

## 第 5 章 *Nocardioides aromaticivorans* IC177 株由来 CARDO の X 線結晶構造解析

### 5-1. 緒言

前章では、IC177 株と class III 型の CARDO 間での電子伝達コンポーネントの互換性を解析し、その結果、IC177 株の CARDO-O は class III 型の CARDO-F から電子を受け取ることができず、また、逆に class III 型の CARDO-O は IC177 株の CARDO-F から電子を受け取ることができないことが明らかになった(本論文 4-3-5)。このような CARDO-O と -F 間の特異性を決める要因として、立体構造が決定的に重要な要因の 1 つであると考えられる。現在までに、J3 株の CARDO-O の単体[Nojiri et al., 2005]、CA10 株の CARDO-F の単体[Nam et al., 2005]、及びそれらの複合体[Ashikawa et al., 2006]の立体構造が明らかになっており、さらに、最近、当研究室にて、KA1 株の CARDO-O の立体構造も解かれ[Katsuki et al., unpublished data]、電子伝達の相互作用に重要なアミノ酸残基、分子表面の比較が行われた。

本章では、class IIB に属する IC177 株由来 CARDO の CARDO-O コンポーネントと CARDO-F コンポーネントの単体の立体構造を明らかにし、上記の立体構造既知の各 CARDO コンポーネントとの比較を行った。

## 5-2. 材料と方法

### 5-2-1. タンパク質の精製

結晶化用の精製した IC177 株由来 CARDO-O、及び、CARDO-F の調製は、前章で作成した C 末端 His タグが付加された CARDO-O、CARDO-F 発現用プラスミド pE177503、pE177506 を保持する大腸菌 BL21(DE3)を用いた。操作は前章 4-2-5～8 に従って行った。

### 5-2-2. 結晶化条件のスクリーニング

CARDO-O<sub>IC177</sub>、CARDO-F<sub>IC177</sub> の結晶化条件のスクリーニングには Hampton Research 社製の kit を用い、hanging drop 蒸気拡散法により行った。CARDO-O<sub>IC177</sub> においては、Crystal Screen kit を試した段階で、pH 4.6 以下の条件全てにおいて変色を伴う aggregation が観察されたため、他の kit では pH 4.6 以下の条件での結晶化は試みなかった。CARDO-F<sub>IC177</sub> においては seeding による結晶化も行った。使用した kit と条件数を以下に示した。

#### ①CARDO-O<sub>IC177</sub> の結晶化のために試みた条件(試みた条件の数/kit に含まれる条件の数)

Crystal Screen kit	50/50
Crystal Screen kit 2	34/48
Index	91/96
Crystal Screen Cryo	44/50
Grid Screen Ammonium Sulfate	16/24
Crystal Screen Cryo No. 50	24/96
+ additive screen kit	

#### ②CARDO-F<sub>IC177</sub> の結晶化のために試みた条件(試みた条件の数/kit に含まれる条件の数)

Crystal Screen kit	50/50
Crystal Screen kit 2	48/48
Index	96/96
Salt RX	96/96
Crystal Screen Cryo	50/50
Grid Screen Ammonium Sulfate	24/24
Grid Screen Sodium Malonate	24/24
Crystal Screen 2 No. 14	96/96
+ Additive Screen kit	
2.25 M Ammonium Sulfate、	96/96
0.1 M MES pH5.4	
+ Additive Screen kit	

#### <基本的な結晶化>

##### 操作

①精製タンパク質の buffer を Centriprep-10 (Millipore)により 5 mM Tris-HCl (pH 7.5)に置換し、適当な濃度に濃

縮して、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過した。

②各条件の **Reagent** を **VDX plate (Hampton Research)** のウェルに 800  $\mu\text{l}$  入れた。

③5、10、20、30  $\text{mg/ml}$  の濃度に調整したタンパク質溶液を **siliconized circle cover slide (Hampton Research)** に 2  $\mu\text{l}$  ずつのドロップにしてのせ、その各ドロップに 2  $\mu\text{l}$  のリザーバ溶液を加えた(以下、特に記述がない限りドロップはこの組成で作成した)。**Additive Screen kit** を使用する場合は、1つのドロップの組成をタンパク溶液：リザーバ溶液：additive = 2 : 1.6 : 0.4 となるようにした。

④③の **cover slide** を裏返し、ウェルにかぶせて密閉した。

⑤20°Cで静置し、顕微鏡で観察した。

#### <seeding による結晶化>

seeding による結晶化には **microseeding** と **macroseeding** を行った。**Microseeding** においては **Seed Bead (Hampton Research)** 添付のプロトコールに従って行った。**Seeding** の操作は全て 12°Cで行った。

#### i) microseeding

##### 操作

①**Seed Bead** のチューブに 50  $\mu\text{l}$  の **reagent** を加えた。

②**Hanging drop** 法により形成された、**cover slide** 上のドロップ内の結晶を **mounted cryo loop (Hampton Research)** で数個すくい、①のチューブに入れた。

③**Vortex** で 90 sec 破碎した。

④③に 450  $\mu\text{l}$  の **reagent** を加えた。

⑤④の破碎した結晶の溶液を **reagent** で  $1 \times 10^0$ 、 $1 \times 10^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-2}$ 、 $1 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-4}$  希釈した。

⑥5、10、20、30、40、60、80  $\text{mg/ml}$  の濃度に調整したタンパク質溶液を用意し、**siliconized circle cover slide** に 2  $\mu\text{l}$  ずつのドロップにし、その各ドロップに各希釈率の⑤を 2  $\mu\text{l}$  加えた。

⑦⑥の **cover slide** を裏返し、ウェルにかぶせて密閉した。

⑧20°Cで静置し、顕微鏡で観察した。

#### ii) macroseeding

##### 操作

①**siliconized circle cover slide** に **reagent** で 2~3  $\mu\text{l}$  ずつのドロップを 3~5 個つくった。

②**Hanging drop** 法により形成された、**cover slide** 上のドロップ内の結晶を **mounted cryo loop (Hampton Research)** で数個すくい、①のドロップに入れた。

③1、2、3、4、5、10、20、30、40、60、80  $\text{mg/ml}$  の濃度に調整したタンパク質溶液を用意し、各ドロップに 2.5~0.5  $\mu\text{l}$  ずつ添加した。

⑦⑥の **cover slide** を裏返し、ウェルにかぶせて密閉した。

⑧20°Cで静置し、顕微鏡で観察した。

### 5-2-3. 抗凍結剤の検討

抗凍結剤として、**glycerol**、**PEG 400**、**sucrose**、**2-methyl-2,4-pentanediol** などを用いて、**reagent** に適当量添加した溶液を調製し、**mounted cryo loop (Hampton Research)** ですくい、**cryo stream (-173°C)** に当てて凍結するかどうかを観察した。

#### 5-2-4. X 線回折強度データの収集と処理

X 線回折強度データは R-AXIS IV<sup>++</sup> (Rigaku, Japan)、もしくは、高エネルギー加速器研究機構の放射光施設 (Photon Factory; PF) にて収集し、それぞれ、波長 1.5418、1.0000 Å の X 線を用いた。R-AXIS IV<sup>++</sup> によるデータは結晶の空間群の決定にのみ用いた。その際に、R-AXIS IV<sup>++</sup> 付属のアプリケーション Crystal Clear を用い、解析には d\*TREK [Pflugrath, 1999] を用いた。PF、PR-Advanced Ring (AR) でのデータ収集は、ビームライン 6A、17A、NW12 のいずれかにて行い、回折データの処理は HKL2000 [Otwinowski and Minor, 1997] を使用した。

#### 5-2-5. 構造決定と精密化

CARDO-O<sub>IC177</sub> と CARDO-F<sub>IC177</sub> の立体構造は、それぞれ CARDO-O<sub>KA1</sub>、CARDO-F<sub>CA10</sub> をモデル分子とし、CCP4 [Collaborative Computational Project, Number 4, 1994] の Phaser [McCoy et al., 2005]、及び、ARP/warp [Perrakis et al., 1999] を用いた分子置換法によって初期位相の決定、及び、分子モデルの構築を行った。 $V_M$  (Matthews coefficient [Matthews, 1968]) の算出は website、<http://www.ruppweb.org/mattprob/> にて行った。また、self-rotation function 解析には CCP4 の POLARRFN を使用した。

モデルの精密化には CCP4 の refmac5 [Murshudov et al., 1997]、ARP/wARP [Perrakis et al., 1999]、及び、CNS [Brünger et al., 1998] を用いた。電子密度マップの視覚化とモデルの修正には Quanta (Accelrys, San Diego, USA)、及び、XtalView/Xfit [McRee, 1999] を用いた。得られた立体構造の評価には PROCHECK [Laskowski et al., 1992]、Whatcheck [Hoof et al., 1996] を用いた。

#### 5-2-6. 構造モデルの重ね合わせと作図

構築した立体構造モデルの重ね合わせは Quanta もしくは PyMOL [DeLano, 2001] を用いた。また、図の作成は PyMOL を用いた。

## 5-3. 結果と考察

### 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

濃度 5、10、20、30 mg/ml の CARDO-O<sub>IC177</sub> 溶液(buffer は 5 mM Tris-HCl pH 7.5)について 235 種類の reagent (Hampton Research 社製)を用いて結晶化条件の検討を行ったところ、Table 5-1 に示した条件で結晶の形成が確認された。Reagent の組成、2% PEG 400、0.1 M Na HEPES pH7.5、2.0 M Ammonium sulfate (Crystal Screen の no. 39)の条件で形成した結晶について高エネルギー加速器研究機構の放射光施設(PF-AR)のビームライン NW12 にて X 線を照射したが反射データは得られなかった。別の結晶化条件の、CARDO-O<sub>IC177</sub> 溶液濃度 30 ml/ml、12% (w/v) PEG 8000、0.4 M Lithium sulfate、20% (v/v) Glycerol (Crystal Screen Cryo の no. 50)においても 20°C で 3 日間の incubation で結晶が形成され、大きさ 0.2 × 0.2 × 0.02 mm 程度の結晶ができた。そこで、reagent をそのまま抗凍結剤として使用して同様に X 線を照射したところ、分解能 2.3 Å の反射データが得られた。この結晶の空間群は単斜晶系、C2 であり、単位格子パラメータは  $a = 280.0 \text{ Å}$ 、 $b = 161.7 \text{ Å}$ 、 $c = 194.7 \text{ Å}$ 、 $\alpha = \gamma = 90^\circ$ 、 $\beta = 118.7^\circ$ であった。この反射データによる結晶学的パラメータを Table 5-2 に示した。C2 の空間群では単位格子内に、非対称単位が 4 つ存在する。非対称単位内に CARDO-O<sub>IC177</sub> の monomer 分子がいくつ含まれるかを推定するため、この結晶の  $V_M$  (Matthews coefficient [Matthews, 1968])と溶媒含量を計算した。非対称単位内に 15 個含まれると仮定すると  $V_M$  は  $2.88 \text{ Å}^3/\text{Da}$ 、溶媒含量は 57.3%、16 個と仮定すると  $V_M$  は  $2.70 \text{ Å}^3/\text{Da}$ 、溶媒含量は 54.5%、17 個と仮定すると  $V_M$  は  $2.54 \text{ Å}^3/\text{Da}$ 、溶媒含量は 51.7%、18 個と仮定すると  $V_M$  は  $2.40 \text{ Å}^3/\text{Da}$ 、溶媒含量は 48.8%であった。これらは標準的な  $V_M$ 、溶媒含量としてここに挙げたが、この結晶の単位格子は非常に大きく、実際の非対称単位内の分子数についての確からしい推定は非常に困難であった。

### 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

CARDO-O<sub>IC177</sub> とアミノ酸レベルで 49、45%の identity を示す CARDO-O<sub>KAI</sub>、CARDO-O<sub>J3</sub> をモデル分子として分解能 2.3 Å の反射データについて CCP4 の Phaser を用いて分子置換法による構造決定を試みたところ、CARDO-O<sub>KAI</sub> をモデル分子とした場合にのみ、非対称単位内に 15 個の CARDO-O<sub>IC177</sub> を含む立体構造の解が得られた。15 個各々のサブユニット間同士の構造で大きな違いは見いだせなかったが、5 個のサブユニットにおいて 254~257 番目のアミノ酸残基の電子密度マップが明瞭ではなかった。その 5 個(chain B、I、J、L、M)以外の 3 つのサブユニット(chain A、D、F)が形成していた trimer を例に用いて、以下の文章で論じた。


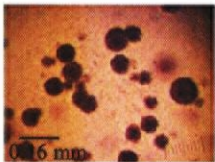
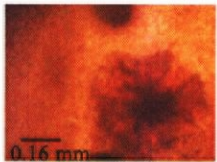
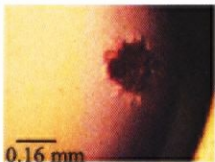
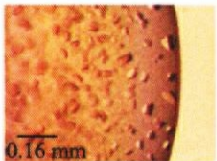
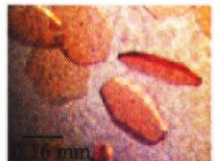

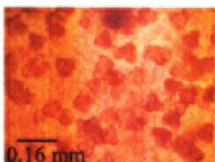
得られた立体構造のモデルについて、精密化と修正を CCP4 の Refmac5、XtalView/Xfit を用いて行い、水分子の導入と精密化には ARP/wARP を用いた。現在までのところ、 $R$  因子 15.7%、フリー  $R$  因子 21.6%まで精密化している。まだ若干のさらなる精密化の余地はあるが、立体構造としては十分確からしいモデルと考え、以降、このモデルを基に考察を行った。

