

グラム陽性細菌由来新規 carbazole 代謝系の解析

東京大学大学院農学生命科学研究科
応用生命工学専攻

平成 16 年度進学	井上 謙吾
指 導 教 員	山根 久和

目次

目次	i
略語表	vi
論文の内容の要旨	viii

第 1 章 序論	1
--------------------	---

第 2 章 新規 carbazole 資化菌の取得と遺伝学的解析	18
--	----

2-1. 緒言	18
2-2. 材料と方法	19
2-2-1. 試薬	19
2-2-2. 菌株、プラスミド、及び培養液	19
2-2-3. Carbazole 資化菌の単離	21
2-2-4. Carbazole 資化菌からの total DNA の調製	21
2-2-5. Polymerase chain reaction (PCR)	22
2-2-6. 電気泳動、及び、アガロースゲルからの DNA の回収	23
2-2-7. Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)	23
2-2-8. Ligation	24
2-2-9. コンピテントセルの調製	24
2-2-10.大腸菌の transformation	25
2-2-11.大腸菌からのプラスミド抽出	25
2-2-12.シークエンス解析	27
2-2-13.サザンハイブリダイゼーション	28
2-2-14.唯一の炭素源として利用可能な化合物の探索	30
2-2-15.GC-MS を用いた IC177 株による carbaozle 分解の解析	30

2-2-16. Carbazole 代謝中間体の同定	31
2-2-17. 塩基配列の accession numbers	33
2-3. 結果と考察	35
2-3-1. 新規 carbazole 分解菌及び分解菌群のスクリーニング	35
2-3-2. 新規 carbazole 資化菌の属種の同定	35
2-3-3. 新規 carbazole 資化菌が保持する <i>car</i> 遺伝子群の解析	35
2-3-3-1. サザン解析	35
2-3-3-2. Degenerate PCR	44
2-3-4. グラム陽性 carbazole 資化菌 IC177 株の carbazole 分解	44
2-3-5. IC177 株の芳香族化合物資化能	49

第 3 章 グラム陽性細菌 *Nocardiodides aromaticivorans* IC177 株の

carbazole 代謝系遺伝子群の解析	51
3-1. 緒言	51
3-2. 材料と方法	52
3-2-1. 菌株、プラスミド、及び培養液	52
3-2-2. DNA を用いた実験	52
3-2-3. コスミドライブラリーの構築	52
3-2-4. コロニーハイブリダイゼーション	55
3-2-5. RNA の抽出	56
3-2-6. RT-PCR	57
3-2-7. 定量的 RT-PCR	57
3-2-8. <i>car</i> 遺伝子発現用ベクターの構築	59
3-2-9. 休止菌体反応	59
3-2-10. 塩基配列の accession number	61
3-3. 結果	62

3-3-1. IC177 株の <i>car</i> 遺伝子のクローニングとシーケンス解析	62
3-3-1-1. IC177 株の <i>car</i> 遺伝子群	62
3-3-1-2. その他の遺伝子	67
3-3-2. IC177 株の <i>car</i> 遺伝子のオペロン構造と転写誘導性	69
3-3-3. 大腸菌を用いた <i>car</i> 遺伝子の発現と機能解析	71
3-3-4. IC177 株 CARDO の基質嗜好性	74
3-4. 考察	77

第 4 章 *Nocardioides aromaticivorans* IC177 株由来 CARDO の

酵素学的解析	83
4-1. 緒言	83
4-2. 材料と方法	84
4-2-1. 菌株、プラスミド、及び培養液	84
4-2-2. DNA を用いた実験	84
4-2-3. タンパク質発現用ベクターの構築	84
4-2-4. タンパク質発現条件の検討	84
4-2-5. タンパク質の定量	88
4-2-6. SDS-PAGE	88
4-2-7. 精製用タンパク質を含む粗酵素抽出液の大量調製	90
4-2-8. タンパク質の精製	91
4-2-9. タンパク質の分子量の推定	91
4-2-10. 吸光スペクトルの測定	92
4-2-11. 再構成系での CARDO 活性の測定	92
4-2-12. Cyclic voltammetry	94
4-3. 結果と考察	96

4-3-1. IC177 株由来各 CARDO コンポーネントの発現系の構築	96
4-3-2. IC177 株由来各 CARDO コンポーネントの精製	96
4-3-3. 各 CARDO コンポーネントの UV/可視吸収スペクトル	102
4-3-4. GC-MS による再構成系での CARDO 活性の測定	106
4-3-5. IC177 株と CA10/J3 株由来 CARDO の電子伝達鎖の互換性の解析	108
4-3-6. IC177 株由来 CARDO-F の酸化還元電位の測定	110

第 5 章 *Nocardioides aromaticivorans* IC177 株由来 CARDO の

X線結晶構造解析	113
5-1. 緒言	113
5-2. 材料と方法	114
5-2-1. タンパク質の精製	114
5-2-2. 結晶化条件のスクリーニング	114
5-2-3. 抗凍結剤の検討	115
5-2-4. X 線回折強度データの収集と処理	116
5-2-5. 構造決定と精密化	116
5-2-6. 構造モデルの重ね合わせと作図	116
5-3. 結果と考察	117
5-3-1. IC177 株由来 CARDO-O の結晶化と X 線回折強度データの収集	117
5-3-2. 分子置換法による IC177 株由来 CARDO-O の構造決定と精密化	117
5-3-3. IC177 株由来 CARDO-O の構造	117
5-3-3-1. 全体構造	117
5-3-3-2. IC177 株由来 CARDO-O のサブユニットの構造	120
5-3-3-3. Rieske domain	120
5-3-3-4. Catalytic domain	123
5-3-3-5. Rieske domain から活性中心への電子伝達	123

5-3-3-6. 基質結合ポケット	123
5-3-3-7. CARDO-F との結合部分の推定	125
5-3-3-8. 他の CARDO-O との比較	125
5-3-4. IC177 株由来 CARDO-F の結晶化と X 線回折強度データの収集	128
5-3-5. 分子置換法による IC177 株由来 CARDO-F の構造決定と精密化	128
5-3-6. IC177 株由来 CARDO-F の構造	130
5-3-6-1. 全体構造	130
5-3-6-2. Rieske cluster	130
5-3-6-3. CARDO-O との結合部分の推定	130
第 6 章 総括と展望	134
参考文献	136
謝辞	145

略語表

Ala	alanine
Ap	ampicillin
APS	ammonium persulfate
Arg	arginine
Asp	aspartic acid
BDO	biphenyl 2,3-dioxygenase
Bis-acrylamide	<i>N, N'</i> -methylenebisacrylamide
BSA	bovine serum albumin
CARDO	carbazole 1,9a-dioxygenase
CARDO-F	ferredoxin component of carbazole 1,9a-dioxygenase
CARDO-O	terminal oxygenase component of carbazole 1,9a-dioxygenase
CARDO-R	ferredoxin reductase component of carbazole 1,9a-dioxygenase
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
Cm	chloramphenicol
Cys	cysteine
Da	dalton
DMSO	dimethylsulfoxide
dH ₂ O	deionized and distilled water
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FAD	flavin adenine dinucleotide
FMN	flavin mononucleotide
FPLC	fast protein liquid chromatography
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry
Gln	glutamine
Glu	glutamic acid
Gly	glycine
h	hour(s)
HDA	2-hydroxypenta-2,4-dienoic acid
His	histidine
HPLC	high performance liquid chromatography
Ile	isoleucine
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
Km	kanamycin
Leu	leucine
Lys	lysine
MES	2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate
min	minute(s)
MM	mineral medium
MPD	(\pm)-2-methyl-2,4-pentaediol
MSTFA	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -trimethylsilyl-trifluoroacetamide
MW	molecular weight
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
NDO	naphthalene 1,2-dioxygenase
NMM	nitrogen plus mineral medium
OD	optical density
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCB	polychlorinated biphenyl
PCR	polymerase chain reaction
PEG	poly ethylene glycol
PF	photon factory
PF-AR	photon factory-advanced ring
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RMSD	root-mean-square deviation
Pro	proline

rpm	round per minute
RT	reverse transcriptase
Rt	retention time
SD	Shine-Dalgarno
SDS	sodium dodecylsulfate
sec	second(s)
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
START	steroidogenic acute regulatory protein related lipid transfer
TAE	tris-acetate-EDTA
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylethylenediamine
TMS	trimethylsilyl
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Trp	tryptophan
Tyr	tyrosine
Val	valine
V_M	calculated volume-to-mass ratio
UV	ultraviolet

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 16 年度博士課程 進学
氏名 井上 謙吾
指導教員 山根 久和

論文題目 グラム陽性細菌由来新規 carbazole 代謝系の解析

カルバゾール(CAR;図 1)は原油やコールタール中に含まれ、染料、殺虫剤、潤滑油などの原料として産業面で広く使用されているが、難分解性、変異原性を有する環境汚染物質でもある。CAR はその化学構造からダイオキシン類のモデル化合物としても注目され、環境浄化への応用へ向けた CAR 分解菌の精力的な研究が行われてきた。これまでに *Pseudomonas resinovorans* CA10 株、*Janthinobacterium* sp. J3 株、*Sphingomonas* sp. KA1 株などグラム陰性 CAR 分解菌の CAR 代謝経路とそれに関わる遺伝子・酵素が明らかになっている。CAR は初発酸化酵素である carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO)により、1 位と 9a 位の炭素に 2 原子酸素が添加され(図 1)、後の代謝経路によってアントラニル酸(AN)まで分解される。CARDO は①基質に酸素を直接添加する terminal oxygenase CARDO-O (*carAa* にコードされる)、②CARDO-O に電子を伝達する ferredoxin CARDO-F (*carAc*)、③NADH からの電子を CARDO-F に伝達する ferredoxin reductase CARDO-R (*carAd*)の 3 つのコンポーネントから成る(図 1)。このような電子伝達鎖を有し、かつ、terminal oxygenase に Rieske type [2Fe-2S] cluster を持つ酵素は Rieske non-heme iron oxygenase system (ROS)と称される一群の酵素に属する。ROS はその電子伝達コンポーネントのタイプにより class IA、IB、IIA、IIB、III の 5 つに分類される。CA10 株、J3 株、KA1 株の CARDO はそれぞれ class III、III、IIA に分類され¹⁾、ROS の中では珍しく、“terminal oxygenase は同じ化合物を基質とし、互いに有意な identity (>45%)を示す一方で、電子伝達コンポーネントのタイプが少なくとも 2 つある”、という多様性が存在する。

本研究では、応用面・学術面でも興味深い特徴を有する CARDO の多様性について追求するため、新規 CAR 資化菌の単離を試みると共に、その結果、グラム陽性細菌としては初の報告例となった CAR 資化菌の CAR 代謝系について遺伝学的・酵素学的解析を行った。

