている。各種の条件でのシミュレーションの結果、他の RO を用いた過去の予測と同様に、CDO-F は CDO-O の上側の α サブユニット境界付近か側面の $\alpha\beta$ 両サブユニットの境界付近に結合する 2 つの可能性が示唆された。この結果を受けて、予測された 2 つの推定結合面付近のアミノ酸 (それぞれ 8 カ所) に単独または二重にアラニン置換を行い、大腸菌にて発現後、精製したアミノ酸置換 Oxy への Fd からの電子伝達 (Oxy の還元) を評価することで、両者の結合へのアラニン置換の影響を評価している。その結果、CDO-O の上面へのアラニン置換はほとんど電子伝達に影響しなかったのに対し、

側面へのアラニン置換が電子伝達活性を顕著に低下させることを見いだしている。特に、 α サブユニットの117番目のlysineと β サブユニットの65番目のarginineにアラニン置換を導入した場合は、電子伝達活性が非常に大きく低下することから、これら2つのアミノ酸残基がCDO-OとCDO-Fの結合に重要な残基であることも明らかにしている。

続く第3章では、第2章で明らかになったCDO-Oの側面へのFdの結合という現象を、Oxy-Fd複合体の結晶構造解析とクロスリンク法を用いて、実験的に証明することを試みている。結晶構造解析については立体構造を決定した12個の結晶中にはCDO-Fが含まれておらずFdの結合様式を決定する事はできなかったものの、クロスリンク法では、2つのタンパク質の結合を検出することに成功している。すなわち、CDO-FのSer 49を光反応性アミノ酸に置換した置換型CDO-Fと野生型CDO-Oの光架橋反応を行った結果、SDS-PAGEにおいてOxy-Fdの結合に由来すると推定されるバンドを検出している。

最後に第4章では、上記の結果を受けた総合討論を行うとともに、今後の展望についてまとめられている。特に、今回発見した $\alpha_3\beta_3$ 型OxyにおけるFd結合位置と重要なアミノ酸残基についての情報を、多くの他のROのアミノ酸配列における保存性から考察し、今回明らかにした結合位置と鍵になる2つのアミノ酸残基が、少なくともCDOと同種のRieske型Fdを含むRO(α_3 型Oxyを含むものを除くほぼ全てのRO)で広く保存されている可能性を示唆している。

以上、本論文は、原油成分や有機溶媒などの芳香属化合物やリグニンモノマー、一部のステロイドなどの好氣的微生物分解反応の鍵反応を触媒する酵素であるROにおいて、大半を占める $\alpha_3\beta_3$ 型OxyのFdからの電子伝達様式解明の端緒となるもので、RO機能の全貌解明を目指す上でも重要な基盤情報を与えるものである。得られた情報は、今後、メタゲノム解析や有用菌のゲノム解析などで取得されている電子伝達系が不明のOxyの機能解明や応用研究の展開にも貢献をする情報と言える。この意味で、本論文は学術上、応用上の観点で貢献するところが少なくない。よって審査員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものとして認めた。