### 5-3-3. IC177 株由来 CARDO-O の構造


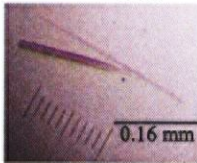
#### 5-3-3-1. 全体構造

CARDO-O<sub>IC177</sub> は、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果(本論文 4-3-2)とこれまでの知見から、

**Table 5-1.** IC177由来CARDO-Oの結晶化条件。

結晶の顕微鏡写真とCARDO-O <sub>IC177</sub> 溶液濃度		Reagentの組成 (kitと番号)
		2% (v/v) PEG 400 0.1 M Na HEPES pH 7.5 2.0 M Ammonium sulfate (Crystal Screen # 39)
		5% (v/v) <i>iso</i> -Propanol 2.0 M Ammonium sulfate (Crystal Screen 2 # 5)
		12% (w/v) PEG 8000 0.4 M Lithium sulfate 20% (v/v) Glycerol (Crystal Screen Cryo # 50)
		0.1 M Bis-Tris pH 5.5 2.0 M Ammonium sulfate (Index # 3)

**Table 5-2.** CARDO-O<sub>IC177</sub> と CARDO-F<sub>IC177</sub> の結晶における結晶学的パラメータ、データ収集、及び、精密化の情報。括弧内の数値は最外殻のものを示した。Beamline は、つくばの高エネルギー加速器研究機構施設内のもの。

	CARDO-O <sub>IC177</sub>	CARDO-F <sub>IC177</sub>
		
Beamline	AR-NW12	BL-17A
Wavelength (Å)	1.0	1.0
Space group	<i>C2</i>	<i>P4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2</i>
Unit cell parameters (Å, °)	$a = 280.0, b = 161.7$ $c = 194.7$ $\alpha = \gamma = 90.0$ $\beta = 118.7$	$a = b = 50.12$ $c = 82.22$ $\alpha = \gamma = \beta = 90.0$
Resolution range (Å)	50.0-2.30 (2.38-2.30)	50.0-1.99 (2.06-1.99)
Total No. of reflections	2,520,002	66,413
No. of unique reflections	336,389 (33,466)	7,802 (738)
Completeness (%)	100 (100)	99.8 (97.6)
Average $I/\sigma$ ( $I$ ) <sup>a</sup>	20.4 (4.9)	39.7 (9.0)
$R_{\text{sym}}$ (%)	8.4 (30.3)	8.6 (29.9)
Multiplicity	7.5 (7.3)	8.5 (8.2)
Refinement		
$R_{\text{factor}}$ (%)	15.7	17.7
$R_{\text{free}}$ (%)	21.6	18.9
RMSD		
Bond lengths (Å)	0.021	0.013
Bond angles (°)	2.11	1.51

<sup>a</sup>  $R_{\text{sym}} = \sum_{\mathbf{h}} \sum_l |I_{\mathbf{h}l} - \langle I_{\mathbf{h}} \rangle| / \sum_{\mathbf{h}} \sum_l \langle I_{\mathbf{h}} \rangle$ , where  $I_l$  is the  $l$ th observation of reflection  $\mathbf{h}$  and  $\langle I_{\mathbf{h}} \rangle$  is the weighted average intensity for all observations  $l$  of reflection  $\mathbf{h}$ .

<sup>b</sup>  $R_{\text{factor}} = \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}| / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$ , where  $F_{\text{obs}}$  and  $F_{\text{calc}}$  are the observed and calculated structure factors, respectively.  $R_{\text{free}}$  is the same, but for a test set of reflections not used in refinement.

nativeの状態では3つのサブユニットが結合したtrimerとして存在している可能性が高かったが、実際の構造でも3つのサブユニットがドーナツ状のtrimerを形成することが明らかになった(Fig. 5-1A)。Trimer全体は外径は約100 Å、厚さは45 Åの大きさにドーナツの孔の径は30 Åだった。

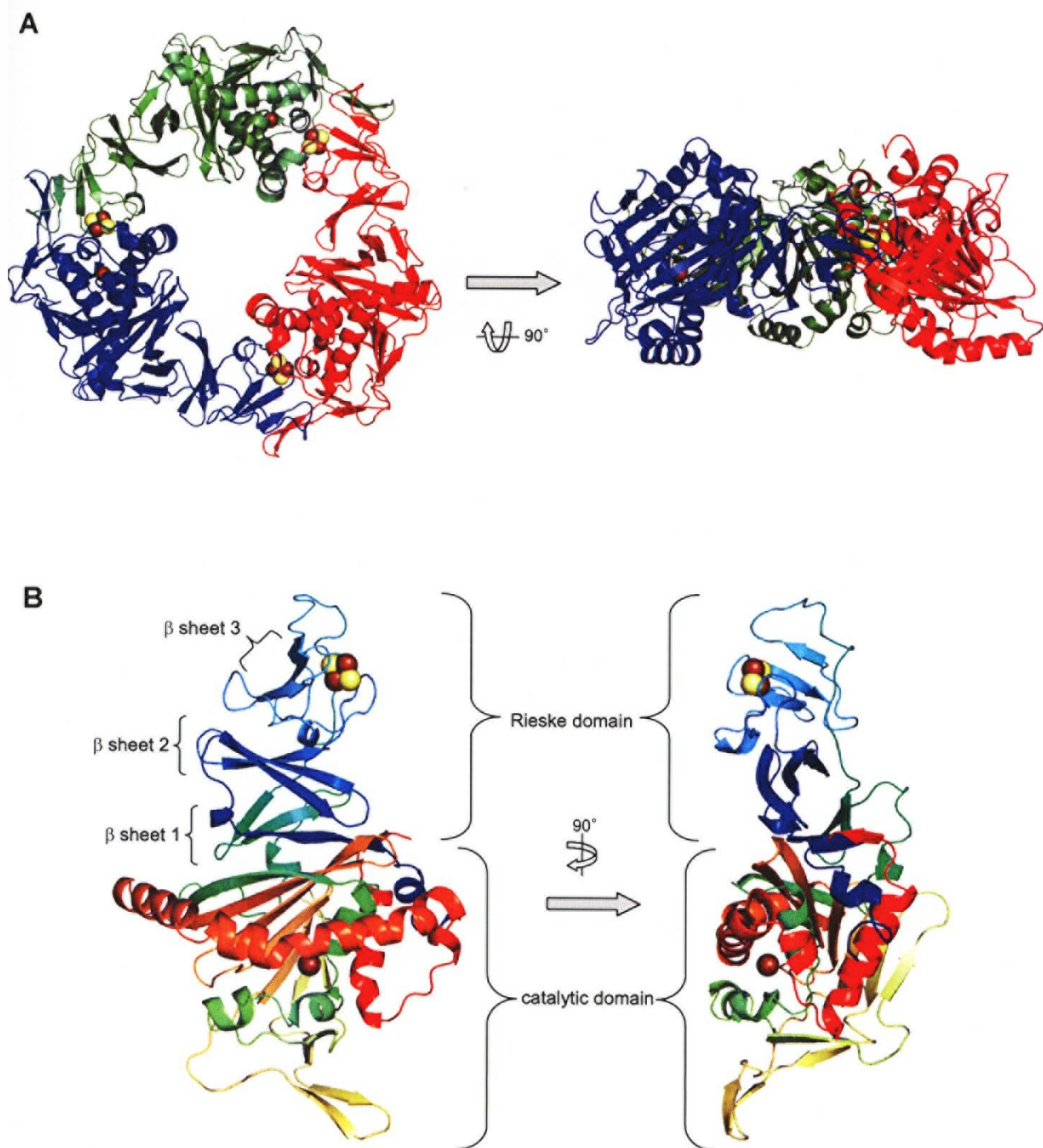
### 5-3-3-2. IC177株由来 CARDO-Oのサブユニットの構造

得られた立体構造モデルには、CARDO-O<sub>IC177</sub>の各サブユニット、16～382番目の残基(塩基配列からの予想ではHisタグを含まず全部で388残基)が含まれていた。1つのサブユニット全体は約85×55×45 Åの大きさで、その分子の一方の端にはRieske-type [2Fe-2S] clusterが位置しており、分子の中心より少しずれた位置に活性中心のFe原子が存在した(Fig. 5-1B)。サブユニット分子は大きく2つのドメインに分けることができ、Rieske [2Fe-2S] clusterを含むドメインをRieske domain (31～148番目の残基)、活性中心のFe原子を含むドメインをcatalytic domain (16～30と149～382番目の残基)と呼ぶことにした。この命名は、ROSに分類される酵素の中で、そのterminal oxygenaseコンポーネントの構造が初めて明らかになった例であるNDO-Oの報告に準じたものである[Kauppi et al., 1998]。ROSのterminal oxygenaseは電子供与体(ferredoxinもしくはreductase)からの電子をRieske [2Fe-2S] clusterでまず受け取り、その電子を活性中心のFeに伝えるという流れで分子内での電子の伝達が行われる。サブユニット分子内でのRieske-type [2Fe-2S] clusterと活性中心のFe原子の距離は約45 Åであり、電子の伝達が行われるには遠い距離であった。しかし、trimer全体に注目すると、隣接するサブユニット同士の[2Fe-2S] clusterとFe原子の距離は約12 Åであり、電子の授受はサブユニット間で行われるであろうことが予想された。このようなRieske-type [2Fe-2S] clusterと活性中心のFe原子の位置関係は、J3株、KA1株由来のCARDO-Oや他のROSと同様であった[本論文第一章、Ferraro et al., 2005]。

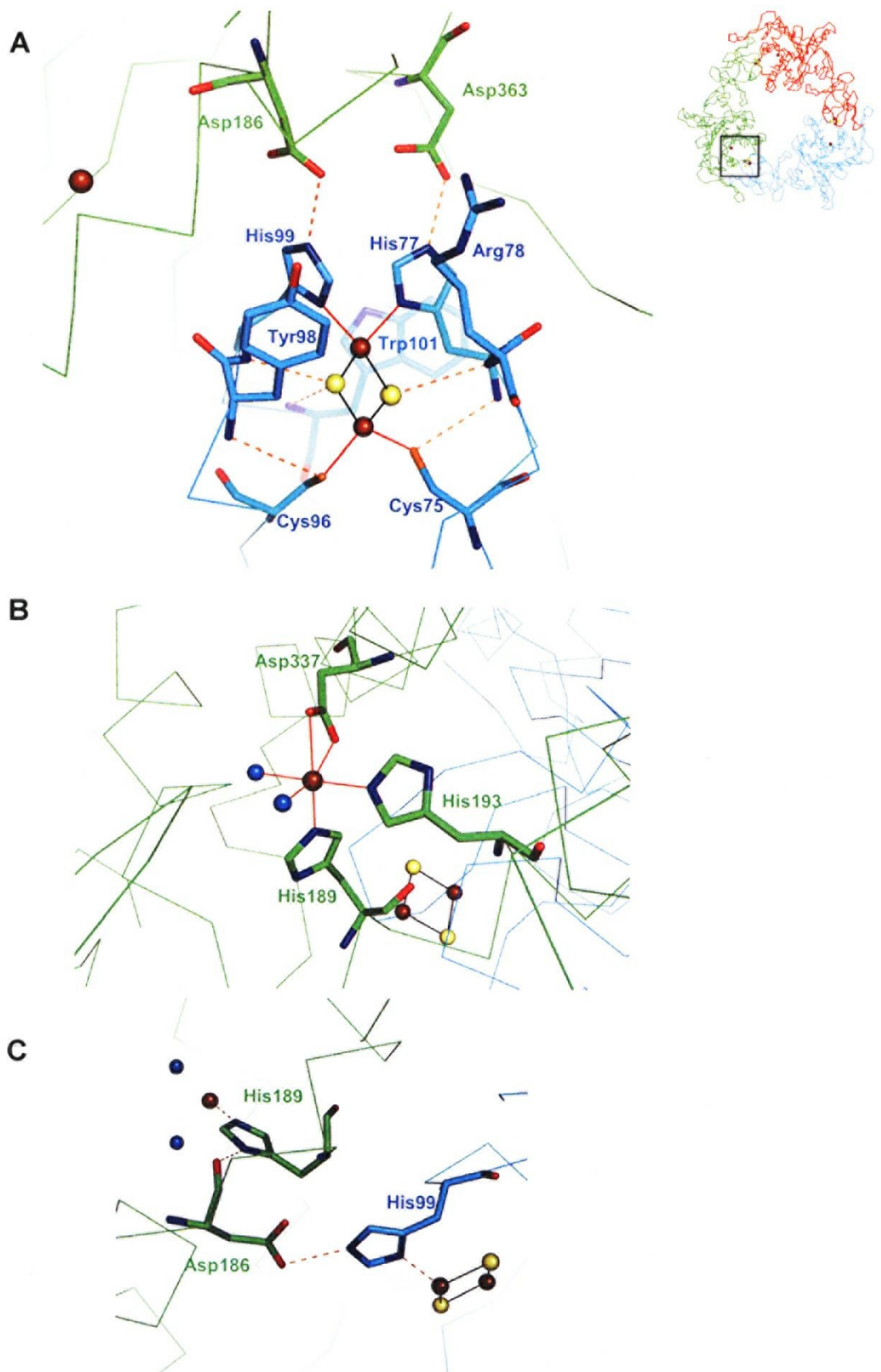
### 5-3-3-3. Rieske domain

CARDO-O<sub>IC177</sub>のRieske domainは他のROSのterminal oxygenaseにおけるRieske domain [Ferraro et al., 2005]やCARDO-F<sub>CA10</sub> [Nam et al., 2005]、BDO-F<sub>LB400</sub> [Colbert et al., 2000]、arsenite dioxygenaseのRieske subunit [Ellis et al., 2001]、cytochrome *bc*<sub>1</sub>、cytochrome *b<sub>6</sub>f*のRieske domain [Iwata et al., 1996, 1998, Carrell et al., 1997]と同様に、3つの逆平行βシートを中心に構成されていた(Fig. 5-1)。2つのFe原子と2つのS原子で構成されるRieske-type [2Fe-2S] clusterの一方のFe原子はCys75、Cys96のS<sup>γ</sup>原子に、もう一方のFe原子はHis77、His99のN<sup>δ1</sup>原子に配位していた(Fig. 5-2A)。また、[2Fe-2S] clusterの一方のS原子(S2)はArg78の主鎖のN原子と、もう一方のS原子(S2)はHis99とTrp101の主鎖のN原子と水素結合しており、Fe原子に配位しているCys75とCys96のS<sup>γ</sup>原子は、それぞれHis77とTyr98の主鎖のN原子とも水素結合していた(Fig. 5-2A)。さらに、His77とHis99のN<sup>δ1</sup>原子は、それぞれ隣のサブユニットのAsp363とAsp186のO<sup>δ2</sup>とも水素結合していた。同様の水素結合ネットワークはCARDO-O<sub>J3</sub>やNDO-Oにおいても見られた[Nojiri et al., 2005]。これら[2Fe-2S] cluster周辺の水素結合は、その酸化還元中心の酸化還元電位を決める重要な要因であるという報告があり[Hunsicker-Wang et al., 2003]、CARDO-O<sub>IC177</sub>、CARDO-O<sub>J3</sub>、NDO-Oにおける水素結合ネットワークの類似性から、これらの酵素が互いに似通った酸化還元電位を持つことが予想された。