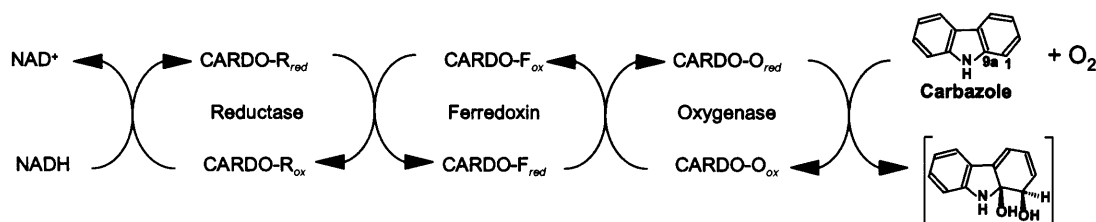


図 1. CARDO の 3 コンポーネントシステムと触媒する反応

グラム陽性 carbazole 資化菌の取得²⁾

新規 CAR 代謝系遺伝子群(*car* 遺伝子群)を取得するため、全国各地から採取した 71 サンプルを単離源とし、CAR 分解菌のスクリーニングを行った結果、27 株の CAR 資化菌の単離に成功した。単離した CAR 資化菌の属種を決定したところ、*Acinetobacter*、*Acromobacter*、*Erythrobacter*、*Nocardioide*s、*Stenotrophomonas*、*Marinobacterium* 属など、これまでに CAR 資化菌として単離された報告のない属が含まれていた。中でも *Nocardioide*s 属に分類された 1 株(IC177 株と命名)はグラム陽性の CAR 資化菌としては唯一の例となり、その CAR 代謝系に興味を持たれた。そこで、degenerated PCR により、IC177 株ゲノムから *carAa* 遺伝子ホモログの一部を取得した。その推定アミノ酸配列は既知の *CarAa* の相当する領域と 49~45%程度と低いながらも有意な identity を有していた。

IC177 株の *car* 遺伝子群の解析³⁾

IC177 株の *car* 遺伝子群の全容を明らかにするべく、IC177 株ゲノムのコスミドライブラリーを構築し、上記の *carAa* 遺伝子断片を含むクローンを取得した。そのインサート 17.5 kb のシーケンス解析を行ったところ、既知の *car* 遺伝子と有意な相同性を有する *carAaCBaBbAcAd* 遺伝子群とその上流に存在する *carDFE* 遺伝子群が見いだされた。これら *car* 遺伝子の推定アミノ酸配列は既知のグラム陰性細菌のものと 29~67%の identity を有し、それらとは遺伝子の並びが異なるなど、興味深い特徴を有していた。*carAaCBaBbAcAd* 及び *carDFE* 両遺伝子群の直上流には IclR family に属する転写制御因子様の遺伝子がそれぞれ見いだされ、両遺伝子群が転写レベルの発現調節を受けていることが示唆された。*carAaCBaBbAcAd* と *carDFE* 遺伝子群について各々 RT-PCR 解析を行ったところ、CAR 生育時に各遺伝子群はそれぞれが 1 つのオペロンとして共転写されていることが明らかになった。発現の誘導性を明らかにするため、CAR、AN、およびコハク酸を与えた IC177 株の *carAa* と *carD* について定量的 RT-PCR を行ったところ、CAR を与えた時のみ両遺伝子の転写の誘導が認められた。一方、IC177 株の *car* 遺伝子の機能を解析するため、*carAaAcAd* の 3 遺伝子(それぞれ CARDO-O、-F、-R をコードする)を全て発現する大腸菌を作成し、実際に CAR 初発酸化能を持っていることを明らかにした。この結果に加えて、*carAaAcAd* の推定アミノ酸配列より予想される電子伝達鎖の特徴から、IC177 株は、ROS の分類において class IIB に属する新規な CARDO を持つことが明らかとなった。また、様々な芳香族化合物を基質として用いて、IC177 株の CARDO を発現する大腸菌による休止菌体反応を行った

ところ、IC177 株は CAR やナフタレン、ジベンゾ-*p*-ダイオキシシンには高い活性を有していたのに対し、ビフェニルやジベンゾフランには低い活性しか示さず、これらの化合物に高い活性を有する CA10/J3 株や KA1 株の CARD O とは基質特異性が異なっていることが示された。

IC177 株と CA10/J3 株由来 CARD O の互換性の解析

本研究により、CA10/J3 株、KA1 株、IC177 株由来 CARD O はそれぞれが異なるタイプの電子伝達系を持つことが明らかとなった。それぞれの **terminal oxygenase** コンポーネント同士は高い相同性を有するが、その電子伝達コンポーネントは異なるという CARD O が持つ特徴は、今まで詳細な解析がなされてこなかった ROS の電子伝達メカニズムの解明に向けた格好の研究材料であるといえる。そこで、CARD O の電子伝達について機能と構造の面から解明を試みることにした。まずは、IC177 株 CARD O の 3 つのコンポーネントそれぞれについて His タグ融合タンパク質として大腸菌内で大量に発現させ、FPLC にて精製酵素を調製し、同様に CA10/J3 株の各 CARD O コンポーネントも精製した。次に、電子伝達コンポーネントの互換性を解析するため、CARD O の再構成系に続いて活性検定系を構築した。その系にて電子伝達コンポーネントを入れ替えるなどして、互換性を解析した結果、CARD O-O のみを入れ替えたものでは活性が検出されなかったことから、CARD O-O と-F 間の特異性が高いことが明らかになった。一方、CARD O-R のみを入れ替えたものでは、活性が 61~69%程度下がったものの、有意な活性を有していたことから、CARD O-F と-R 間の特異性は低く、互換性があることが明らかになった。

IC177 由来 CARD O の X 線結晶構造解析

前述のように CARD O-O と-F 間の電子伝達には高い特異性があったが、タンパク質の立体構造はその特異性を決める決定的な要因の一つと考えられる。J3 株の CARD O-O と CA10 株の CARD O-F の構造はすでに明らかになっていたので、本研究では IC177 株由来の CARD O-O と-F の単体状態での X 線結晶構造解析を行った。CARD O-O と-F をそれぞれ結晶化し、放射光施設 Photon Factory にて、それぞれ分解能 2.3、2.0 Å の反射データを収集し⁴⁾、すでに明らかになっている KA1 株の CARD O-O (Katsuki et al., 未発表データ)、CA10 株の CARD O-F の構造をモデル分子とした分子置換法による構造決定に成功した。

IC177 株の CARD O-O は 3 つの subunit がドーナツ様の構造を形成しており、全体構造としては J3 株、KA1 株の CARD O-O と似ていた。しかし、基質ポケットの入り口付近は、他の CARD O-O とは異なり狭く、これが他の CARD O との基質特異性の違いを生む要因と考えられた。IC177 株の CARD O-F は monomer で、全体構造は楕円の球状であり、電子伝達に必要な[2Fe-2S]クラスターは分子の末端の溶媒に露出する部分に存在していた。以前の研究で、class III 型 CARD O-O と-F (J3 株由来 CARD O-O と CA10 株由来 CARD O-F)の複合体(CARD O-O の trimer 1 つに対し 3 つの CARD O-F が結合)の立体構造が解かれ、タンパク質間で相互作用をするアミノ酸残基が明らかになっている(図 2A、2C)⁵⁾。そこで、class III 型 CARD O-O と-F の結合に関与する残基に相当するアミノ酸残基が IC177 株のものでは立体構造上どこに位置するのかを調べたところ(図 2B、

2D)、class III 型では結合に関与するアミノ酸残基はある程度集中して存在していたのに対し、IC177 株 CARDO では、-O、-F 共に結合位置が class III 型と同じと考えるならば、結合に関与する可能性が低い位置に見いだされるものがあり(図 2D 矢印)、class III 型と IC177 株の CARDO-O と-F 間で結合に関与するアミノ酸残基は異なる可能性が考えられた。

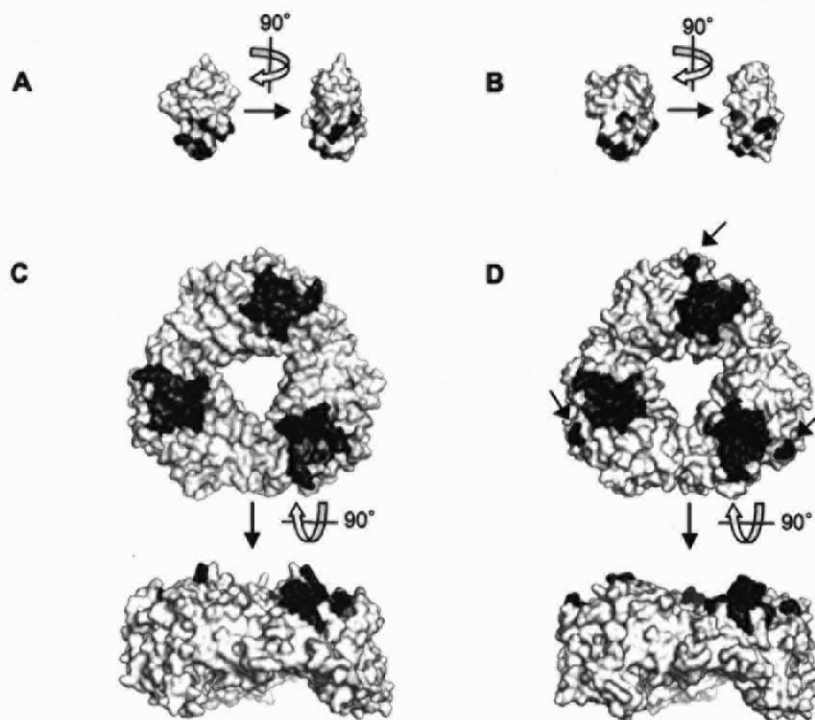


図 2. CA10 株の CARDO-F (A)と J3 株の CARDO-O (C)間の結合に関与するアミノ酸残基の位置(黒色部分)と、それに基づいて推定された IC177 株 CARDO-F(B)、IC177 株の CARDO-O (D)における相当するアミノ酸残基の位置(黒色部分)。

今後、IC177 株の CARDO-O と-F の複合体の構造解析やコンポーネント間の親和性の解析など生化学的解析を行うことで、CARDO の電子伝達メカニズムについてのさらなる詳細が明らかになるものと期待される。これまでの ROS の研究は反応特性や基質特異性が中心であり、電子伝達系に焦点をあてた研究は極めて少なく、構造に基づいた分子レベルでの解明を試みた例は皆無に等しい。本研究による CARDO を用いた先駆的な研究成果は、この分野に重要な知見を与え、植物、昆虫など広く分布する ROS 類縁酵素の研究にも影響を与えるものと考えられる。

文献

- 1) Inoue et al., 2004. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68, 1467-1480.
- 2) Inoue et al., 2005. FEMS Microbiol. Lett. 245, 145-153.
- 3) Inoue et al., 2006. Appl. Environ. Microbiol. 72, 3321-3329.
- 4) Inoue et al., 2006. Acta Cryst. Sect. F 62, 1212-1214.
- 5) Ashikawa et al., 2006. Structure 14, 1779-1789.