**Figure 5-1.** CARD-O<sub>IC177</sub>の立体構造。鉄原子および硫黄原子はそれぞれ茶および黄の球で示した。  
**(A)** CARD-O<sub>IC177</sub>のtrimerの立体構造。Chain毎に色分けした。**(B)** CARD-O<sub>IC177</sub>のmonomerの立体構造。N末端側からC末端側に行くにつれ、青→水色→緑→黄→橙→赤と色が変わるよう示した。



**Figure 5-2.** CARD-O<sub>IC177</sub>のRieske [2Fe-2S] clusterとその周辺の水素結合 (A)、活性中心のFe原子に配位する残基と水原子(B)、Rieske [2Fe-2S] clusterから活性中心のFe原子への電子伝達に必要なとされる水素結合ネットワーク(C)を示した。鉄原子、硫黄原子、水分子、はそれぞれ茶、黄、水色の球、アミノ酸のN、O、S原子はそれぞれ青、赤、橙で示した。挿絵は(A)、(B)、(C)のtrimerでのおおよその位置を四角で示した(但し、挿絵の図はFig. 5-1A左側の図の真裏側から見た図になっている)。

#### 5-3-3-4. Catalytic domain

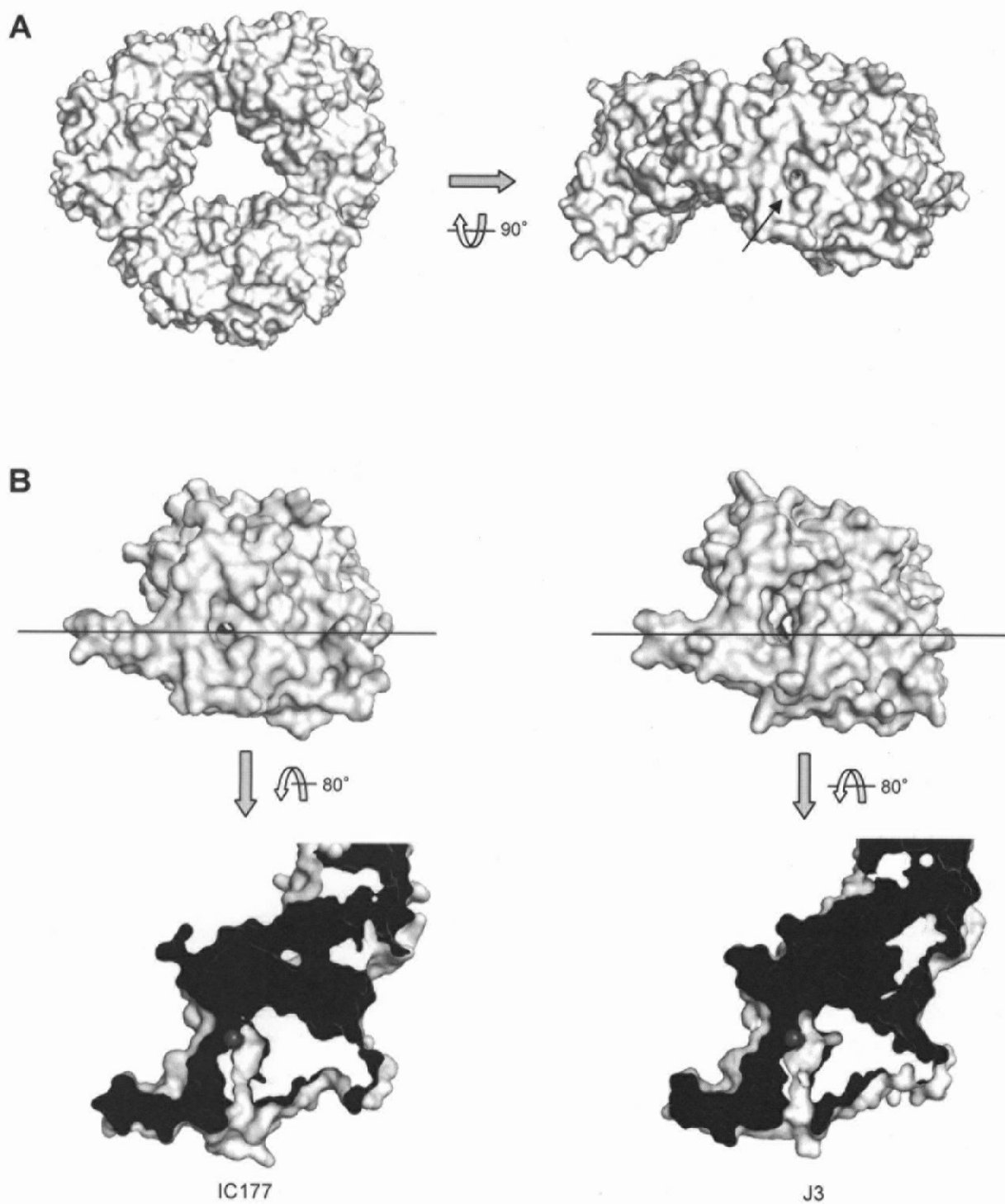
Catalytic domain はドメイン全体に渡る逆平行 $\beta$ シートとその周辺を覆うように存在する $\alpha$ ヘリックスから成り、helix-grip fold とよばれる Betv1-like superfamily に分類されるドメインで、steroidogenic acute regulatory protein related lipid transfer (START) domain とも呼ばれている。よく似たドメインを持つ酵素として、樺の花粉のアレルゲンである Betv1 [Iyer et al., 2001]、ミトコンドリアへのコレステロールの運搬を担う MLN64 [Tsuji-shita and Hurley, 2000, Romanowski et al., 2002]、Phosphatidylinositol transfer protein PITP [Yoder et al., 2001]などが報告されており、これらの酵素で共通するのは、長いヘリックスと逆平行 $\beta$ シートが存在することで、 $\beta$ シートは7つの鎖から成り、並びは 2345671 の順である。これらヘリックスと $\beta$ シートは疎水的なポケットを構成するため、疎水的な化合物を基質とするという機能面における共通点を生み出していると考えられる。しかし、基質ポケットの大きさや形は多様でそれぞれ基質に合った形状をしている。長い $\alpha$ ヘリックスと $\beta$ シートは CARDO-O<sub>IC177</sub>にもみられ、 $\beta$ シートに挟まれるように活性中心の Fe 原子が存在し、ヘリックス(Fig. 5-1B の中心を横切る橙色の長いヘックス)の間には Fe 原子に配位している Asp337 が存在した。活性中心の Fe 原子は His189、His193 とともに配位しており、Fe 原子に配位するこれら 3 つに相当する残基(Fig. 5-2B)は全ての ROS の terminal oxygenase で保存されていた。活性中心の Fe 原子にはさらに 2 つの水分子が配位しているのが観察された(Fig. 5-2B)。

#### 5-3-3-5. Rieske cluster から活性中心への電子伝達

terminal oxygenase において Rieske [2Fe-2S] cluster から活性中心の Fe への電子の伝達は水素結合ネットワークを介して行われると考えられている。先行研究の CARDO-O<sub>J3</sub> では、Asp180 を介して Rieske cluster から活性中心の Fe への電子伝達がなされると考えられている[Nojiri et al., 2005]。IC177 株の CARDO-O では Asp186 が同様の役割を果たすと考えられ、Rieske [2Fe-2S] cluster の電子は His99 の N<sup>ε2</sup> 原子から隣のサブユニットの Asp186 の O<sup>δ2</sup> へと伝わり、His189 のイミダゾール環の N<sup>δ1</sup> 原子を介して最終的に活性中心の Fe 原子に伝わる電子伝達経路が推定された(Fig. 5-2C)。この経路は NDO-O において推定された経路とも類似しており[Karlsson et al., 2003]、ROS に共通した電子の伝達経路であると考えられた。

#### 5-3-3-6. 基質結合ポケット

CARDO-O<sub>IC177</sub> の基質結合ポケットの入り口は trimer のドーナツの外側の側面に位置していた(Fig. 5-3A)。IC177 株由来 CARDO-O の基質結合ポケットは J3 株のそれと比較し、入り口が狭く、ポケットの奥の形が異なっていた(Fig. 5-3B)。J3 株の基質ポケットの奥は二股に分かれていて小さな窪みが 2 つ存在したのに対し、IC177 株ではその様な窪みはなく、基質ポケット全体として円筒状の形であった。本論文第三章(3-3-4)で明らかにしたように、IC177 株と J3(CA10)株の CARDO の基質嗜好性は異なるが、このような基質ポケットの形状の違いに起因する可能性が考えられる。基質ポケットの形や大きさは基質特異性に影響を与えることが一般的であり、J3 株の CARDO-O においても、基質ポケットを構成する残基に変異を導入した酵素では基質特異性が変化することが明らかになっている[Uchimura, Horisaki et al., unpublished data]。その研究では、基質と CARDO-O<sub>J3</sub> の立体構造のモデリングから、Ile262、Phe275、Gln282、Phe329 が基質特異性を決める重要な残基であると考え、これらの残基に網羅的に変異を導入し、基質特異性の変化



**Figure 5-3.** CARDO-O<sub>IC177</sub>の基質ポケット。鉄原子は茶色の球で示した。(A) CARDO-O<sub>IC177</sub>のtrimer全体における基質ポケットの位置(矢印)。(B) IC177株、及び、J3株のCARDO-Oの基質ポケット。上の図は外から見た基質ポケットの入り口。上の図を80度回転させての直線部分を断面としたのが下の図。PDB IDは1WW9。



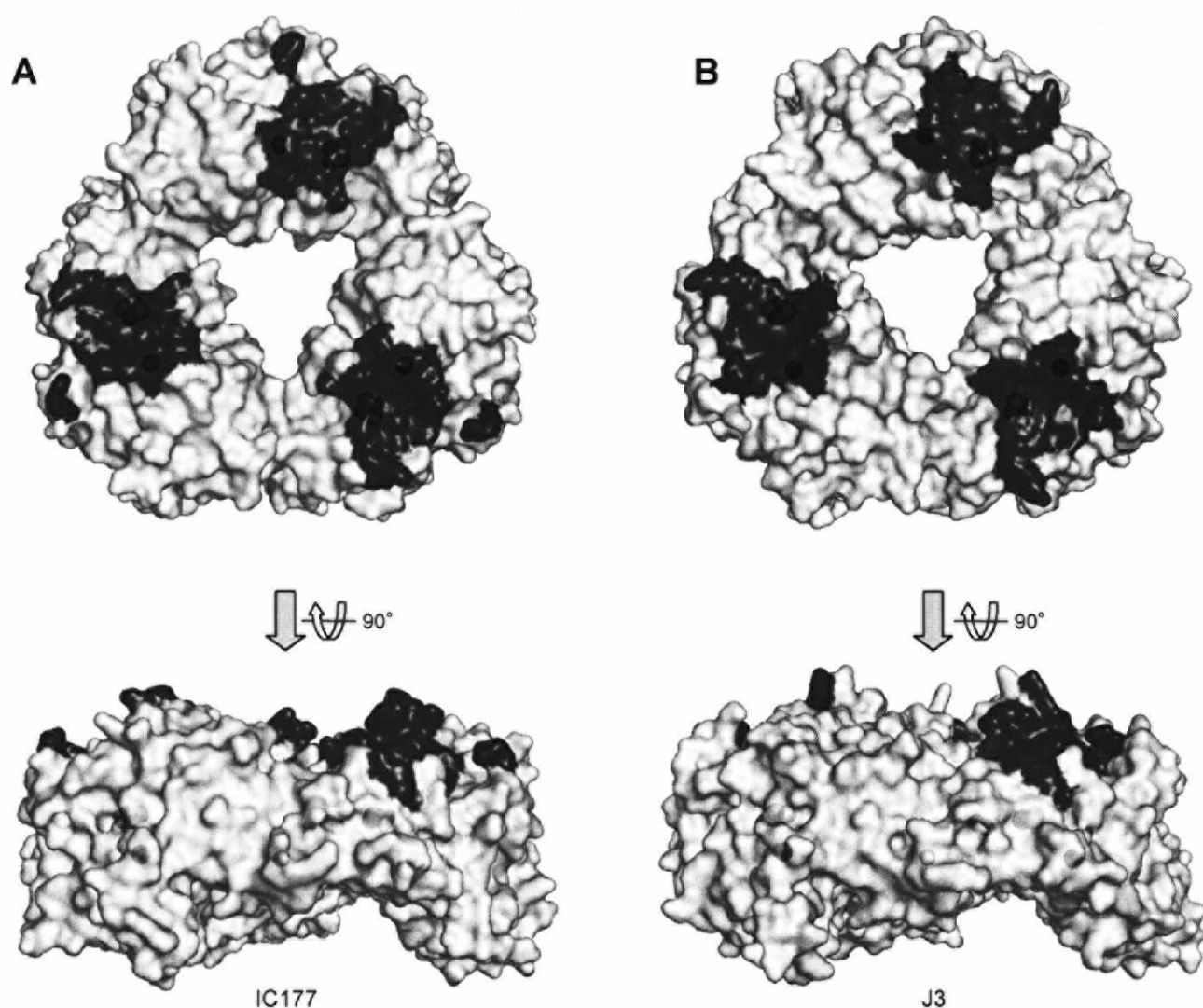
を調べている。J3 株の Ile262 にあたる残基は IC177 株においては Val (266 番目の残基) であるが、CARDO-O<sub>J3</sub> の変異酵素 I262V では carbazole に対する反応産物に 1-hydroxycarbazole が 50% 程度含まれており(野生型ではこの反応産物は殆ど検出されない)、基質特異性に変化が見られた。しかし、IC177 株の CARDO の基質嗜好性の解析結果(本論文 3-3-4)では 1-hydroxycarbazole は検出されなかったため、このアミノ酸残基の違いのみではなく、基質ポケット全体としての違いが基質特異性の微妙な違いを生み出していると考えられた。今後、CARDO-O<sub>IC177</sub> の基質との複合体の立体構造を明らかにすることで、より明確に基質特異性を決める要因が明らかになるものと考えられる。

#### 5-3-3-7. CARDO-F との結合部分の推定

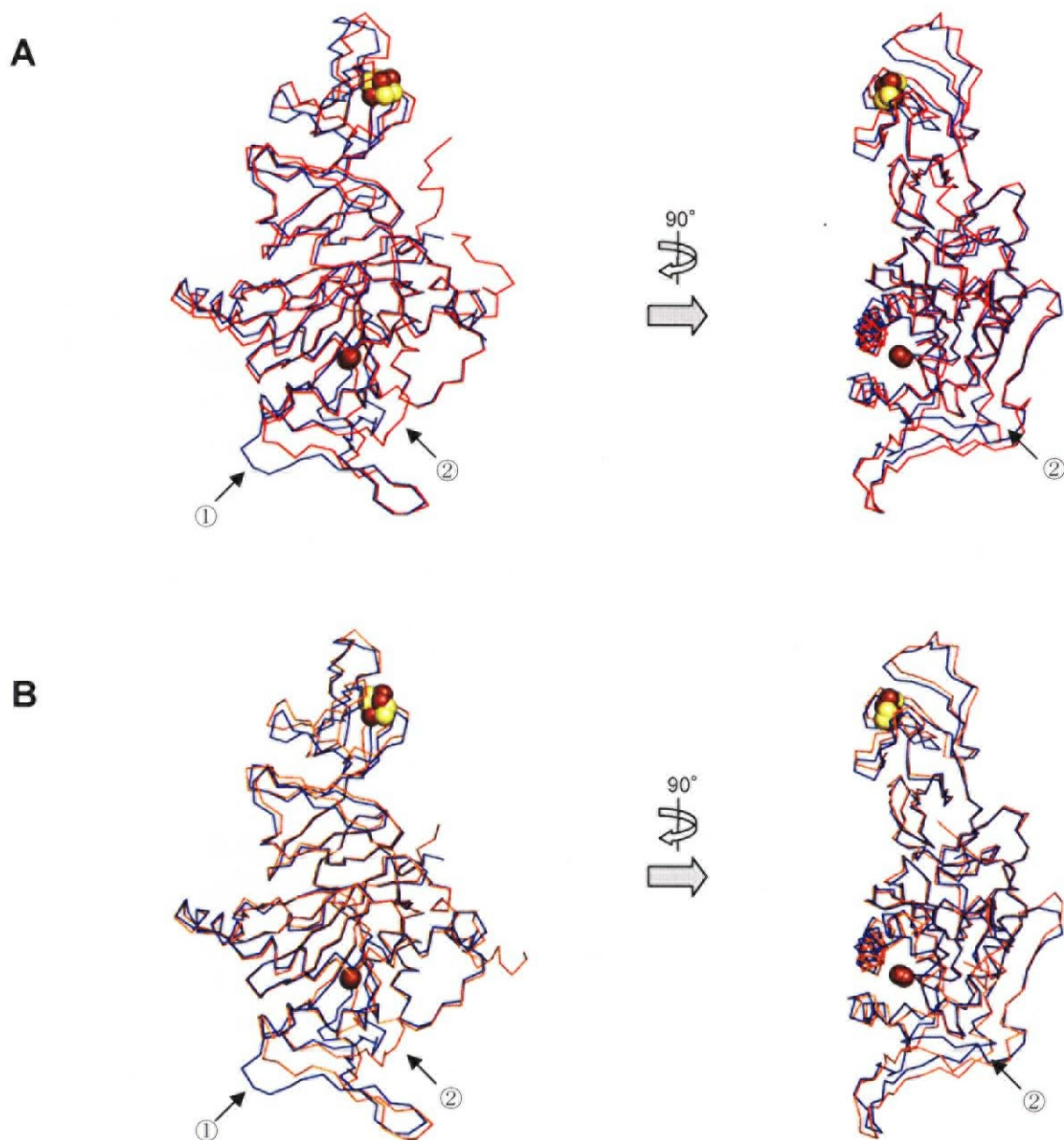
これまでに、J3 株の CARDO-O と CA10 株の CARDO-F が結合した複合体の X 線結晶構造解析がなされ(Fig. 1-8、[Ashikawa et al., 2005, 2006])、CARDO-O<sub>J3</sub>、CARDO-F<sub>CA10</sub> それぞれの構造における結合に関与するアミノ酸残基が明らかになっている。そこで、IC177 株の CARDO-O の構造上どの部分がそれらアミノ酸残基に相当するのかを推定した。まず、J3 株と IC177 株のアミノ酸配列のアライメント解析(Fig. 3-2)から CARDO-F との結合に関与するアミノ酸残基が IC177 株の CARDO-O のどのアミノ酸残基にあたるかを割り出した。相互作用領域は、J3 株では 4 ヶ所あり①Arg11-Trp15、②Gln115-Gln119、③Arg210、④Trp350-Val363 である(Fig. 3-2 の背景が黄の残基、Fig. 5-4A の黒[③は青]色の部分)。CARDO-O<sub>IC177</sub> において、それらアミノ酸残基に相当する部分、すなわち、①Ala17-Trp21、②Val121-Ile125、③Arg215、④Trp354-Val367 (Fig. 3-2 の背景が黄の残基)を Fig. 5-4B の黒(③は青色)で示した。①、②、④においては両方で立体構造上比較的近い位置にあったが(Fig. 5-4 黒の部分)、③の領域では顕著な違いが見いだされた(Fig. 5-4 青の部分)。J3 株における③の Arg210 は CARDO-F<sub>CA10</sub> の Glu55 と静電的に結合していた[Ashikawa et al., 2006]。IC177 株においてこの残基に相当すると考えられたのは Arg215 であり、Arg215 は明らかに J3 株の Arg210 とは異なる位置に存在した(Fig. 5-4 青の部分)。KA1 株においてはアミノ酸配列上で相当する Arg 残基は見いだされなかった(Fig. 3-2)。前章で行った class III 型(J3 株と CA10 株)と IC177 株の CARDO における電子伝達コンポーネントの互換性の解析結果では、class III 型の CARDO-O は class III 型の CARDO-F からしか電子を受け取ることが出来ず、IC177 株においても同様に本来の組み合わせでなければ電子の伝達が起こらなかったことから、CARDO-O と -F 間には高い特異性があることを示した(本論文 4-3-5)。上記の Arg 残基の位置が CARDO-F との相互作用の相性に大きく関与する可能性が考えられるが、今後、この残基の変異酵素を作成し、生化学的な解析を行うことでより確かな情報が得られるものと考えられる。

#### 5-3-3-8. 他の CARDO-O との比較

CARDO-O<sub>IC177</sub> の trimer 構造と CARDO-O<sub>J3</sub> と CARDO-O<sub>KA1</sub> の立体構造とを、Quanta を用い、アライメントして一致する C<sub>α</sub> 原子同士で重ね合わせたところ、root-mean-square deviation (RMSD) はそれぞれ 4.73 Å (1095 原子)、2.62 Å (1095 原子)であった。また、1 つのサブユニット同士では、J3 株とは 1.94 Å (365 原子)、KA1 株とは 1.61 Å (365 原子)であり、重ね合わせた図を Fig. 5-5 に示した。IC177 株の CARDO-O は全体としては J3 株、KA1 株とよく似ていたが、2 ヶ所において主鎖の違いが観察された(Fig. 5-5①と②)。①周辺の残基は CARDO-O の構造上、活性中心や Rieske [2Fe-2S] cluster と遠く、trimer のドーナツ型の外側の端に位置し、これまでの知見からは



**Figure 5-4.** CARDO-O<sub>J3</sub>とCARDO-F<sub>CA10</sub>間の結合に関与するアミノ酸残基の位置(黒と青色部分)と、それに基づいて推定されたIC177株のCARDO-Oにおける相当するアミノ酸残基の位置。鉄、硫黄原子はそれぞれ茶、黄色の球で示した。CARDO-O<sub>IC177</sub>のArg215とCARDO-O<sub>J3</sub>のArg210は青で示した。(A)CARDO-O<sub>IC177</sub>の推定相互作用領域(黒と青色部分)。(B) J3株CARDO-OのCARDO-Fとの相互作用部分(黒と青色部分; Ashikawaら[2006]の研究結果に基づいたもの)。PDB IDは1WW9。



**Figure 5-5.** CARDO-O<sub>IC177</sub>と他のCARDO-Oの主鎖での重ね合わせによる比較。鉄、硫黄原子はそれぞれ茶、黄色の球で示した。違いが見られた部分を矢印で示した。但し、IC177株のN末端側15残基、C末端側6残基においては構造決定に至らなかったためここには示されておらず、その点でJ3株やKA1株とは異なる。(A)CARDO-O<sub>IC177</sub>を青、CARDO-O<sub>J3</sub> (PDB ID:1WW9)を赤で示した。(B) CARDO-O<sub>IC177</sub>を青、CARDO-O<sub>KA1</sub> (Katsuki et al., unpublished data)を橙で示した。

特に重要なアミノ酸残基と考えられるものはみいだされていない。一方、②には 3-3-3-7 で述べた、CARDO-O<sub>IC177</sub> の R215 が位置しており、Fig. 5-4 に示した違いに起因するものであった。J3 株の Arg210 と IC177 株の Arg215 はこの重ね合わせにおいてはそれぞれの C<sub>α</sub>原子間の距離は 5.1 Å と大きく離れていた。

#### 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

濃度 5、10、20、30 mg/ml の CARDO-F<sub>IC177</sub> 溶液(buffer は 5 mM Tris-HCl [pH 7.5])について 388 種類の reagent を用いて結晶化条件の検討を行ったところ、Table 5-3 に示した条件で結晶の形成が確認された。塩を沈殿剤とする条件を中心に多数の条件で結晶化が観察された。しかし、形成された結晶のほとんどは微細な針状の結晶であり、X 線の照射が可能と思われるものはほとんどなく、いくつかの結晶に関しては実際に R-AXIS IV<sup>++</sup>にて X 線を照射したが、反射のスポットは観察されなかった。また、それらの中でも比較的大きな針の結晶がウニのような形状で形成されていた 2.0 M Ammonium sulfate、0.1 M Na citrate (pH 5.6)、0.2 M K/Na tartrate (Crystal Screen 2 の no. 14)で 20°C 2~3 日間の incubate で形成された結晶と、安定して微細な針状の結晶が形成された 2.25 M Ammonium Sulfate、0.1 M MES (pH5.4)で 20°C 2 日間の incubate で形成された結晶において、Additive Screen kit の 96 条件を試したが、特に結晶の形状が改善したような結晶は得られなかった。そこで、Crystal Screen 2 の no. 14 の条件での針状結晶の塊を崩して 1 本の針状の結晶にしたものを PF-AR の Beamline NW12 にて X 線を照射したところ、分解能 2.6 Å の反射データを得ることができた。その際、抗凍結剤には 9.2 µl の reagent に 8 µl の glycerol を加えた溶液を用いた。より高分解能な反射データを得るべく、Crystal Screen 2 の no. 14 の条件について microseeding、及び、macroseeding による結晶化を試みたところ、macroseeding により、針状の結晶がウニのように塊にならず、1 つ 1 つが分離した状態のまま成長した結晶が得られた。この結晶は非常に小さく、0.2 × 0.02 × 0.02 mm 程度の大きさであった。この結晶について、微小な結晶に対しても X 線照射が可能な PF の Beamline-17A にて X 線を照射したところ、分解能 2.0 Å の反射データの収集に成功した。この結晶の空間群は正方晶系、 $P4_12_12$  であり、単位格子パラメータは  $a = 50.116$  Å、 $b = 50.116$  Å、 $c = 82.224$  Å、 $\alpha = \gamma = \beta = 90^\circ$  であった。この反射データによる結晶学的パラメータを Table 5-2 に示した。 $P4_12_12$  の空間群では単位格子内に、非対称単位が 8 つ存在する。非対称単位内に CARDO-F<sub>IC177</sub> の monomer 分子がいくつ含まれるかを推定するため、この結晶の  $V_M$  と溶媒含量を計算したところ、非対称単位内に 1 個含まれ、 $V_M$  は 1.97 Å<sup>3</sup>/Da、溶媒含量は 37.4%であった。