第1章 序論

人類にとって有用な微生物機能についての研究は古くから盛んに行われてきた。物質生産や物質変換に始まり、近年は、環境問題に対する関心から環境浄化への応用を目的とした研究も精力的に行われている。世界的な産業化に伴い、自然界に放出された化学物質の中には、安定で分解されにくい化合物が含まれ、環境中に長く残存し、かつ生物に対する毒性を有するものが存在する。そのような環境汚染物質の自然環境中への拡散は現代の環境問題の中心にあり、その対策として、物理・化学的な方法や微生物・植物を用いた方法まで様々な環境浄化技術が開発・実施されている。生物を用いた環境浄化はバイオレメディエーションと呼ばれ、低濃度広域に渡る汚染に対して有効であり、また、物理・化学的な方法よりも低コストなため、様々な環境汚染物質の分解菌が単離され、実用化されている。

Carbazole

環境汚染物質の1種である **carbazole** (Fig. 1-1A)は変異原性、毒性を有する難分解性化合物であるが[Arcos and Argus, 1968, Duston et al., 1997]、産業面では有用な化合物であり、染料、薬品、爆発物、殺虫剤、潤滑油、洗浄剤中の発色抑制剤などの原料として広く使用されている。**Carbazole**は天然にも存在し、頁岩油、原油、コールタール中に含まれ[Creaser et al., 1993, Hsu et al., 1994, Mushrush et al., 1999]、**carbazole**を含む原油を燃焼すると、酸性雨の原因物質である **NO_x**が生じることや、**carbazole**が原油の精製過程で行われる精製触媒の作用を阻害することなどから[Laredo et al., 2001]、原油中の **carbazole**を効率よく除く方法の研究・開発が進められている[Benedik et al., 1998]。**Carbazole**は環境汚染物質の中でも最も高い毒性を示すダイオキシン類と類似の炭素骨格を有しているため、ダイオキシンのモデル化合物とした研究もなされている[Habe et al., 2001]。これまでに、**carbazole**分解菌が多数単離されており[Uchiyama et al., 1993, Hisatsuka and Sato, 1994, Gieg et al., 1996, Shotbolt-Brown et al., 1996, Uchiyama et al., 1998, Shepherd and Lloyd-Jones, 1998, Kirimura et al., 1999, Schneider et al., 2000, Habe et al., 2002, Kilbane et al., 2002, Yoon et al., 2002, Fuse et al., 2003, Inoue et al., 2004, Li et al., 2004, Santos et al., 2006, Castorena et al., 2006]、その中でも、*Pseudomonas resinovorans* CA10株については、当研究室で単離され、先駆的な研究が行われてきた。

Carbazole 代謝経路と *car* 遺伝子群

CA10株は東京都内の浄水場の活性汚泥より単離され、**carbazole**を唯一の炭素原、窒素源、エネルギー源として生育可能な菌株であり、その **carbazole**代謝経路が明らかになっている(Fig. 1-1A, [Uchiyama et al., 1993])。その後、**carbazole**代謝経路の各段階を触媒する酵素をコードする遺伝子についての解析がなされ、**carbazole**代謝系遺伝子群(*car*遺伝子群)が明らかになった(Fig. 1-1B, [Sato et al., 1997a, 1997b, Nojiri et al., 2001, 2002])。**carbazole**はCA10株が保持する **carbazole 1,9a-dioxygenase** (CARDO, CarAaAcAd)が触媒する **angular dioxygenation**反応により、不安定なヘミアミナール化合物へと変換される(Fig. 1-1A)。**Angular dioxygenation**とは、核間とそれに隣接する炭素原子(1位と9a位)への2原子酸素添加反応である(Fig. 1-1A)。**Angular dioxygenation**で生じたヘミアミナール化合物は自発的な環開裂を経て2'-aminobiphenyl-2,3-diolへと変換された後、**extradiol dioxygenase** (CarBaBb)、**hydrolase** (CarC)によってそれぞれメタ開裂反応、加水分解反応

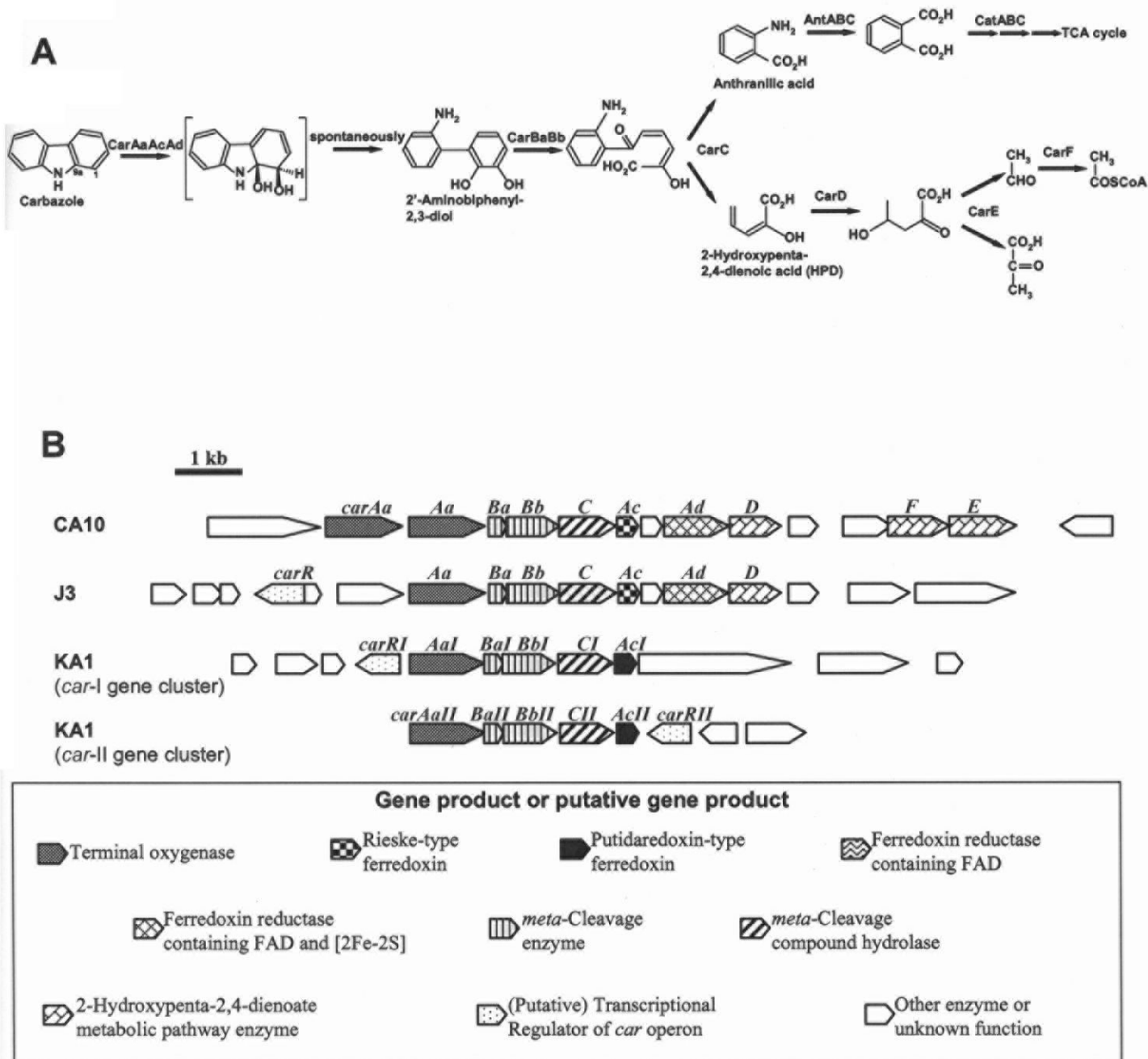


Figure 1-1. グラム陰性細菌のcarbazole代謝経路と*car*遺伝子群。(A) *Pseudomonas resinovorans* CA10株のcarbazole代謝経路。(B) *Pseudomonas resinovorans* CA10株、*Janthinobacterium* sp. J3株、*Sphingomonas* sp. KA1株の*car*遺伝子群とその周辺の遺伝子構造。

を経て anthranilic acid と 2-hydroxypenta-2,4-dienoic acid (HPD)に変換される[Sato et al., 1997a; Sato et al., 1997b]。HPD は hydratase (CarD)、aldolase (CarE)、dehydrogenase (CarF)によって pyruvic acid、acetyl coenzyme A へと代謝される[Nojiri et al., 2001]。さらに、anthranilic acid は anthranilic acid 1,2-dioxygenase (*car* 遺伝子群の上流約 21 kb に存在し、*antABC* にコードされている)により catechol に変換されたのち[Nojiri, et al., 2001]、染色体上に存在する *catABC* 産物によって TCA cycle へと代謝される[Nojiri et al., 2002]。CA10 株の *car* 遺伝子群は約 199 kb の巨大プラスミド pCAR1 上に存在することが明らかになっており[Nojiri et al., 2001]、pCAR1 の全塩基配列の決定により、CA10 株の *car* 遺伝子群は pCAR1 上の大型のトランスポゾン Tn4676 内に存在することが明らかになった(Fig. 1-2A、[Maeda et al., 2003])。難分解性化合物分解に関わる遺伝子がプラスミドやトランスポゾンなどの可動性遺伝因子上に存在している例は多く、それらが難分解性化合物分解能の伝播に寄与し、環境適応のための進化を促進したと考えられている[Whyndham et al., 1994, Tan et al., 1999, Tsuda et al., 1999, Nojiri et al., 2004]。実際に、これまでに単離・解析がなされてきた carbazole 資化菌が保持する *car* 遺伝子群の多くは、CA10 株と高い相同性を有しており[Ouchiyaama et al., 1998、Yoon et al., 2002、Riddle et al., 2003、Inoue et al., 2004、Li et al., 2004、Castorena et al., 2006]、CA10 株の *car* 遺伝子群が自然界に広く伝播していることを示唆していた。また、可動性遺伝因子により、異種微生物間でも共通に保持されるようになった難分解性化合物代謝系遺伝子は、宿主の細胞環境により、点変異、欠失、挿入、相同性組換えによる shuffling などが生じて、その遺伝子の多様性が増したものと推定されている[van der Meer et al., 1992]。