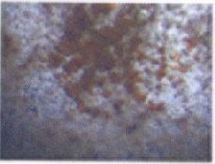






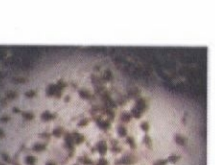




#### 5-3-5. 分子置換法による IC177 株由来 CARDO-F の構造決定と精密化

CARDO-F<sub>IC177</sub> とアミノ酸レベルで 31%の identity を示す CARDO-F<sub>CA10</sub> をモデル分子として分解能 2.0 Å の反射データについて CCP4 の Phaser を用いて分子置換法による構造決定を試みたところ、非対称単位内に 1 個の CARDO-F<sub>IC177</sub> を含む立体構造の解が得られた。

得られた立体構造のモデル構築には ARP/wARP を使い、精密化と修正を CCP4 の Refmac5、XtalView/Xfit を用いて行い、水分子の導入と精密化にも ARP/wARP を用いた。十分に精密化したモデルについて PROCHECK、及び、Whatcheck にて構造の評価を行い、結果に従って修正を加えた。最終的な構造として決定したモデルの  $R$  因子、フリー  $R$  因子はそれぞれ、17.7%、18.9%であった。



**Table 5-3. IC177由来CARDO-Fの結晶化条件。写真中のスケールバーの1目盛りは16  $\mu\text{m}$ 。**

結晶の顕微鏡写真と CARDO-F <sub>IC177</sub> 溶液濃度	Reagentの組成 (kitと番号)	結晶の顕微鏡写真と CARDO-F <sub>IC177</sub> 溶液濃度	Reagentの組成 (kitと番号)
 20 mg/ml	2.0 M Ammonium sulfate 0.1 M Tris HCl (pH 8.5) (Crystal Screen # 4)	 20 mg/ml	0.1 M Na HEPES (pH 7.5) 2.0 M Ammonium sulfate (Index # 5)
 30 mg/ml	1.4 M Sodium citrate 0.1 M Na HEPES (pH 7.5) (Crystal Screen # 38)	 30 mg/ml	0.1 M Na HEPES (pH 7.5) 1.4 M Sodium citrate (Index # 20)
 20 mg/ml	2.0 M Ammonium sulfate 0.1 M Na Citrate (pH 5.6) 0.2 M K/Na Tartrate (Crystal Screen 2 # 14)	 30 mg/ml	1.8 M tri-Ammonium citrate (pH 7.0) (Index # 21)
 60 mg/ml	Macroseeding 2.0 M Ammonium sulfate 0.1 M Na Citrate (pH 5.6) 0.2 M K/Na Tartrate (Crystal Screen 2 # 14)	 10 mg/ml	2.1 M DL-Malic acid (pH 7.0) (Index # 23)
 2 mg/ml	Macroseeding (reagent:protein solution =2 $\mu\text{l}$ : 0.5 $\mu\text{l}$ ) 2.0 M Ammonium sulfate 0.1 M Na Citrate (pH 5.6) 0.2 M K/Na Tartrate (Crystal Screen 2 # 14)	 5 mg/ml	2.4 M Sodium malonate (pH 7.0) (Index # 27)
 30 mg/ml	30% (w/v) PEG MME 5000 0.1 M MES (pH 6.5) 0.2 M Ammonium sulfate (Crystal Screen 2 # 26)	 20 mg/ml	0.1 M Bis-Tris Propane (pH 7.0) 2.0 M tri-Ammonium citrate (SaltRX # 18)
 20 mg/ml	0.1 M MES (pH 6.0) 2.4 M Ammonium sulfate (Grid Screen Ammonium Sulfate # C3)	 30 mg/ml	1.8 M Sodium/Potassium Phosphate (pH 8.2) (SaltRX # 58)

## 5-3-6. IC177 株由来 CARDO-F の構造

### 5-3-6-1. 全体構造

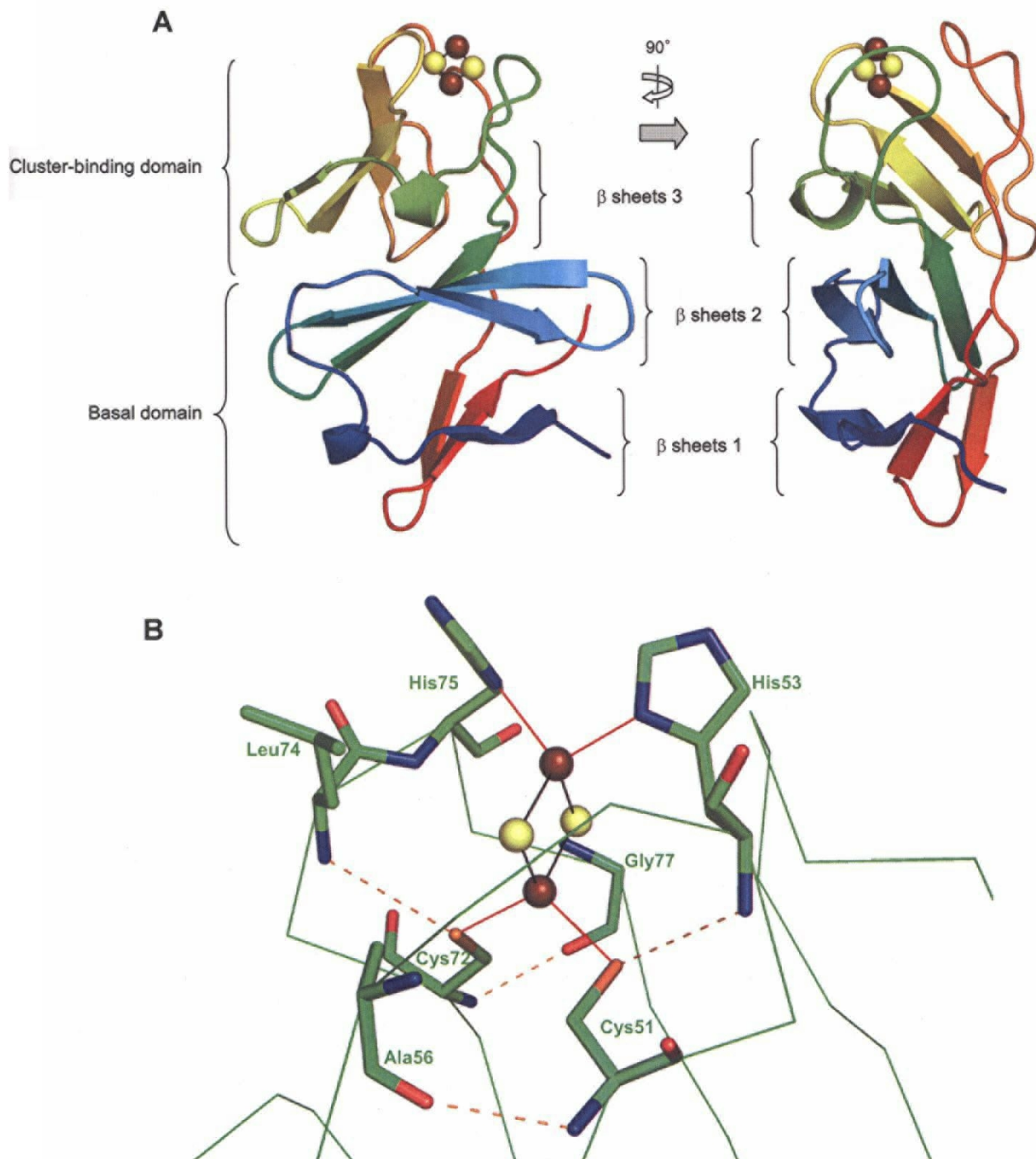
CARDO-F<sub>IC177</sub> は全体で  $25 \times 30 \times 45 \text{ \AA}$  程度で、3 つの逆平行 $\beta$ シートで構成されており(Fig. 5-6A)、この特徴は、これまでに立体構造が報告されている他の Rieske-type [2Fe-2S]を持つ電子伝達タンパク質、CARDO-F<sub>CA10</sub> [Nam et al., 2005]、BDO-F<sub>LB400</sub> [Colbert et al., 2000]、*Pseudomonas mendocina* KR1 株由来 toluene 4-monooxygenase の T4moC [Moe et al., 2006]、ミトコンドリアの呼吸鎖 *bc*<sub>1</sub> [Iwata et al., 1996]、光合成系の *b<sub>6</sub>f* [Carrell et al., 1997]、*Thermus thermophilus* の Rieske protein [Hunsicker-Wang et al., 2003]にも保存されている。BDO-F<sub>LB400</sub> の報告に従うと、CARDO-F<sub>IC177</sub> の立体構造は、basal domain (1-49 と 96-116 番目のアミノ酸残基)と cluster-binding domain (50-95 番目のアミノ酸残基)の 2 つのドメインに分けることができた。Basal domain は 2 つの逆平行 $\beta$ シートから構成されていた(Fig. 5-6;  $\beta$  sheets 1、2)。Cluster-binding domain は 1 つの逆平行 $\beta$ シートと 2 つの loop から成り、その loop に挟まれるように Rieske [2Fe-2S] cluster が存在した(Fig. 5-6)。

### 5-3-6-2. Rieske cluster

Rieske [2Fe-2S] cluster は CARDO-F 分子の端から飛び出たような位置にあり、溶媒側の Fe 原子には His53 と His75 の N <sup>$\delta$ 1</sup> 原子が配位していた(Fig. 5-6B)。一方、分子の内側にある Fe 原子は Cys51 と Cys72 の S <sup>$\gamma$</sup> 原子に配位していた(Fig. 5-6B)。5-3-3-4 で述べたように、酸化還元中心の [2Fe-2S]を構成するアミノ酸残基とその周辺の水素結合は酸化還元電位を決める重大な要因であると考えられている。そこで、CARDO-F<sub>IC177</sub>における Rieske [2Fe-2S] cluster 周辺の水素結合を調べたところ、Cys51 と Cys72 の S <sup>$\gamma$</sup> 原子は、それぞれ His53 と Leu74 の主鎖の N 原子と水素結合を形成していた。また、Cys51 と Cys72 の主鎖の N 原子が、それぞれ Ala56 と Gly77 の主鎖の O 原子と水素結合を形成しているのが観察された。CARDO-F<sub>IC177</sub>における [2Fe-2S] cluster 周辺の水素結合と同様の水素結合は CARDO-F<sub>CA10</sub> でも観察されており、各々の酸化還元電位が -185 mV (本論文 4-3-6)、-169 mV [Nam et al., 2005]と機能に影響がでるほど大きな違いがなかった理由である可能性が考えられた。興味深いことに、IC177 株と同じ class IIB に分類される ROS の 1 つ BDO における BDO-F<sub>LB400</sub> ではそれら水素結合に違いがあり、LB400 株における Gly68 の主鎖の N 原子は [2Fe-2S] cluster の S 原子と水素結合を形成しているが[Colbert et al., 2000]、IC177 株や CA10 株の CARDO-F にはそれに相当するような水素結合は観察されなかった[Nam et al., 2005]。つまり、class IIB に分類される IC177 株の CARDO における ferredoxin コンポーネントは、class IIB のものよりも class III (CA10 の CARDO が属する)に類似した立体構造上の特徴を有していた。

### 5-3-6-3. CARDO-O との結合部分の推定

CARDO-O<sub>J3</sub> と CARDO-F<sub>CA10</sub> の複合体の立体構造情報を基に、IC177 株の CARDO-F の構造上どの部分が CARDO-O との結合に関与するのかを推定した。5-3-3-7 同様、CA10 株と IC177 株の CARDO-F のアミノ酸配列のアライメント解析(Fig. 3-3)から CARDO-O との結合に関与するアミノ酸残基が IC177 株の CARDO-F のどのアミノ酸残基にあたるかを割り出した。CARDO-F<sub>CA10</sub> においては、相互作用に関与するアミノ酸残基は 7 残基見いだされている(Fig. 3-3 背景が黄色の残基; [Ashikawa et al., 2006])。静電的相互作用により塩橋・水素結合を形成する Glu43、Glu55、

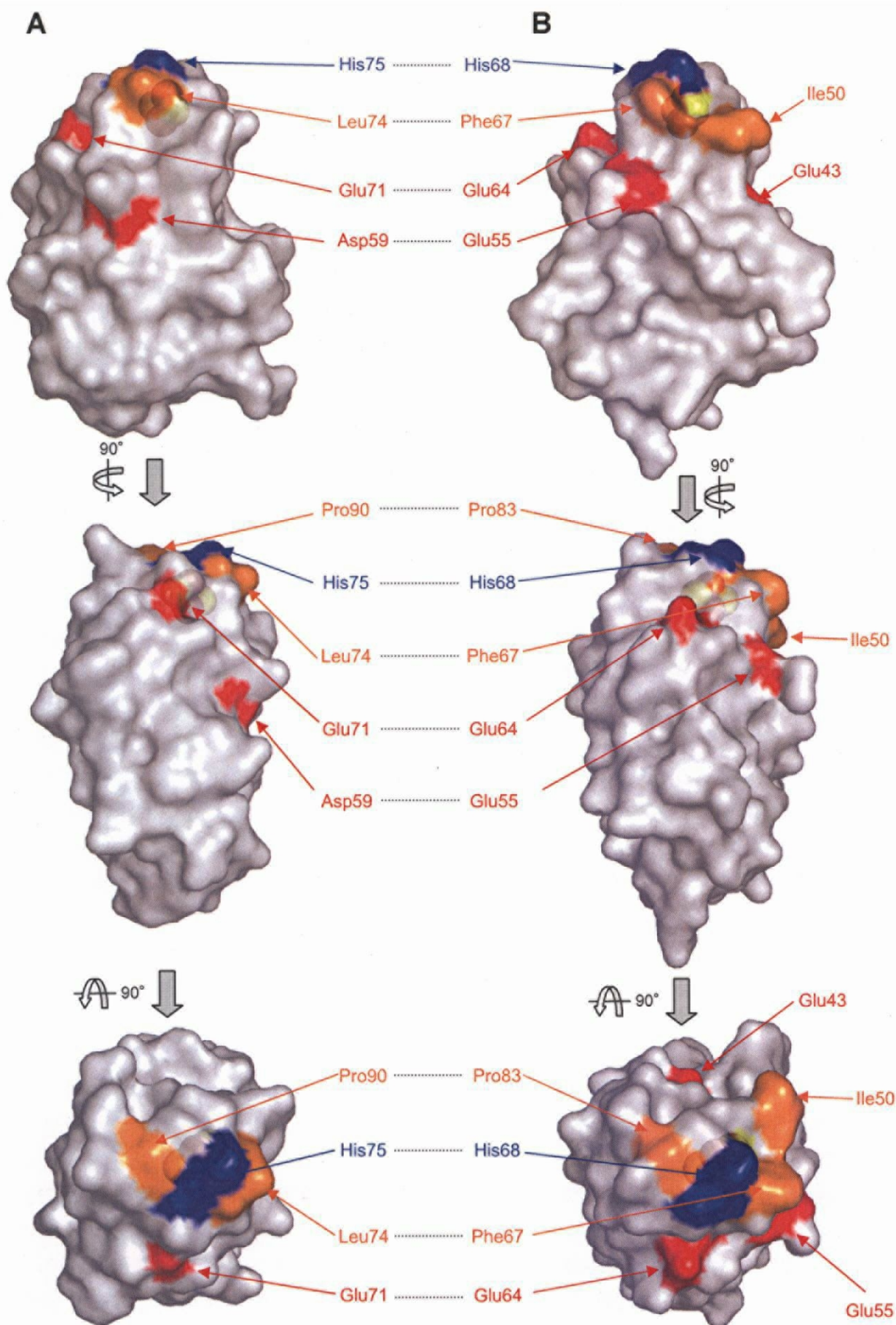


**Figure 5-6.** CARDO-F<sub>IC177</sub>の立体構造。鉄原子、硫黄原子はそれぞれ茶、黄色の球、アミノ酸のN、O、S原子はそれぞれ青、赤、橙で示した。(A)CARDO-Fの全体構造。Cluster-binding domainとbasal domainで構成される。(B)CARDO-F<sub>IC177</sub>のRieske [2Fe-2S] clusterに配位しているアミノ酸残基とその周辺の水素結合。

Glu64、及び、His68 (それぞれ CARD-O<sub>J3</sub> の Arg118、Arg210、Lys13、及び、Glu353 と静電的相互作用をする)、疎水的相互作用をする Ile50、Phe67、及び、Pro83 の 7 残基である。CARD-O<sub>IC177</sub> においてこれらのアミノ酸残基に相当する残基をアライメント解析から調べたところ(Fig. 3-3)、CARD-O<sub>CA10</sub> の Glu43 に相当する酸性アミノ酸残基、Ile50 に相当する疎水性アミノ酸残基は見いだされなかったが、CARD-O<sub>CA10</sub> の Glu55、Glu64、His68、Phe67、及び、Pro83 は CARD-O<sub>IC177</sub> の Asp59、Glu71、His75、Leu74、及び、Pro90 に相当すると考えられた(Fig. 3-3)。これらのアミノ酸残基が立体構造上どこに位置するのかを Fig. 5-7 に示した。アライメント解析で保存されていたアミノ酸残基同士は立体構造上でも比較的近い位置に存在していた。よって、仮に CARD-O と CARD-F が class III 型のものと同様の位置と向きで結合するならば、CARD-F と CARD-O 間の特異性を決定するアミノ酸残基は保存性の低かったアミノ酸残基 (CARD-O<sub>CA10</sub> における Glu43 と Ile50)の可能性が考えられる。ただし、5-3-3-7 で考察した CARD-O<sub>J3</sub> の Arg210 と静電的相互作用をする CARD-O<sub>CA10</sub> の Glu55 は、CARD-O<sub>IC177</sub> では Asp59 に相当し、立体構造上の位置も比較的近い(Fig. 5-7)。今後、CARD-O<sub>IC177</sub> と CARD-F<sub>IC177</sub> 間の結合に関与するアミノ酸のより確からしい推定を行うため、これら 2 つの立体構造を基にドッキングシミュレーションを行うか、これらの複合体の X 線結晶構造解析を行う必要がある。また、これらのアミノ酸残基に変異を導入した酵素の機能・構造を調べることで相互作用に必要な要因についての何らかの知見が得られるものと考えられる。

(本章の内容の一部は 2006 年 12 月に学術雑誌 *Acta Crystallographica section F* にて発表した [Inoue et al., 2006a])





**Figure 5-7.** CARD-OとCARD-F間の結合に関与するアミノ酸残基の位置の推定。静電的相互作用をすると思われるアミノ酸残基は青(塩基性アミノ酸残基)と赤(酸性アミノ酸残基)で、疎水性相互作用をすると思われるアミノ酸残基は橙色で示した。(A)CARD-O- $F_{IC177}$ におけるCARD-Oとの結合に関与すると推定されたアミノ酸残基に色を付けて示した。(B)CARD-O- $F_{CA10}$  (PDB ID:1VCK)においてJ3株CARD-Oとの結合に関与するアミノ酸残基(Ashikawaら[2006]に基づく)を(A)と同様の表示方法で示した。点線はアライメントしたときに対応するアミノ酸残基同士を示す。

## 第6章 総括と展望

本研究では、新規 **carbazole** 資化菌を単離し、それらが持つ **carbazole** 代謝系遺伝子・酵素の多様性と機能について解析を行った。

第2章では、**carbazole** 資化菌としては、これまでに報告例のない属種に分類される細菌を多数単離し、それらがもつ *car* 遺伝子について解析した。細菌が持つ難分解性芳香族化合物分解に関わる遺伝子は移動性遺伝因子上に存在することを示した報告例は多く、CA10 株、KA1 株においてもプラスミド上に *car* 遺伝子が存在する。プラスミドを介して様々な細菌に *car* 遺伝子が伝播し、**carbazole** 資化菌が広く分布したであろうことが予想され、実際に、2006 年までに世界中で単離されてきた **carbazole** 資化菌は総計でおよそ 50 株報告されているが、それらのうち **carbazole** 代謝系遺伝子について解析がなされたものにおいて、その殆どが CA10 株か KA1 株の *car* 遺伝子と高い相同性を有するものである。そのような状況の中で、当時、唯一の **carbazole** 資化性グラム陽性細菌として IC177 株が単離されたことは、**carbazole** 代謝系がグラム陽性細菌にも存在することを示しており、また、グラム陰性細菌と同様に、グラム陽性細菌においても同様の *car* 遺伝子が伝播している可能性を示していた。2006 年には、IC177 株とは別の *Gordonia* 属に分類される **carbazole** 資化菌 F.5.25.8 株が報告されたが[Santos et al., 2006]、この株をはじめ、他のグラム陽性細菌も IC177 株と同様の *car* 遺伝子群をもつのか興味をもたれる。我々の研究グループのものも含め、これまでに報告されてきた **carbazole** 代謝系遺伝子は全て単離された菌株に由来する。自然界の細菌は 99%以上が単離・培養が不可能で、Viable but Non-Culturable (VNC) という状態で存在している細菌が大多数であると言われている。したがって、今後さらに *car* 遺伝子群の自然界における多様性について明らかにするためには、それら VNC 状態の細菌を含む細菌全体の **carbazole** 代謝系について解析する必要があると考えられる。現在、多数の単離された菌株のゲノム解析が行われており、同様に、莫大な数のメタゲノム(土や海水など自然界のサンプルから直接抽出した DNA に含まれる遺伝子の総称)の塩基配列が決定され、データベースに情報が蓄積している。今後それらの中からも新規な **carbazole** 代謝系遺伝子が見いだされることが期待される。

本論文第3章では、*Nocardioides aromaticivorans* IC177 株の *car* 遺伝子群を明らかにし、今まで未解明であったグラム陽性細菌の **carbazole** 代謝系を明らかにした。明らかになった **carbazole** 代謝経路はグラム陰性細菌のそれと同様であった。これは、上記のように *car* 遺伝子が移動性遺伝因子上に存在し、グラム陽性細菌にまで及んだとも考えられるが、その遺伝子の並びや遺伝子間領域の長さには大きな違いが見いだされ、IC177 株由来の *car* 遺伝子群はグラム陽性細菌独自の進化の歴史を歩んできたこと示していた。また、グラム陰性細菌とは異なり、IC177 株の *car* 遺伝子周辺には多くの転写制御因子様の遺伝子が見いだされた。それらが全て **carbazole** 代謝に関与しているかどうかは不明である。IC177 株は貧栄養状態と富栄養状態では、形態が異なり、コロニーの形状に違いが観察できたことから、IC177 株は形態の変化を伴うような複数の階層化された遺伝子制御システムを持つことが考えられた。今後、栄養状態の変化に伴う IC177 株の *car* 遺伝子群の転写制御を詳細に解析することでそれらの詳細が明らかになるものと考えられる。IC177 株の CARDO はこれまで機能解析されてきた CARDO では報告例のない class IIB に分類される新規な CARDO であった。ROS に分類される酵素のうち、terminal oxygenase 同士の相同性が高く、同じ化合物を基質とするものの多くは、ROS の分類において同じ class に属する。それ

に対し、CARDO は CA10/J3 株、KA1 株、IC177 株はそれぞれ class III、IIA、IIB に分類される CARDO を持ち、自然界には電子伝達コンポーネントのタイプが異なる多様な CARDO が存在することが明らかになった。CARDO が持つこの特徴は、CARDO が 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考えられた。そこで、CA10/J3 株、KA1 株について研究を含めた CARDO の電子伝達メカニズムの解明を目的とした研究の一環として、本研究では、IC177 株の CARDO について、より詳細な研究を行うこととした。

第 4 章では、IC177 株の各 CARDO コンポーネントを精製し、CARDO の再構成系にて、別のクラスに分類される class III 型 (CA10/J3 株由来) の CARDO との電子伝達コンポーネントの互換性を解析した。結果、ferredoxin CARDO-F と ferredoxin reductase CARDO-R 間での互換性があり、電子の伝達が行われたのに対し、terminal oxygenase CARDO-O と CARDO-F 間での互換性は殆ど認められず、本来のもの同士での高い特異性が存在することを明らかにした。生体内タンパク質間での電子伝達の可否を決める要因として、タンパク質同士の親和性などに基づく相互作用の有無と各電子伝達タンパク質の酸化還元電位が考えられる。今後、タンパク質間の親和性を調べるための動力的解析、コンポーネント間の親和性の解析 (BIACORE、isothermal titration calorimetry など)、CARDO-F 以外のコンポーネントについて cyclic voltammetry を用いて酸化還元電位を測定するなどを行う必要がある。また、KA1 株由来の各 CARDO コンポーネントとの互換性の解析や、5 章で示唆された電子伝達に関与すると考えられたアミノ酸残基に変異を導入した酵素を用いて解析することでも、電子伝達メカニズムを解明するうえで重要な知見が得られるものと考えられる。

第 5 章では IC177 株由来の CARDO-O と CARDO-F の立体構造を明らかにし、既知の立体構造との比較を行った。Class III 型の CARDO-O と CARDO-F の複合体の構造情報から、IC177 株の CARDO-O と CARDO-F 間の相互作用に関与するアミノ酸残基を推定した。今後、まずは IC177 株由来の CARDO-O と CARDO-F の立体構造を用いたドッキングシミュレーションを行うことで、より確からしい推定を行う必要がある。また、class III 型の CARDO-O と CARDO-F の複合体の構造とそれぞれの単体の構造とを比較したとき、それらでダイナミックな構造の変化が観察された。そのような構造変化が複合体形成に重要な意味があることに疑いない。したがって、IC177 株の CARDO-O と CARDO-F の複合体の立体構造解析も試みる必要がある。

ROS に分類される酵素には環境浄化や物質生産への応用に大きな期待が寄せられている。したがって、ROS の活性の駆動力である電子伝達に関する研究は、学術的な意義以外の価値もある研究である。それにも関わらず、これまでの電子伝達メカニズムに関する構造学的研究は、ミトコンドリアの呼吸鎖、光合成系、P450 などで行われているが、ROS に関しては本研究を除いて皆無と言える。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。