当研究室では、CA10 株以外の carbazole 資化菌、*Janthinobacterium* sp. J3 株、*Sphingomonas* sp. KA1 株など、多数単離しており、それらが持つ *car* 遺伝子群についても解析を行ってきた[Habe et al., 2002、Inoue et al., 2004、Urata et al., 2006]。CA10 株では *carAa* が重複して 2 つ並んで存在しているが、J3 株の *car* 遺伝子群では *carAa* は重複しておらず、*car* 遺伝子群周辺の遺伝子構造も異なっていた(Fig. 1-1B、[Sato et al., 1997a、Inoue et al., 2004])。日本の工場排水から単離された KA1 株は、*car* 遺伝子群を 2 つ(*car-I* 遺伝子群と *car-II* 遺伝子群)持ち、両遺伝子群共に、CA10 株と同様、約 255 kb の巨大プラスミド pCAR3 上に存在した(Figs. 1-1B、1-2B、[Habe et al., 2002、Urata et al., 2006、Shintani et al., 2007])。KA1 株が持つ *car* 遺伝子群は CA10 株や J3 株のそれと遺伝子構造は多少異なっていたが(Fig. 1-1B)、その遺伝子の機能を推定・解析した結果、carbazole から anthranilic acid までの代謝経路は同様であることが示唆された[Inoue et al. 2004、Urata et al., 2006]。KA1 株と同時期に報告された *Sphingomonas* sp. GTIN11 株はアメリカで単離され、その上流の塩基配列に違いはあるものの KA1 株の *car-I* 遺伝子群と全く同じ塩基配列の *car* 遺伝子群を保持していた[Kilbane et al., 2002]。地理的に隔離されたアメリカと日本で全く同じ塩基配列の遺伝子群を持つ菌株が単離されたことは、pCAR3 のようなプラスミドを介して KA1 株が持つ *car* 遺伝子群も自然界に広く伝播していることを示唆していた。さらに別の carbazole 資化菌 *Sphingomonas* sp. CB3 株は、ニュージーランドで単離され、CA10 株や KA1 株とは異なる *car* 遺伝子群を保持していた[Shepherd et al., 1998]。*carAaAbAcAd* と命名されている CB3 株の *car* 遺伝子群の推定アミノ酸配列は *Rhodococcus* sp. RHA1 株[Masai et al., 1995]や *Burkholderia xenovorans* LB400 株[Erickson and Mondello, 1992]の biphenyl 代謝系遺伝子群(それぞれ、*bphAaAbAcAd*、*bphA1A2A3A4* と命名されている)と有意な identity (31~53%)を示し、これら遺伝子の翻訳産物が実際に carbazole への酸素添加反応を触媒する証拠は得られていない。これらの *car* 遺伝子群のうち、実際に carbazole に対する酸化反応を触媒することが証明されている酵素をコードする遺伝子は、CA10 株か KA1 株のどちらかと高い相同性(>94%)を示すもののみである。

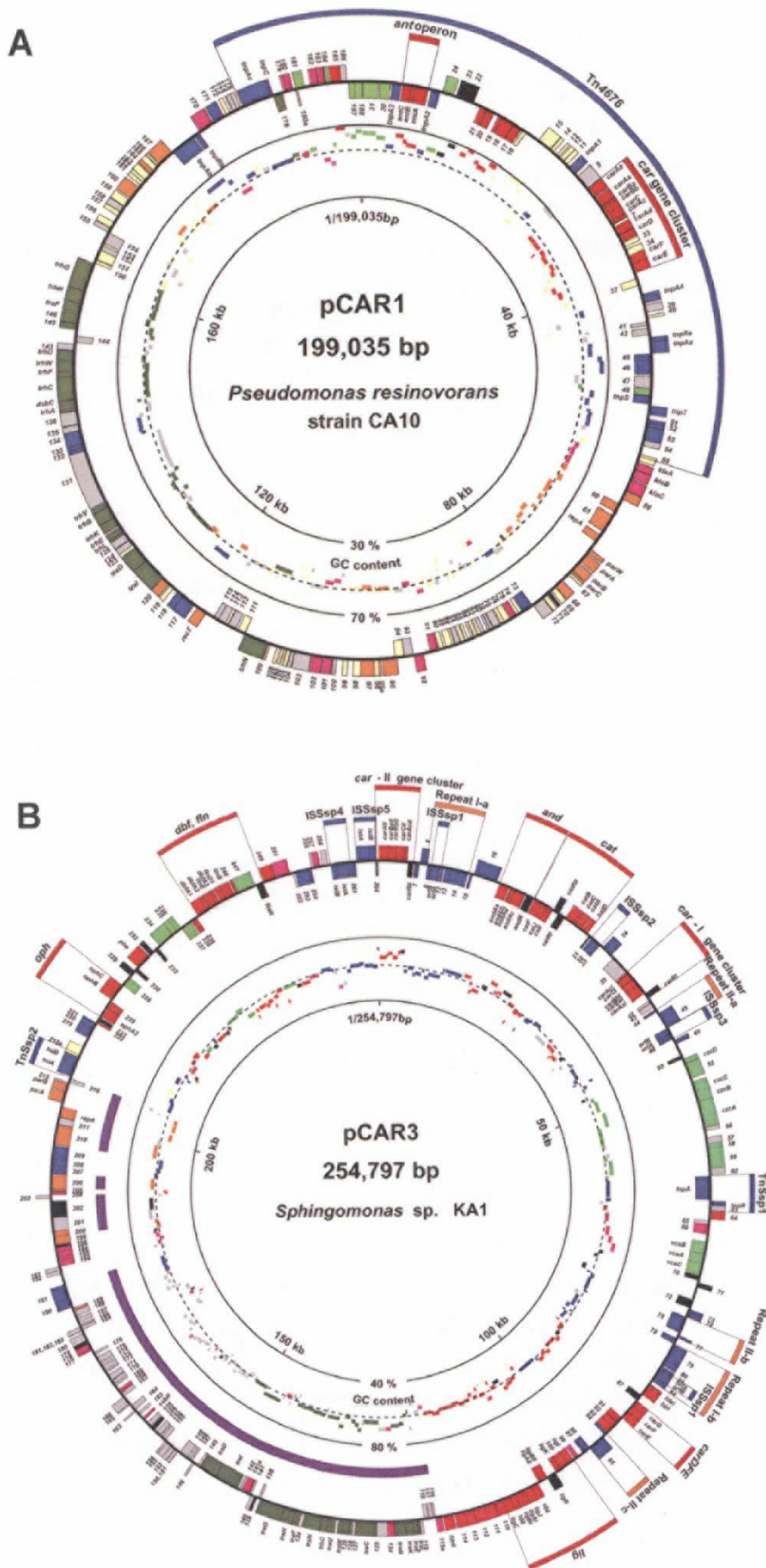


Figure 1-2. carbazole分解プラスミドの全遺伝子。(A) CA10株が保持する巨大のプラスミドpCAR1の遺伝子構造。(B) KA1株が保持する巨大プラスミドpCAR3の遺伝子構造。car遺伝子、ant遺伝子を含む代謝系遺伝子は赤で示した。

CA10 株と J3 株の *car* 遺伝子群の転写制御機構

上述のように、CA10 株の *car* 遺伝子群の上流約 21 kb には anthranilic acid から catechol への変換を担う *antABC* 遺伝子が存在する(Fig. 1-3)。*ant* 遺伝子群は 2 つの insertion sequence (IS)、ISPre1 と ISPre2 に挟まれており、1 つのオペロン(*ant* オペロン)として転写され、その直上流に誘導プロモーター P_{ant} 存在がすることが明らかになっている(Fig. 1-3、[Urata et al., 2004])。この P_{ant} と全く同じ配列は CA10 株の *car* 遺伝子群の上流にも存在し、*ant* 遺伝子群、*car* 遺伝子群は共に AraC/XylS family の AntR により調節を受ける[Miyakoshi et al., 2006]。一方、J3 株では、*car* オペロンの上流には誘導プロモーター P_{u13} が存在し(Fig. 1-3)、GntR family の CarR (Fig. 1-2、1-3 の *carR* の翻訳産物)により調節を受ける[Miyakoshi et al., 2006]。これら 2 株の *car* 遺伝子群とその周辺の遺伝子構造から、進化的な考察がなされた[Inoue et al., 2004、Miyakoshi et al., 2006]。それによると、進化的に、より祖先型と考えられた J3 株の *car* 遺伝子群の上流に、ISPre1 と共に、*ant* 遺伝子群の上流側の P_{ant} を含む遺伝子の転移(one-ended transposition)が起こり、CA10 株のような遺伝子構造(Fig. 1-3)になったため、CA10 株の *car* オペロンは AntR による遺伝子の転写調節を受けるようになったと考えられた。結果的に、CA10 株と J3 株の *car* 遺伝子は互いに高い相同性(アミノ酸レベルで 92~99%)を示すにも関わらず、その転写調節機構は異なるものになったと考えられた。KA1 株の *car-I*、*car-II* 遺伝子群の直上流には共に GntR family の転写制御因子様の配列(暫定的に *carR* と命名されている)が見出されたため、この遺伝子産物により、両遺伝子群共に調節が行われていると考えられるが、現在までのところ、直接的な証拠は得られていない。

carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO)

car 遺伝子の中でも特に多くの研究者の注目を集めたのは初発酸化酵素 carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO)である。CARDO は *carAa*、*carAc*、*carAd*、にコードされる terminal oxygenase CARDO-O、ferredoxin CARDO-F、ferredoxin reductase CARDO-R の 3 つのコンポーネントで構成される(Fig. 1-4)。基質に直接酸素を添加するのは CARDO-O であるが、その活性のためには CARDO-F と CARDO-R による電子の伝達が必要である。CARDO-R は NADH からの電子を CARDO-F に伝え、CARDO-F はその電子を CARDO-O の Rieske [2Fe-2S] cluster へと伝える。Rieske [2Fe-2S] cluster の電子は CARDO-O 分子内の活性中心の非ヘム鉄へ伝えられ、酸素が活性化されることにより、基質への酸素添加反応が起こる。CARDO が触媒するこの酸素添加反応は angular dioxygenation と呼ばれるが(Fig.1-5)、CARDO のように angular dioxygenation を触媒する酵素の報告例は非常に少なく[Nojiri and Omori, 2002]、生化学的な分子レベルの反応メカニズムに関しては未だに未解明な点が多い。CARDO は angular dioxygenase であること以外にいくつかの興味深い特徴を持つ。1 つは CARDO の広い基質特異性で、carbazole 以外の様々な芳香族化合物に対して酸化反応を触媒することができ、基質の化学構造によっては、angular dioxygenation ではなく、*cis*-dihydroxylation や monooxygenation も触媒する(Fig. 1-5、[Nojiri et al., 1999、Takagi et al., 2002])。さらに別の特徴として、電子伝達コンポーネントの多様性が挙げられる。CA10 株と KA1 株の 2 つの CARDO-O はアミノ酸レベルの identity は 60、57%であるのに対し、CARDO-F においては、それぞれ 10、13%と相同性はなかった(Table 1-1、1-2)。アミノ酸配列の解析から、CA10 株や J3 株の CARDO-F は、Rieske-type ferredoxin と呼ばれるタンパク質で、酸化還元中心の [2Fe-2S] cluster に配位しているアミノ酸残基が Cys × 2 と His × 2 であるのに対し、KA1 株の