## 参考文献

- Arcos, J. C., M. F. Argus. 1968. Molecular geometry and carcinogenic activity of aromatic compounds. *New Perspect. Adv. Cancer Res.* 11:305-471.
- Ashikawa, Y., Z. Fujimoto, H. Noguchi, H. Habe, T. Omori, H. Yamane, H. Nojiri. 2005. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the electron-transfer complex between the terminal oxygenase component and ferredoxin in the Rieske non-heme iron oxygenase system carbazole 1,9a-dioxygenase. *Acta. Crystallogr.* F61:577-580.
- Ashikawa, Y., Z. Fujimoto, H. Noguchi, H. Habe, T. Omori, H. Yamane, H. Nojiri. 2006. Electron transfer complex formation between oxygenase and ferredoxin components in Rieske nonheme iron oxygenase system. *Structure* 14:1779-1789.
- Barriault, D., M. Sylvestre. 1999. Functionality of biphenyl 2,3-dioxygenase components in naphthalene 1,2-dioxygenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:592-597.
- Batie, C. J., D. P. Ballou, C. C. Correll. 1991. Phthalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur containing electron transferases. In *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* (Muller, F., ed.), vol. 3, pp. 543-556, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Beharry, Z. M., D. M. Eby, E. D. Coulter, R. Viswanathan, E. L. Neldle, R. S. Phillips, D. M. Kurtz Jr. 2003. Histidine ligand protonation and redox potential in the Rieske dioxygenases: role of a conserved aspartate in anthranilate 1,2-dioxygenase. *Biochemistry* 42:13625-13636.
- Benedik, M. J., P. R. Gibbs, R. R. Riddle, R. C. Willson. 1998. Microbial denitrogenation of fossil fuels. *Trends Biotechnol.* 16:390-395.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brünger A. D., P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve. 1998. Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* D54:905-921.
- Carredano, E., A. Karlsson, B. Kauppi, D. Choudhury, R. E. Parales, J. V. Parales, K. Lee, D. T. Gibson, H. Eklund, S. Ramaswamy. Substrate binding site of naphthalene 1,2-dioxygenase: functional implications of indole binding. *J. Mol. Biol.* 296:701-712.
- Castorena, G., V. Mugica, S. Le Borgne, M. E. Acuña, I. Bustos-Jaimes, J. Aburto. 2006. Carbazole biodegradation in gas oil/water biphasic media by a new isolated bacterium *Burkholderia* sp. strain IMP5GC. *J. Appl. Microbiol.* 100:739-745.
- Cho, Y. G., J. H. Yoon, Y. H. Park, S. T. Lee. 1998. Simultaneous degradation of *p*-nitrophenol and phenol by a newly isolated *Nocardioide* sp. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44, 303-309.
- Colbert, C. L., M. M. -J. Couture, L. D. Eltis, J. T. Bolin. 2000. A cluster exposed: structure of the Rieske ferredoxin from biphenyl dioxygenase and redox properties of Rieske Fe-S proteins. *Structure* 8:1267-1278.
- Collaborative Computational Project, Number 4. 1994. *Acta Cryst.* D54:905-921.
- Correll, C. C., C. J. Batie, D. P. Ballou, M. L. Ludwig. 1992. Phthalate dioxygenase reductase: a modular structure for electron transfer from pyridinenucleotides to [2Fe-2S]. *Science* 258:1604-1610.
- Couture, M. M. J., C. L. Colbert, E. Babini, F. I. Rosell, A. G. Mauk, J. T. Bolin, L. D. Eltis. 2001. Characterization of BphF, a Rieske-type ferredoxin with a low reduction potential. *Biochemistry* 40:84-92.
- Creaser, C. S., F. Krokos, K. E. O'Neill, M. J. C. Smith, P. G. McDowell. Selective chemical ionization of nitrogen and sulfur heterocycles in petroleum fractions by ion trap mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrometry* 4:322-326.
- DeLano, W. L. 2001. The PyMOL molecular graphics system (SanCarlos, CA: DeLano Scientific).
- Dong, X., S. Fushinobu, E. Fukuda, T. Terada, S. Nakamura, K. Shimizu, H. Nojiri, T. Omori, H. Shoun, T. Wakagi. 2005. Crystal structure of the terminal oxygenase component of cumene dioxygenase from *Pseudomonas fluorescens* IP01.



- Dutson, S., G. Booth, B. Scahaalje, R. Castle, R. Seegmiller.** 1997. Comparative developmental dermal toxicity and mutagenicity of carbazole and benzo carbazole. *Environ. Toxic. Chem.* 16:2113-2117.
- Ensley, B. D., B. J. Ratzkin, T. D. Osslund, M. J. Simon, L. P. Wackett, D.T. Gibson.** 1983. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science* 222:167-169.
- Erickson, B. D., F. J. Mondello.** 1992. Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400. *J. Bacteriol.* 174:2903-2912.
- Ferraro, D. J., L. Gakhar, S. Ramaswamy.** 2005. Rieske business: structure–function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338:175–190.
- Ferraro, D. J., L. Okerlund, J. C. Mowers, S. Ramaswamy.** 2006. Structural basis for regioselectivity and stereoselectivity of product formation by naphthalene 1,2-dioxygenase. *J. Bacteriol.* 188:6986-6994.
- Friemann, R., M. M. Ivkovic-Jensen, D. J. Lessner, C. –L. Yu, D. T. Gibson, R. E. Parales, H. Eklund, S. Ramaswamy.** 2005. Structural insight into the dioxygenation of nitroarene compounds: the crystal structure of nitrobenzene dioxygenase. *J. Mol. Biol.* 348:1139-1151.
- Fuenmayor, S. L., M. Wild, A. L. Boyes, P. A. Williams.** 1992. A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. *J. Bacteriol.* 180:2522-2530.
- Fukuda, M., Y. Yasukochi, Y. Kikuchi, Y. Nagata, K. Kimbara, H. Horiuchi, M. Takagi, K. Yano.** 1994. Identification of the *bphA* and *bphB* genes of *Pseudomonas* sp. strain KKS102 involved in degradation of biphenyl and polychlorinated biphenyls. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202:850-856.
- Furukawa, K., H. Suenaga, M. Goto.** 2004. Biphenyl dioxygenases: functional versatilities and directed evolution. *J. Bacteriol.* 186:5189-5196.
- Furukawa, K., T. Miyazaki.** 1986. Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* 166:392-398.
- Furusawa, Y., V. Nagarajan, M. Tanokura, E. Masai, M. Fukuda, T. Senda.** 2004. Crystal structure of the terminal oxygenase component of biphenyl dioxygenase derived from *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *J. Mol. Biol.* 341:1041-1052.
- Fuse, H., O. Takimura, K. Murakami, H. Inoue, Y. Yamaoka.** 2003. Degradation of chlorinated biphenyl, dibenzofuran, and dibenzo-*p*-dioxin by marine bacteria that degrade biphenyl, carbazole, or dibenzofuran. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67:1121-1125.
- Futamata, H., T. Uchida, N. Yoshida, Y. Yonemitsu, A. Hiraishi.** 2004. Distribution of dibenzofuran-degrading bacteria in soils polluted with different levels of polychlorinated dioxins. *Microbes Environ.* 19:172-177.
- Gakhar, L., Z. A. Malik, C. C. R. Allen, D. A. Lipscomb, M. J. Larkin, S. Ramaswamy.** 2005. Structure and increased thermostability of *Rhodococcus* sp. naphthalene 1,2-dioxygenase. *J. Bacteriol.* 187:7222-7231.
- Golovleva, L. A., R. N. Pertsova, L. I. Evtushenko, B. P. Baskunov.** 1990. Degradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by a *Nocardioideis simplex* culture. *Biodegradation* 1:263-271.
- Gibson, D. T., W. –K. Yeh, T. –N. Liu, V. Subramanian.** 1982. In *Oxygenase and Oxygen Metabolism* (Nozaki, M., S. Yamamoto, Y. Ishimura, M. J. Coon, L. Ernster, R. U. Estabrook, eds) pp. 51-62, Academic Press, New York
- Gieg, L. M., A. Otter, P. M. Fedorak.** 1996. Carbazole degradation by *Pseudomonas* sp. LD2: metabolic characteristics and the identification of some metabolites. *Environ. Sci. Technol.* 30:575-585.
- Grinberg, A. V., F. Hannemann, B. Schiffler, J. Müller, U. Heinemann, R. Bernhardt.** 2000. Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties. *Proteins* 40:590-612.

- Gunsalus, I. C., J. D. Lipscomb.** 1973. in Iron-sulfur proteins (Lovenberg, W. ed) Vol. 1, pp. 151-171. Academic Press, New York
- Habe, H., J. -S. Chung, J. -H. Lee, K. Kasuga, T. Yoshida, H. Nojiri, T. Omori.** 2001. Degradation of chlorinated dibenzofurans and debenzo-*p*-dioxins by two types of bacteria having angular dioxygenases with different features. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3610-3617.
- Habe, H., Y. Ashikawa, Y. Saiki, T. Yoshida, H. Nojiri, T. Omori.** 2002. *Sphingomonas* sp. strain KA1, carrying a carbazole dioxygenase gene homologue, degrades chlorinated dibenzo-*p*-dioxins in soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 211: 43-49.
- Habe, H., K. Morii, S. Fushinobu, J. -W. Nam, Y. Ayabe, T. Yoshida, T. Wakagi, H. Yamane, H. Nojiri, T. Omori.** 2003. Crystal structures of a histidine-tagged serine hydrolase involved in the carbazole degradation (CarC enzyme). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303:631-639.
- Haddock, J. D., D. T. Gibson.** 1995. Purification and characterization of the oxygenase component of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J. Bacteriol.* 177:5834-5839.
- Haddock, J. D., D. A. Pelletier, D. T. Gibson.** 1997. Purification and properties of ferredoxin<sub>BPH</sub>, a component of biphenyl 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:355-359.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- Hisatsuka, K., M. Sato.** 1994. Microbial transformation of carbazole to anthranilic acid by *Pseudomonas stutzeri*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58:213-214.
- Hoof, R. W. W., G. Vriend, C. Sander, E. E. Abola.** 1996. Errors in protein structures. *Nature* 381:272.
- Hsu, C. S., K. Qian, W. K. Robbins.** 1994. Nitrogen speciation of polar petroleum compounds by compound class separation and on-line liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). *J. High Res. Chromatogr.* 17:271-276.
- Hunsicker-Wang L. M., A. Heine, Y. Chen, E. P. Luna, T. Todaro, Y. M. Zhang, P. A. Williams, D. E. McRee, J. Hirst, C. D. Stout, J. A. Fee.** 2003. High-resolution structure of the soluble, respiratory-type Rieske protein from *Thermus thermophilus*: analysis and comparison. *Biochemistry* 42:7303-7317.
- Hurtubise, Y., D. Barriault, J. Powlowski, M. Sylvestre.** 1995. Purification and characterization of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase components. *J. Bacteriol.* 177:6610-6618.
- Hurtubise, Y., D. Barriault, M. Sylvestre.** 1996. Characterization of active recombinant his-tagged oxygenase component of *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 271:8152-8156.
- Imbeault, N. Y. R., J. B. Powlowski, C. L. Colbert, J. T. Bolin, L. D. Eltis.** 2000. Steady-state kinetic characterization and crystallization of a polychlorinated biphenyl-transforming dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 275:12430-12437.
- Inoue, K., Y. Ashikawa, Y. Usami, H. Noguchi, Z. Fujimoto, H. Yamane, H. Nojiri.** 2006a. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the terminal oxygenase component of carbazole 1,9a-dioxygenase from *Nocardioides aromaticivorans* IC177. *Acta Cryst.* F62:1212-1214.
- Inoue, K., H. Habe, H. Yamane, H. Nojiri.** 2006b. Characterization of novel carbazole catabolism genes from Gram-positive carbazole degrader *Nocardioides aromaticivorans* IC177. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3321-3329.
- Inoue, K., H. Habe, H. Yamane, T. Omori, H. Nojiri.** 2005. Diversity of carbazole-degrading bacteria having the *car* gene cluster: Isolation of a novel gram-positive carbazole-degrading bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 245:145-153.
- Inoue, K., J. Widada, S. Nakai, T. Endoh, M. Urata, Y. Ashikawa, M. Shintani, Y. Saiki, T. Yoshida, H. Habe, T. Omori, H. Nojiri.** 2004. Divergent structures of carbazole degradative *car* operons isolated from Gram-negative bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:1467-1480.
- Iwabuchi, T., Y. Inomata-Yamauchi, A. Katsuta, S. Harayama.** 1998. Isolation and characterization of marine *Nocardioides* capable of growing and degrading phenanthrene at 42°C. *J. Mar. Biotechnol.* 6:86-90.