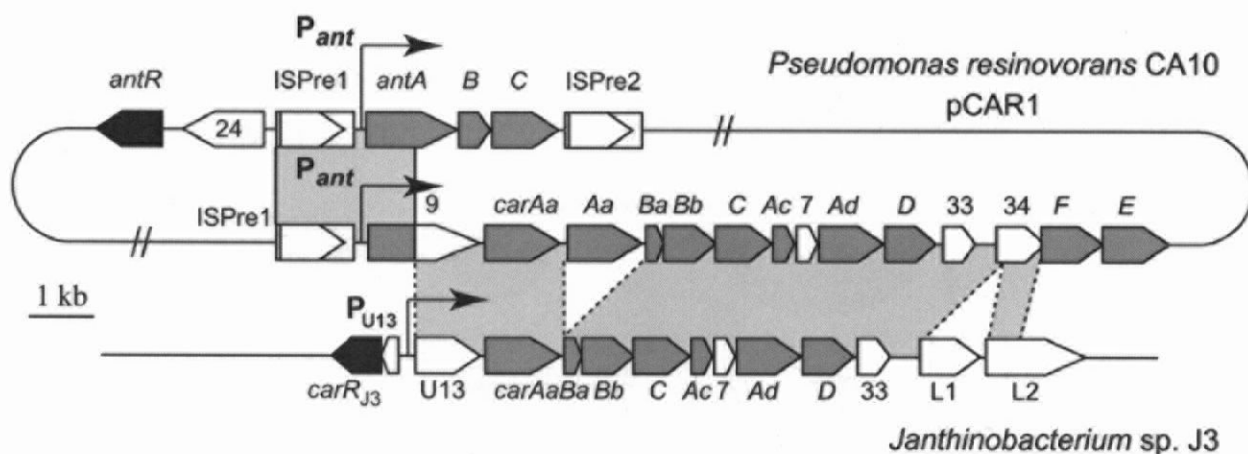


Figure 1-3. CA10株とJ3株の*car*遺伝子群の遺伝子構造とプロモーターの位置[Miyakoshi et al., 2006]。灰色の領域塩基配列レベルの相同性が94%以上の部分を示す。(A) CA10株が保持するpCAR1上の*car*遺伝子群と*ant*遺伝子群とそれらの誘導的な転写に必要なP_{ant}の位置、及び、それらの転写制御因子*antR*の位置。(B) J3株の*car*遺伝子とその誘導的な転写に必要なP_{U13}の位置、及び、それらの転写制御因子*carR_{J3}*の位置。

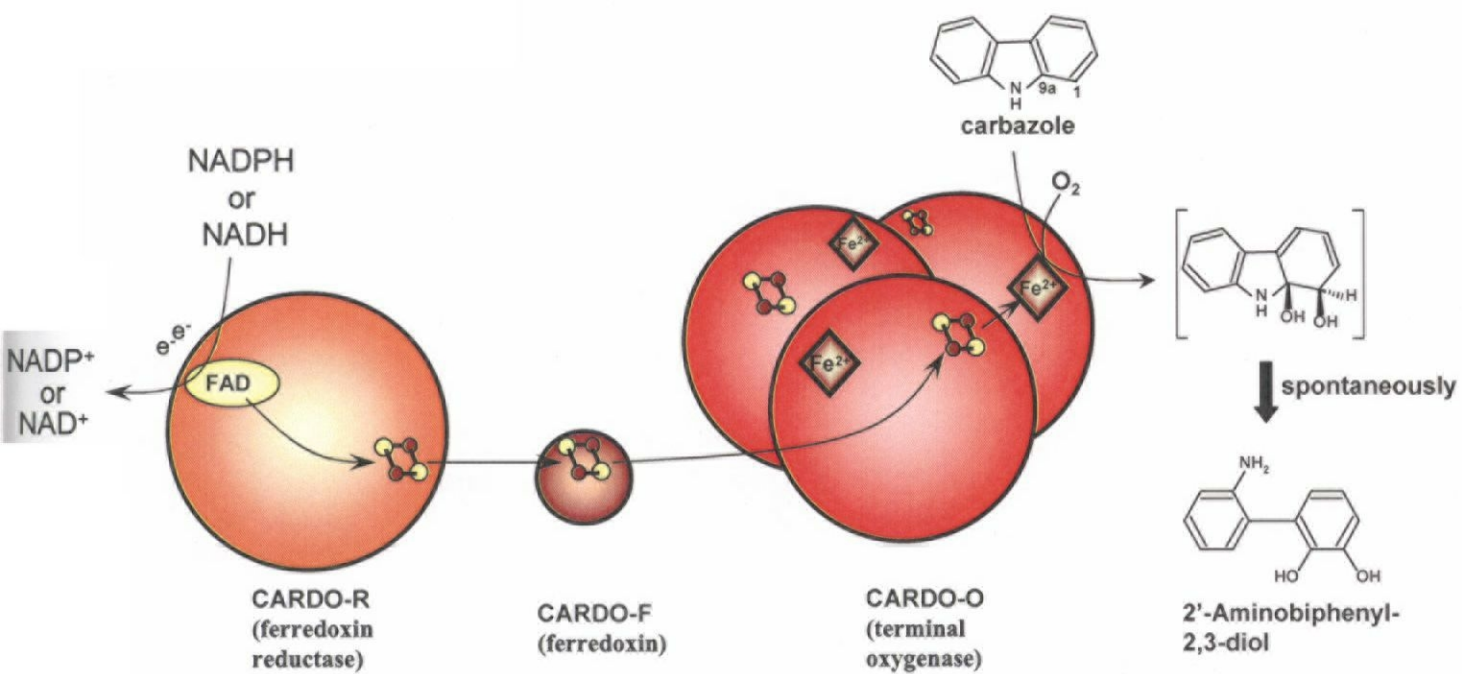

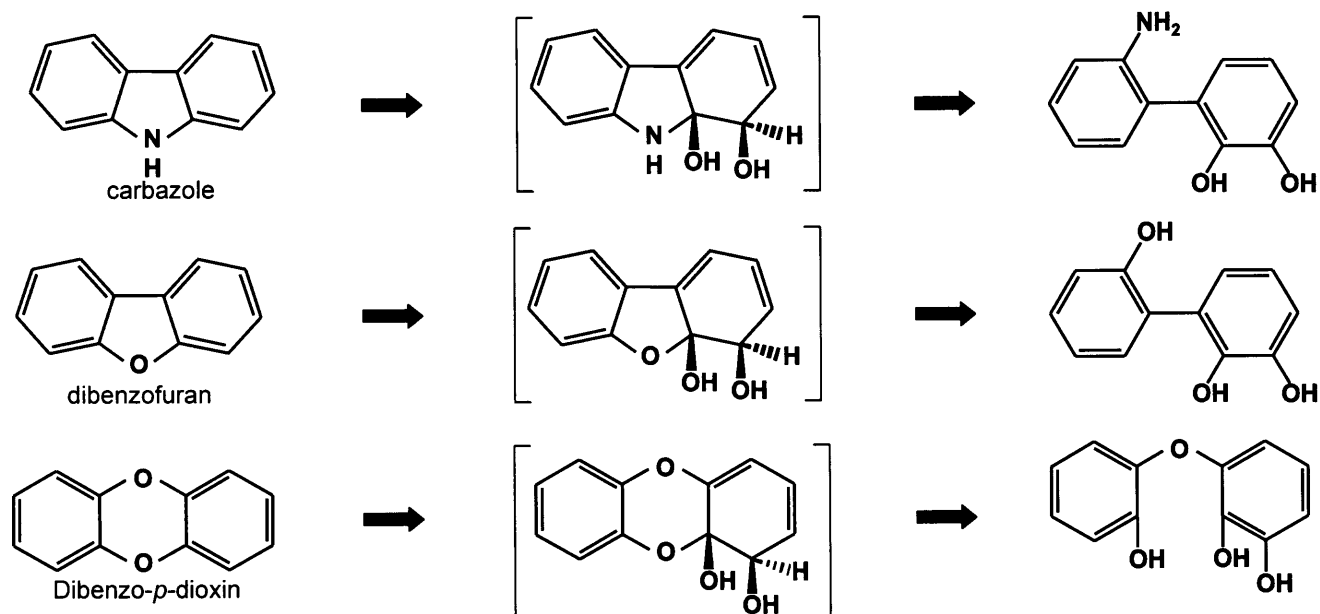
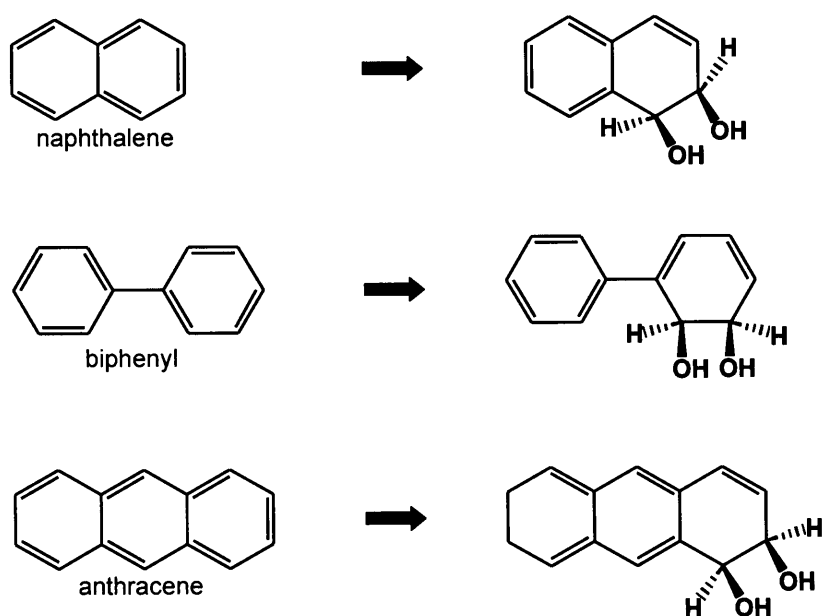


Figure 1-4. CA10株、J3株のCARDOを構成するコンポーネントとその補因子、電子の流れ、及び、CARDOが触媒する反応。CARDO-O、CARDO-F、CARDO-Rはそれぞれterminal oxygenase、ferredoxin、ferredoxin reductaseとして機能する。矢印は電子の流れを示した。茶と黄色の球はそれぞれ鉄、硫黄原子を示し、は2Fe-2S clusterを示す。

Angular dioxygenation



Lateral dioxygenation



Monooxygenation

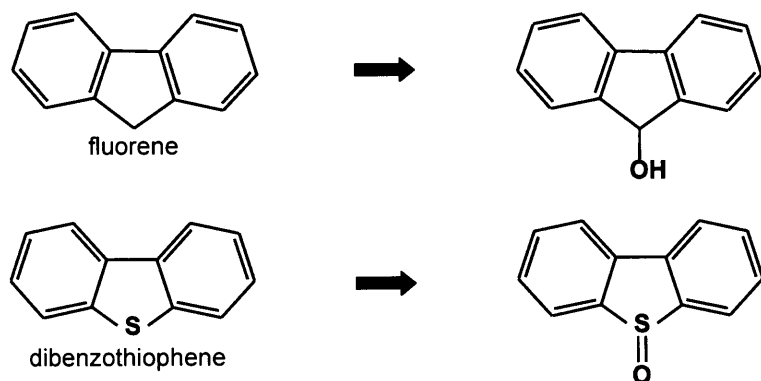


Figure 1-5. CA10株由来CARDOの広い基質特異性。基質によってangular dioxygenation、lateral dioxygenation、monooxygenationを触媒する [Nojiri et al., 1999]。

Table 1-1. CA10株、J3株、KA1株由来CARD0-Oのアミノ酸レベルのidentity (%)。

	CA10	J3	KA1(CarAal)	KA1(CarAall)
CA10		99	60	57
J3	99		60	57
KA1(carAal)	60	60		75
KA1(carAall)	57	57	75	

■ ~75

■ 74~50

□ 49~

Table 1-2. CA10株、J3株、KA1株由来CARD0-Fのアミノ酸レベルのidentity (%)。

	CA10	J3	KA1(CarAcl)	KA1(CarAcII)
CA10		99	10	13
J3	99		11	12
KA1carAcl)	10	11		57
KA1(carAcII)	13	12	57	

■ ~75

■ 74~50

□ 49~

Table 1-3. CA10株、J3株、KA1株由来CARD0-Rのアミノ酸レベルのidentity (%)。

	CA10	J3	KA1(Fdrl)	KA1(FdrII)
CA10		95	14	13
J3	95		14	13
KA1(fdrl)	14	14		57
KA1(fdrII)	13	13	57	

■ ~75

■ 74~50

□ 49~

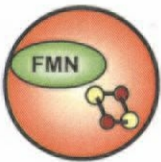
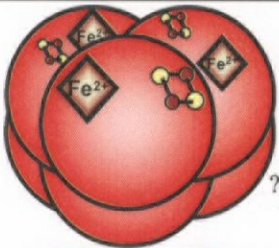
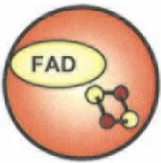
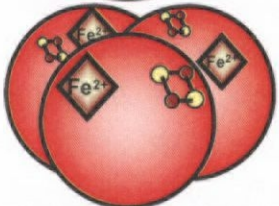
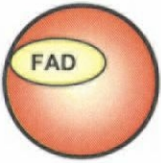

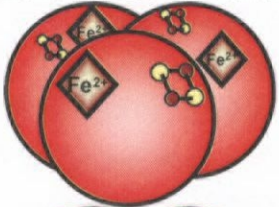
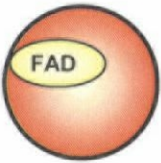

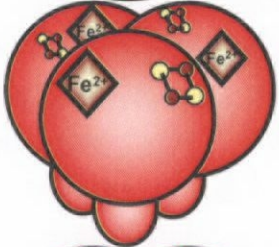
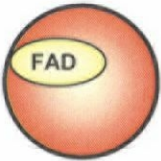


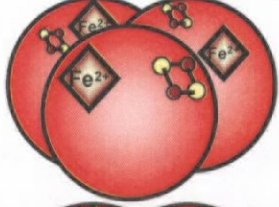
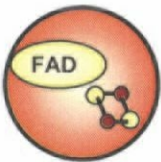

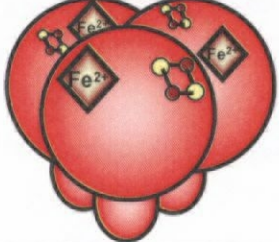
CARDO-F は putidaredoxin と呼ばれるタンパク質であり[Grinberg et al., 2000]、酸化還元中心の [2Fe-2S] cluster に配位しているアミノ酸残基は Cys × 4 であることが明らかになっており、これら 2 種の CARDO-F は同じ ferredoxin として機能するタンパク質であるがそのタイプは異なっていた[Inoue et al., 2004]。さらに、CA10 株と KA1 株の 2 つの CARDO-R においても、それぞれ 14、13% で相同性は見いだせなかった(Table 1-3)。両 CARDO-R とも NADH-binding domain を持つが、CA10 株の CARDO-R は補因子として FAD と plant-type [2Fe-2S] cluster ([2Fe-2S] cluster に配位しているアミノ酸残基は Cys × 4) と呼ばれる酸化還元中心を持つことが明らかになっており[Nam et al., 2002]、その一方で、KA1 株の CARDO-R は補因子として FAD のみを持つ[Inoue et al., 2004, Urata et al., 2006]。このように、自然界に存在する CARDO は terminal oxygenase では高い相同性を示し、かつ同様の化合物を基質とするにも関わらず、電子伝達コンポーネントには多様性が存在した。これも CARDO と同類の酵素(下記)の中でも珍しい特徴と言える。

Rieske non-heme iron oxygenase system (ROS)

CARDO の terminal oxygenase CARDO-O には Rieske [2Fe-2S] cluster と呼ばれる酸化還元中心があり、基質と直接相互作用する活性中心には非ヘム鉄が存在する。CARDO の活性には電子伝達コンポーネント(CARDO-F と CARDO-R)からの電子の供給を必要とする。これらの特徴から、CARDO は Rieske non-heme iron oxygenase (ROS) と呼ばれる酵素に分類される。ROS に分類される酵素は、Rieske [2Fe-2S] cluster と活性中心の非ヘム鉄を含む terminal oxygenase コンポーネントと電子伝達コンポーネントから構成され、電子伝達コンポーネントとして reductase のみを持つものと、ferredoxin と ferredoxin reductase の 2 つを持つものがある(CARDO は、ferredoxin CARDO-F と ferredoxin reductase CARDO-R の 2 つの電子伝達コンポーネントをもつ)。ROS は、電子伝達鎖や酸素添加反応を触媒することなど、古くからよく知られている cytochrome P450 と共通した特徴を持つが、文字通り補因子に heme を持たないことや触媒する反応など、異なる点も多い。P450 が触媒する反応のほとんどが monooxygenation であるのに対し、ROS に分類される酵素の多くは芳香族化合物を基質とした 2 原子酸素添加反応を触媒する。

1991 年に Batie らは ROS における電子伝達コンポーネントの数とそれらが持つ補因子の種類による分類を提唱した。その後、多様な ROS が次々に研究・報告され、Batie らの分類に従った class 分けが不可能なものが報告されるようになった。そのため、Noguchi ら(in preparation)により、それらを網羅し、かつ既存の Batie らの分類に準じた新たな分類が提唱されている(Table 1-4)。その分類方法を以下に述べる。ROS の電子伝達コンポーネントの数が 1 つ(reductase のみ)ならば class I に分類され、さらに class I の中で細分化され、電子伝達タンパク質の補因子として FMN を持つならば class IA、FAD を持つならば class IB に分類される(Table 1-4)。電子伝達コンポーネントが ferredoxin と ferredoxin reductase の 2 つを持ち、ferredoxin reductase に plant-type の [2Fe-2S] cluster がある場合は class III に分類され、それ以外は class II に分類される(Table 1-4)。Class II の中でも ferredoxin コンポーネントが putidaredoxin ならば IIA、Rieske-type ferredoxin ならば IIB、[3Fe-4S] cluster ならば IIC に分類される(Table 1-4)。この分類に従うと、CA10 株、J3 株の CARDO は class III に、KA1 株の CARDO は class IIA に分類される。Table 1-4 に示したように、CA10 株、J3 株の CARDO-O は α_3 の 4 次構造をとるが、class III に分類される他の ROS は $\alpha_3\beta_3$ であるため、CARDO は class III に分類される ROS の中でも特異な例と言える。

Table 1-4. ROSの分類。

Class	Reductase (R)	Ferredoxin (F)	Terminal oxygenase (O)	例(由来菌株、 コンポーネント:PDB ID)*
I	IA 			Phthalate dioxygenase (<i>Burkholderia cepacia</i> DBO1、R:2PIA)
	IB 			Benzoate 1,2-dioxygenase (<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1、R:1KRH) 2-Oxoquinoline 8-monooxygenase (<i>Pseudomonas putida</i> 86、O:1Z01)
II	IIA 			Carbazole 1,9a-dioxygenase (<i>Sphingomonas</i> sp. KA1)
	IIB 			Biphenyl 2,3-dioxygenase (<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1、O:1ULI <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400、F:1FQT <i>Acidovorax</i> sp. KKS102、R:1D7Y) Cumene 2,3-dioxygenase (<i>Pseudomonas fluorescens</i> IP01、O:1WQL)
	IIC 			Dibenzofuran 4,4a-dioxygenase (<i>Terrabacter</i> sp. DBF63)
III				Carbazole 1,9a-dioxygenase (<i>Janthinobacterium</i> sp. J3、O:1WW9 <i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10)
				Naphthalene 1,2-dioxygenase (<i>Pseudomonas</i> sp. NCIB 9816-4、O:1NDO <i>Rhodococcus</i> sp. NCIBMB12038、O:2B1X) Nitrobenzene dioxygenase (<i>Comamonas</i> sp. JS765、O:2BMO)

* Rはreductase、もしくはferredoxin reductase、Fはferredoxin、Oはterminal oxygenaseを示し、立体構造が明らかになっているもののPDB IDを示した。



補因子にFMNと
plant-type [2Fe-2S] cluster
をもつReductase



補因子にFADと
plant-type [2Fe-2S] cluster
をもつReductase



Putidaredoxin-type
ferredoxin



Rieske-type ferredoxin



[3Fe-4S] cluster
をもつferredoxin



α₃で構成される
terminal oxygenase



α₆で構成されると推定
されている
terminal oxygenase



α₃β₃で構成される
terminal oxygenase

これまでに、ROS には、40 種以上の基質に対して 400 種以上の報告例があり、その多くは環境汚染物質の分解に関わる有用な性質を持ち、それだけでなく、光学純度の高い反応産物を生成することから、環境浄化や物質生産への応用が期待され、精力的な研究が行われてきた。ROS に分類される酵素の中でも最も詳細な研究がなされているものに、class III の naphthalene 1,2-dioxygenase(NDO)、class IIB の biphenyl 2,3-dioxygenase (BDO)が挙げられる。NDO においては *Pseudomonas* sp. NCIB9816-4 株[Simon et al., 1993]、*Pseudomonas putida* G7 株[Simon et al., 1993]、*Rhodococcus* sp. NCIBM12038 株[Larkin et al., 1999]、*Ralstonia* sp. U2 株[Fuenmayor et al., 1998]など、多数の遺伝子が単離・解析がなされており、特に、NCIB9816-4 株の NDO については、NDO の terminal oxygenase の立体構造解析[Kauppi et al., 1998、Carredano et al., 2000、Karlsson et al., 2003]、反応触媒機構の生化学的解析[Wolfe et al., 2001、Wolfe and Lipscomb, 2003]、反応産物の光学異性に着目した基質特異性の改変酵素[Parales, et al., 2000]、それら変異酵素の立体構造解析[Ferraro et al., 2006]など精力的な研究が行われている。BDO は環境汚染物質として有名な polychlorinated biphenyl (PCB)に対する酸素添加を触媒できるため、環境浄化への応用が期待され、古くから研究されてきた。BDO をコードする *bph* 遺伝子群は、LB400 株[Erichson and Mondello, 1992]、KF707 株[Furukawa and Miyazaki, 1986]、RHA1 株[Masai et al., 1995]、*Acidovorax* sp. KKS102 株[Kikuchi et al., 1994、Fukuda et al., 1994]、*Comamonas testosteroni* B-356 株[Sylvestre et al., 1996]などから単離されており、DNA shuffling や点変異導入による基質特異性の改変[Furukawa et al., 2004]、動力学的解析[Imbeault et al., 2000]、立体構造解析[Senda et al., 2000、Colbert et al., 2000、Furusawa et al., 2004]など NDO と同様に詳細な解析がなされている。これらの研究例をはじめ、ROS の研究は基質特異性を決める terminal oxygenase に注目したものが多い。その一方で、電子伝達コンポーネントを中心にした電子伝達メカニズムの解明を試みた研究は極めて少ないのが現状である。

ここ数年で蓄積している劇的な塩基配列情報の増加に伴い、ROS に分類される酵素の数も急増しているが、機能解析が行われた ROS のほとんどは細菌由来のものであった。しかし、最近、植物からも ROS に分類されると考えられる酵素が見出され、それらは、クロロフィル *a* からクロロフィル *b* への変換反応や[Tanaka et al., 1998]、クロロフィルの分解における鍵反応[Pruzinska et al., 2003]といった光合成を行う生物にとって普遍的な酸素添加反応を触媒する酵素として重要な役割を果たしていることが示されている。

ROS の立体構造

NDO や BDO の先駆的な研究成果のうちで、特に研究者の注目を集め、広い分野に影響を与えたものとして、terminal oxygenase の立体構造解析が挙げられる。ROS に分類される酵素のうちで、最初にその terminal oxygenase コンポーネントの立体構造が明らかになったのは *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 株由来の NDO である(Fig. 1-6A、[Kauppi et al., 1998])。NDO は class III に分類される ROS で(Table 1-4)、その terminal oxygenase (以下、NDO-O とする)は $\alpha_3\beta_3$ のヘテロヘキサマーの 4 次構造をとる。その全体構造はキノコのように、 β_3 で形成された柄に α_3 の笠が乗ったような形である(Fig. 1-6A)。Ferredoxin コンポーネントからの電子の受け取りや基質への酸素の添加は α サブユニットで行われ、 β サブユニットは構造の安定化に寄与していると考えられている。1 つの α サブユニットには Rieske [2Fe-2S] cluster と活性中心の非ヘム鉄が 1 つずつ存在する。電子伝達コンポーネントからの電子はまず Rieske [2Fe-2S] cluster に渡り、その後非ヘム鉄へ伝えられる。1 つの α サブユニット内の Rieske cluster と非ヘム鉄で電子の伝達が行われる

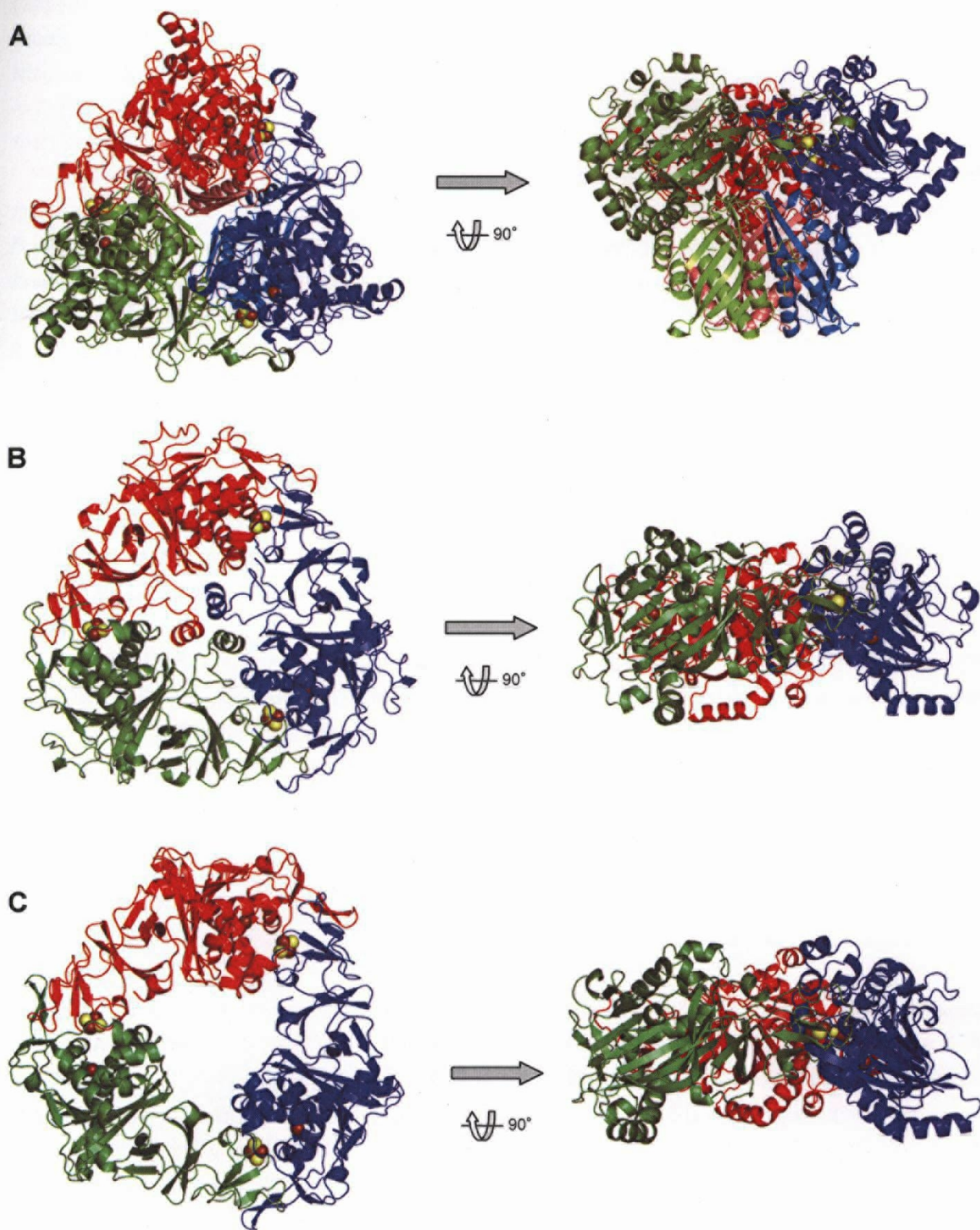


Figure 1-6. ROSのterminal oxygenaseの立体構造。Chain毎に色分けして示し、深緑、赤、青は α サブユニットを示し、(A)においては、 β サブユニットをピンク色、黄緑色、水色で示した。(A) NCIB916-4株由来NDOのterminal oxygenaseコンポーネント。(B) 86株由来2-oxoquinoline 8-monooxygenaseのterminal oxygenaseコンポーネント。(C) J3株由来CARDOのterminal oxygenaseコンポーネント。

には遠い位置に存在しているが、隣のサブユニット同士ではそれらの距離が近いこと、**Rieske cluster** から非ヘム鉄への電子の伝達はサブユニット間で行われることが予想された。また、**NDO-O** の立体構造から、以前は変異酵素などで推定しかされておらず、確証が得られていなかった活性中心の非ヘム鉄に配位しているアミノ酸残基(His208、His213、Asp362)についても明らかになったことも、当時、重要な新知見であった。

その後多くの研究者による **ROS** の構造解析が試みられ、最近その研究成果が次々に報告された。*Rhodococcus* sp. RHA1 株が持つ class IIB の **ROS** である **BDO** [Furusawa et al., 2004]、*Pseudomonas fluorescens* IP01 株由来 class IIB の **cumene dioxygenase** [Dong et al., 2005]、*Pseudomonas putida* 86 株由来 class IB の **2-oxoquinoline 8-monooxygenase** (Fig. 1-6B、[Martins et al., 2005])、*Comamonas* sp. JS765 株の class III の **nitrobenzene dioxygenase** [Friemann et al., 2005]、*Rhodococcus* sp. NCIMB12038 株由来高熱耐性の **NDO** (class III) [Gakhar et al., 2005]、及び、当研究室の *Janthinobacterium* sp. J3 株由来の **CARDO** (Fig. 1-6C、[Nojiri et al., 2005])の各 **terminal oxygenase** の立体構造が解明された(Table 1-4)。これらのうち、**CARDO** と同じ α_3 の4次構造をとるのは **2-oxoquinoline 8-monooxygenase** (Fig. 1-6B)のみで、他はすべて $\alpha_3\beta_3$ のヘテロヘキサマーである(但し、class IA の **ROS** として古くから詳細な解析がなされてきた *B. cepacia* DB01 株の **phthalate dioxygenase** [**PDO**]の **terminal oxygenase** コンポーネントは、生化学的な解析のみから α_6 の4次構造をとるとされている[Table 1-4、{Tarasev et al., 2006}])。上述の全ての構造において **Rieske** [**2Fe-2S**] **cluster** と非ヘム鉄に配位するアミノ酸残基が保存されていることが明らかになっている。

ROS の立体構造解析は **terminal oxygenase** のみではなく、電子伝達コンポーネントについても行われている。*Burkholderia cepacia* BD01 株の class IA に分類される **phthalate dioxygenase** の **reductase** コンポーネント(**PDO-R**)の報告が最も古く[Correll et al., 1992]、この酵素が持つ酸化還元中心の **FMN**、**plant-type** [**2Fe-2S**] **cluster** の酸化還元電位がそれぞれ-284 mV、-174 mV であり、**terminal oxygenase** (**PDO-O**)の **Rieske-type** [**2Fe-2S**] **cluster** の酸化還元電位が-120 mV であることから、**NADH**→**FMN**→**plant-type** [**2Fe-2S**] **cluster**→**PDR-O** という電子の流れであることを示していた。**PDO-R** と異なり補因子に **FAD** を持つ *Acinetobacter* sp. ADP1 株由来 class IB に分類される **benzoate 1,2-dioxygenase** の **reductase** コンポーネント、*Acidovorax* sp. KKS102 株由来 class IIB に分類される **BDO** の **ferredoxin reductase** コンポーネント(補因子は **FAD** のみの、Table 1-4)の立体構造が明らかになっている。

Ferredoxin においては、*Burkholderia xenovorans* LB400 株由来の **BDO** の **ferredoxin component** (Fig. 1-7A、[Colbert et al., 2000])と、当研究室で明らかにされた CA10 株由来の **CARDO-F** (Fig. 1-7B、[Nam et al., 2005])のみが現在までのところ報告されており、これら2つの **ferredoxin** の酸化還元電位は、それぞれ-157、-169 mV であることが明らかになっている[Couture et al., 2001、Nam et al., 2005]。**ROS** に分類される酵素における **terminal oxygenase** コンポーネントの[**2Fe-2S**] **cluster** の酸化還元電位は-50~-150 mV 程度と報告されており[Correl et al., 1992、Rosche et al., 1995、Riedel et al., 1995、Beharry et al., 2003、Tarasev et al., 2006]、酸化還元電位の低いものから高いものへと電子が伝達されるので、**ferredoxin** から **terminal oxygenase** に電子が伝達されることを明確に示していた。

最近、当研究室において、J3 株由来の **CARDO-O** 単体と CA10 株由来の **CARDO-F** 単体の立体構造以外に、それらの複合体の立体構造が明らかにされた(Fig. 1-8、[Ashikawa et al., 2006])。そ

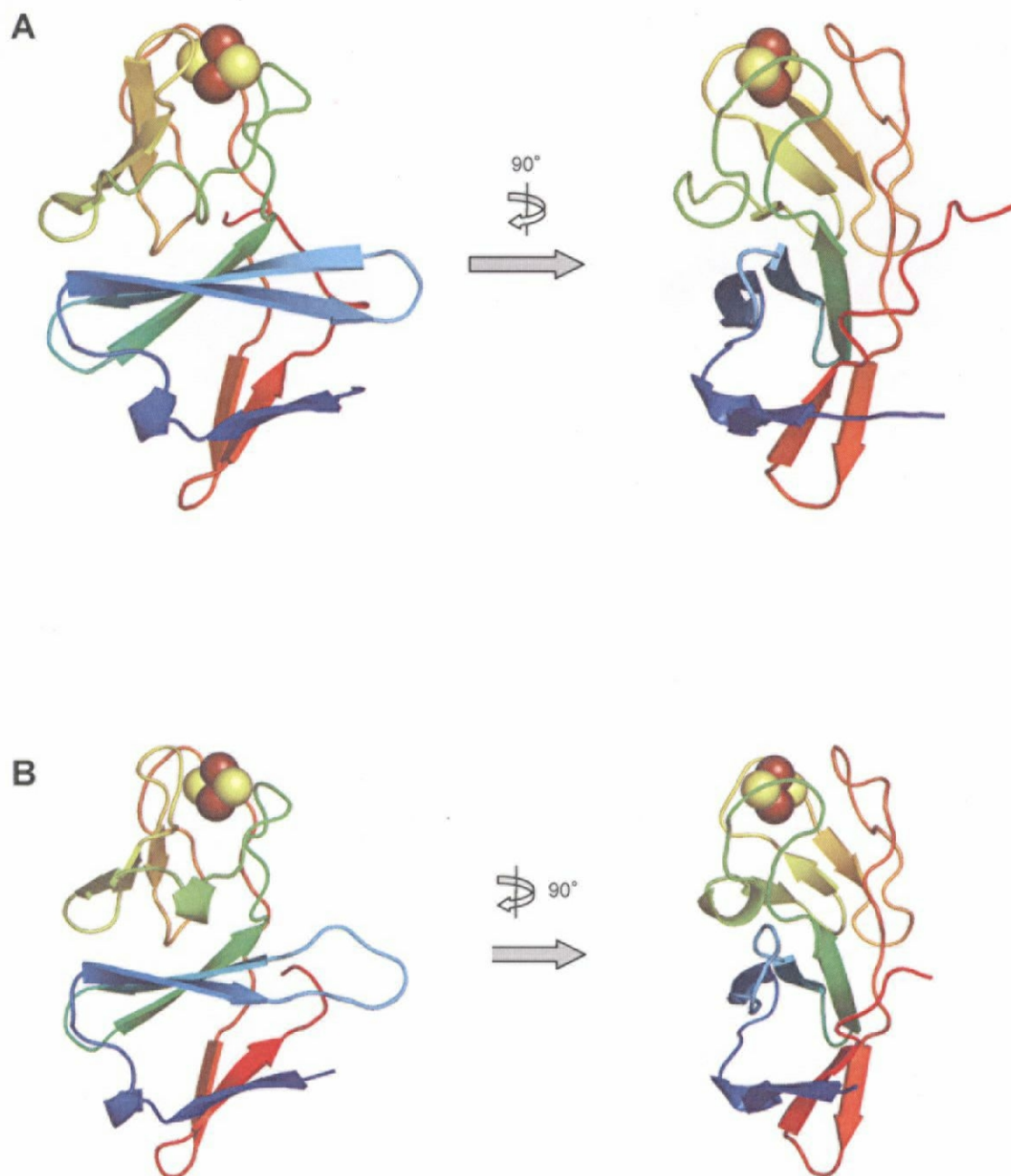


Figure 1-7. ROSのferredoxinコンポーネントの立体構造。鉄、硫黄原子をそれぞれ茶、黄色で示した。(A) LB400株由来BDOのferredoxinコンポーネント。(B) CA10株由来CARDO-F。

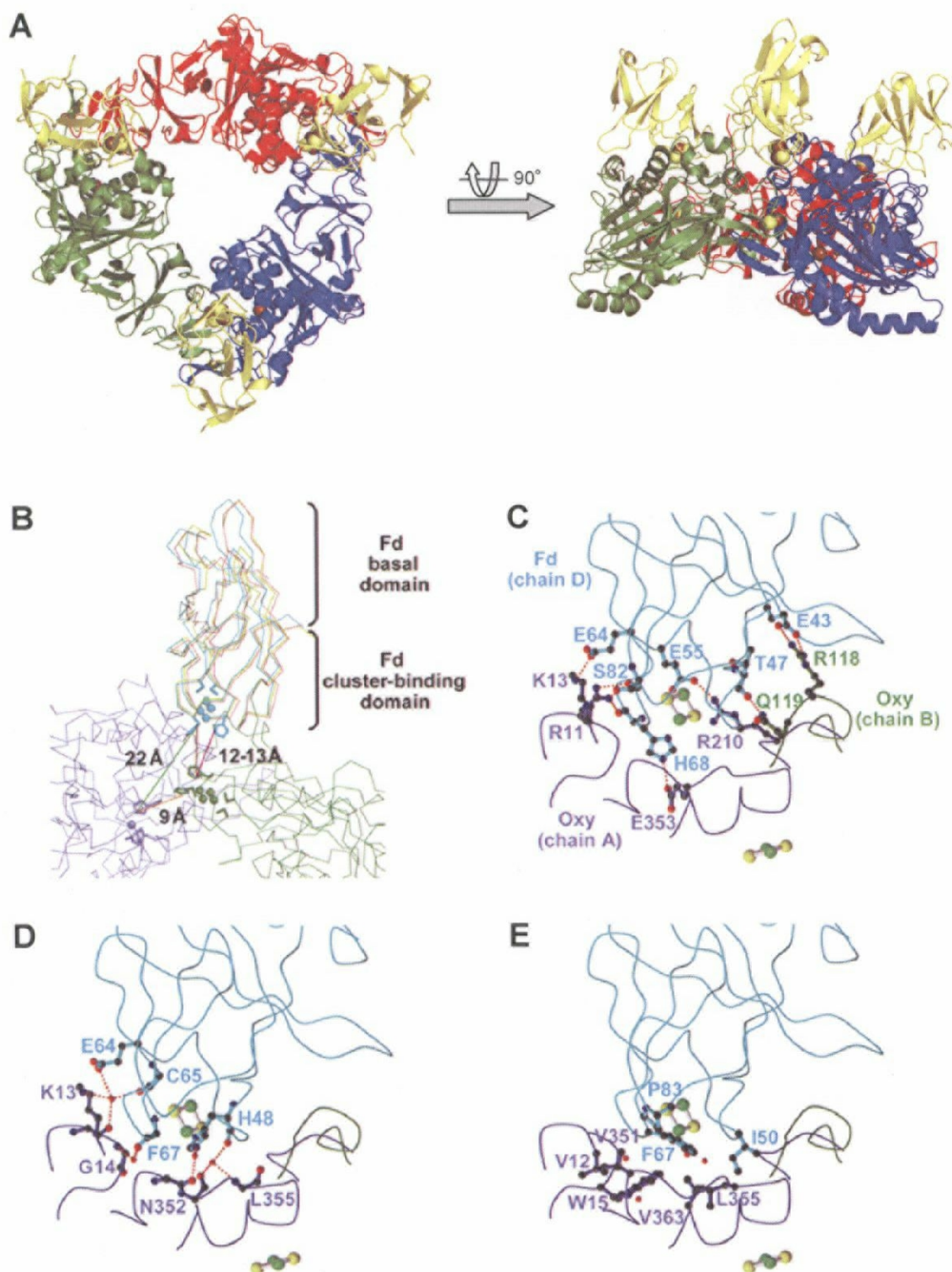


Figure 1-8. J3株由来CARD-OとCA10株由来CARD-Fの複合体の立体構造[Ashikawa et al., 2006]. (A) 全体構造。CARD-Oを緑、赤、青で、CARD-Fを黄色で示した。(B) CARD-Oに結合したCARD-Fを重ね合わせて示した。CARD-FとCARD-O各々のRieske clusterとそれに配位しているHisをそれぞれ水色、緑で、CARD-Oの非ヘム鉄とそれに配位しているHisを紫で示した。(C) CARD-O(紫)とCARD-F(水色)のアミノ酸残基間で見いだされた静電的相互作用と水素結合。(D) CARD-OとCARD-F間での水分子を介した水素結合ネットワーク。(E) CARD-OとCARD-F間の疎水性相互作用に寄与しているアミノ酸残基を示した。

れによると、CARD-O と CARD-F 間での静電的相互作用、疎水性相互作用、水素結合などに関わるアミノ酸残基が特定された。また、結合によって動く部分なども明らかになった[Ahikawa et al., 2006]。ROS の中で、電子伝達コンポーネントと **terminal oxygenase** の複合体の立体構造の報告例は CARD の例以外にはなく、この成果は、今まで殆ど解析がなされてこなかった ROS の電子伝達における構造レベルの解明に重要な情報を与えた。

以上、研究の背景を最近の情報も加えて述べてきたが、本研究開始当時は、細菌による **carbazole** 分解について遺伝学的・酵素学的な研究が行われていたのは CA10、J3 株のもの以外には殆どなく、KA1 株の *car* 遺伝子がようやく明らかになった程度であった。そこで、本研究では、上述の興味深い特徴を有する *car* 遺伝子の多様性を明らかにすることを目的として、新規 **carbazole** 資化菌を単離し、遺伝学的な解析を行った(第 2 章)。その過程で得られた *Nocardioide aromaticivorans* IC177 株は、学術論文による発表当時[Inoue et al., 2005]、唯一のグラム陽性 **carbazole** 資化菌の例となった。グラム陽性細菌による **carbazole** 代謝系を明らかにするべく IC177 株の *car* 遺伝子群の解析を行った(第 3 章)。興味深いことに、IC177 株が持つ CARD と既知の CARD とを比べるとその電子伝達コンポーネントの違いがあり、既存のものも含め、CARD が ROS の電子伝達メカニズムにおいて格好の研究材料であると考えられた。そこで、CARD の電子伝達メカニズム解明に向けた研究の一環として IC177 株由来 CARD の酵素学的・構造学的解析を行った(第 4 章、第 5 章)。