- Iyer, L. M., E. V. Koonin, L. Aravind. 2001. Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 43:134-144.
- Karlsson, A., J. V. Parales, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund, S. Ramaswamy. 2003. Crystal structure of naphthalene dioxygenase: side-on binding of dioxygen to iron. *Science* 299:1039-1042.
- Karplus, P. A., G. E. Schulz. 1987. Refined structure of glutathione reductase at 1.54 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 195:701-729.
- Kasuga, K., H. Nojiri, H. Yamane, T. Kodama, T. Omori. 1997. Cloning and characterization of the genes involved in the degradation of dibenzofuran by *Terrabacter* sp. strain DBF63. *J. Ferment. Bioeng.* 84:387-399.
- Kauppi, B., K. Lee, E. Carredano, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund, S. Ramaswamy. 1998. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure* 6:571-586.
- Kikuchi, Y., Y. Yasukochi, Y. Nagata, M. Fukuda, M. Takagi. 1994. Nucleotide sequence and functional analysis of the *meta*-cleavage pathway involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Bacteriol.* 176:4269-4276.
- Kilbane II, J. J., A. Daram, J. Abbasian, K. J. Kayser. 2002. Isolation and characterization of *Sphingomonas* sp. GTIN11 capable of carbazole metabolism in petroleum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297:242-248.
- Kirimura, K., H. Nakagawa, H. Tsuji, K. Matsuda, R. Kurane, S. Usami. 1999. Selective and continuous degradation of carbazole contained in petroleum oil by resting cells of *Sphingomonas* sp. CDH-7. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:1563-1568.
- Masai, E., A. Yamada, J. M. Healy, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukuda, K. Yano. 1995. Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2079-2085.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Laredo, G., A. de Los Reyes, J. Cano, J. Castillo. 2001. Inhibition effects of nitrogen compounds on the hydro-desulfurization of dibenzothiophene. *Appl. Catal. A: Gen.* 207:103-112.
- Larkin, M. J., C. C. Allen, I. A. Kulakov, D. A. Lipscomb. 1999. Purification and characterization of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain NCIBM12038. *J. Bacteriol.* 181:6200-6204.
- Laskowski, R. A., M. W. MacArthur, D. S. Moss, J. M. Thornton. 1992. PROCHECK v.2: programs to check the stereochemical quality of protein structures, Oxford Molecular Ltd, Oxford, UK.
- Lau, P. C., H. Bergeron, D. Labbé, Y. Wang, R. Brousseau, D. T. Gibson. 1994. Sequence and expression of the *todGIH* genes involved in the last three steps of toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *Gene* 146:7-13.
- Li, L., P. Xu, H. D. Blankespoor. 2004. Degradation of carbazole in the presence of non-aqueous phase liquids by *Pseudomonas* sp. *Biotechnol. Lett.* 26:581-584.
- Lovenberg, W., B. B. Buchanan, J. C. Rabinowitz. 1963. Studies on the chemical nature of clostridial ferredoxin. *J. Biol. Chem.* 238:3899-3913.
- MacCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, L. C. Storoni, R. J. Read. 2005. Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Cryst.* D61:458-464.
- Maeda, K., H. Nojiri, M. Shintani, T. Yoshida, H. Habe, T. Omori. 2003. Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *J. Mol. Biol.* 326:21-33.
- Manjasetty, B. A., J. Powlowski, A. Vrielink. 2003. Crystal structure of a bifunctional aldolase-dehydrogenase: sequestering a reactive and volatile intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:6992-6997.

- Martins, B. M., T. Svetlitchnaja, H. Dobbek.** 2005. 2-Oxoquinoline 8-monooxygenase oxygenase component: active site modulation by Rieske-[2Fe-2S] center oxidation/reduction. *Structure* 13:817-824.
- Masai, E., K. Sugiyama, N. Iwashita, S. Shimizu, J. E. Hauschild, T. Hatta, K. Kimbara, K. Yano, M. Fukuda.** 1997. The *bphDEF* meta-cleavage pathway genes involved in biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation are located on a linear plasmid and separated from the initial *bphACB* genes in *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Gene* 187:141–149.
- Masai, E., A. Yamada, J. M. Healy, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukuda, K. Yano.** 1995. Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2079-2085.
- Matsubara, H., M. R. M. Sasaki, R. K. Chain.** 1968. Spinach ferredoxin. *J. Biol. Chem.* 243:1725-1731.
- Matthews B. W.** 1968. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33:491-497.
- Maté, M. J., M. Ortiz-Lombardía, B. Boitel, A. Haouz, D. Tello, S. A. Susin, J. Penninger, G. Kroemer, P. M. Alzari.** 2002. The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nat. Struct. Biol.* 9:442-446.
- McRee, D. E.** 1999. XtalView/Xfit- a versatile program for manipulating atomic coordinate and electron density. *J. Struct. Biol.* 125:156-165.
- Miyakoshi, M., M. Urata, H. Habe, T. Omori, H. Yamane, H. Nojiri.** 2006. Differentiation of carbazole catabolic operons by replacement of the regulated promoter via transposition of an insertion sequence. *J. Biol. Chem.* 281:8450-8457.
- Murshudov, G. N., A. A. Vagin, E. J. Dodson.** 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst.* D53:240-255.
- Mushrush, G. W., E. J. Beal, D. R. Hardy, J. M. Hughes.** 1999. Nitrogen compound distribution in middle distillate fuels derived from petroleum, oil shale, and tar sand sources. *Fuel Process. Technol.* 61:197–210.
- Nandhagopal, N., A. Yamada, T. Hatta, E. Masai, M. Fukuda, Y. Mitsui, T. Senda.** 2001. Crystal structure of 2-hydroxy-6-oxo-6-phenyl-hexa-2,4-dienoic acid (HOPDA) hydrolase (BphD enzyme) from the *Rhodococcus* sp. strain RHA1 of the PCB degradation pathway. *J. Mol. Biol.* 309:1139-1151.
- Nam, J. -W., H. Nojiri, H. Noguchi, H. Uchimura, T. Yoshida, H. Habe, H. Yamane, T. Omori.** 2002. Purification and characterization of carbazole 1,9a-dioxygenase, a three-component dioxygenase system of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5882-5890.
- Nam, J. -W., H. Noguchi, Z. Fujimoto, H. Mizuno, Y. Ashikawa, M. Abo, S. Fushinobu, N. Kobashi, T. Wakagi, K. Iwata, T. Yoshida, H. Habe, H. Yamane, T. Omori, H. Nojiri.** 2005. Crystal structure of the ferredoxin component of carbazole 1,9a-dioxygenase of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10, a novel Rieske non-heme iron oxygenase system. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 58:779-789.
- Nojiri, H., J.-W. Nam, M. Kosaka, K. Morii, T. Takemura, K. Furihata, H. Yamane, T. Omori.** 1999. Diverse oxygenations catalyzed by carbazole 1,9a-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* 181:3105-3113.
- Nojiri, H., Y. Ashikawa, H. Noguchi, J. -W. Nam, M. Urata, Z. Fujimoto, H. Uchimura, T. Terada, S. Nakamura, K. Shimizu, T. Yoshida, H. Habe, T. Omori.** 2005. Structure of the terminal oxygenase component of angular dioxygenase, carbazole 1,9a-dioxygenase. *J. Mol. Biol.* 351:355–370.
- Nojiri, H., H. Sekiguchi, K. Maeda, M. Urata, S. Nakai, T. Yoshida, H. Habe, T. Omori.** 2001. Genetic characterization and evolutionary implications of a *car* gene cluster in the carbazole degrader *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* 183:3663-3679.
- Nojiri, H., T. Omori.** 2002. Molecular bases of aerobic bacterial degradation of dioxins: involvement of angular dioxygenation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:2001-2016.
- Nojiri, H., K. Maeda, H. Sekiguchi, M. Urata, M. Shintani, T. Yoshida, H. Habe, T. Omori.** 2002. Organization and transcriptional characterization of catechol degradation genes involved in carbazole degradation by *Pseudomonas resinovorans*

strain CA10. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:897-901.

Nojiri, H., M. Shintani, T. Omori. 2004. Divergence of mobile genetic elements involved in the distribution of xenobiotic-catabolic capacity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:154-174.

Omura T., E. Sanders, R. W. Estabrook, D. Y. Cooper, O. Rosenthal. 1966. Isolation from adrenal cortex of a nonheme iron protein and a flavoprotein functional as a reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome P-450 reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 117:660-673.

Otwinowski, Z., W. Minor. 1997. Processing of X-ray diffraction data collection in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276:307-326.

Ouchiyama, N., Y. Zhang, T. Omori, T. Kodama. 1993. Biodegradation of carbazole by *Pseudomonas* spp. CA06 and CA10. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57:455-460.

Ouchiyama, N., S. Miyachi, T. Omori. 1998. Cloning and nucleotide sequence of carbazole catabolic genes from *Pseudomonas stutzeri* strain OM1, isolated from activated sludge. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44:57-63.

Page, R. D. M. 1996. Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12:357-358.

Parales, R. E. 2003. The role of active-site residues in naphthalene dioxygenase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30:271-278.

Parales, R. E., R. Huang, C. -L. Yu, J. V. Parales, F. K. N. Lee, D. J. Lessner, M. M. Ivkovic-Jensen, W. Liu, R. Friemann, S. Ramaswamy, D. T. Gibson. 2005. Purification, characterization, and crystallization of the components of the nitrobenzene and 2-nitrotoluene dioxygenase enzyme system. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3806-3814.

Parales, R. E., K. Lee, S. M. Rensick, H. Jiang, D. J. Lessner, D. T. Gibson. 2000. Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: effect of specific amino acids at the active site of the enzyme. *J. Bacteriol.* 182:1641-1649.

Parales, R. E., J. V. Parales, D. T. Gibson. 1999. Aspartate 205 in the catalytic domain of naphthalene dioxygenase is essential for activity. *J. Bacteriol.* 181:1831-1837.

Perrakis, A., R. Morris, V. S. Lamzin. 1999. Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat. Struct. Biol.* 6:458-463.

Pflugrath, J. W. 1999. The finer things in X-ray diffraction data collection. *Acta Cryst.* D55:1718-1725.

Polz, M. F., C. M. Cavanaugh. 1998. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3724-3730.

Pinyakong, O., H. Habe, T. Yoshida, H. Nojiri, T. Omori. 2003. Identification of three novel salicylate 1-hydroxylases involved in the phenanthrene degradation of *Sphingomonas* sp. strain P2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301:350-357.

Pruzinska, A., G. Tanner, I. Anders, M. Roca, S. Hortensieiner. 2003. Chlorophyll breakdown: pheophorbide *a* oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:15259-15264.

Rajan, J., K. Valli, R. E. Perkins, F. S. Sariaslani, S. M. Barns, A. L. Reysenbach, S. Rehm, M. Ehringer, N. R. Pace. 1996. Mineralization of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid): characterization and phylogenetic identification of microbial strains. *J. Ind. Microbiol.* 16:319-324.

Riddle, R. R., P. R. Gibbs, R. C. Willson, M. J. Benedik. 2003. Recombinant carbazole-degrading strains for enhanced petroleum processing. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30:6-12.

Riedel, A., S. Fetzner, M. Rampp, F. Lingens, U. Liebl, J. L. Zimmermann, W. Nitschke. 1995. EPR, electron spin-echo envelope modulation, and electron nuclear double resonance studies of the 2Fe<sub>2</sub>S centers of the 2-halobenzoate 1,2-dioxygenase from *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* 2CBS. *J. Biol. Chem.* 270:30869-30873.

Rieske, J. S., D.H. MacLennan, R. Coleman. 1964. Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrome C reductase complex of the respiratory chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15:338-344.

- Romanowski, M. J., R. E. Soccio, J. L. Breslow, S. K. Burley. 2002. Crystal structure of the *Mus musculus* cholesterol-regulated START protein 4 (StarD4) containing a StAR-related lipid transfer domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:6949-6954.
- Romine, M. F., L. C. Stillwell, K. -K. Wong, S. J. Thurston, E. C. Sisk, C. Sensen, T. Gaasterland, J. K. Fredrickson, J. D. Saffer. 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J. Bacteriol.* 181:1585-1602.
- Rosche, B., S. Fetzner, F. Lingens, W. Nitschke, A. Riedel. 1995. The 2Fe2S centers of the 2-oxo-1,2-dihydroquinoline 8-monooxygenase from *Pseudomonas putida* 86 studied by EPR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1252:177-179.
- Sambrook, J., D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Santos, S. C. C., D. S. Alviano, C. S. Alviano, M. Pádula, A. C. Leitão, O. B. Martins, C. M. S. Ribeiro, M. Y. M. Sasaki, C. P. S. Matta, J. Bevilacqua, G. V. Sebastián, L. Seldin. 2006. Characterization of *Gordonia* sp. strain F.5.25.8 capable of dibenzothiophene disulfurization and carbazole utilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:355-362.
- Sato, S., J. -W. Nam, K. Kasuga, H. Nojiri, H. Yamane, T. Omori. 1997a. Identification and characterization of genes encoding carbazole 1,9a-dioxygenase in *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* 179:4850-4858.
- Sato, S., N. Ouchiya, T. Kimura, H. Nojiri, H. Yamane, T. Omori. 1997b. Cloning of genes involved in carbazole degradation of *Pseudomonas* sp. strain CA10: nucleotide sequences of genes and characterization of *meta*-cleavage enzymes and hydrolase. *J. Bacteriol.* 179:4841-4849.
- Schagger, H., G. V. Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:368-379.
- Schneider, J., R. J. Grosser, K. Jayasimhulu, W. Xue, B. Kinkle, D. Warshawsky. 2000. Biodegradation of carbazole by *Ralstonia* sp. RJGII. 123 isolated from a hydrocarbon contaminated soil. *Can. J. Microbiol.* 46:269-277.
- Schulz, G. E., R. H. Schirmer, W. Sachsenheimer, E. F. Pai. 1978. The structure of the flavoenzyme glutathione reductase. *Nature* 273:120-124.
- Senda, T., T. Yamada, N. Sakurai, M. Kubota, T. Nishizaki, E. Masai, M. Fukuda, Y. Mistui. 2000. Crystal structure of NADH-dependent ferredoxin reductase component in biphenyl dioxygenase. *J. Mol. Biol.* 304:397-410.
- Shepherd, J. M., G. Lloyd-Jones. 1998. Novel carbazole degradation genes of *Sphingomonas* CB3: Sequence analysis, transcription, and molecular ecology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247:129-135.
- Shine, J., L. Dalgarno. 1975. Determination of cistron specificity in bacteria ribosomes. *Nature* 254:34-38.
- Shingler, V., J. Powlowski, U. Marklund. 1992. Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* 174:711-724.
- Shintani, M., T. Yoshida, H. Habe, T. Omori, H. Nojiri. 2005. Large plasmid pCAR2 and class II transposon Tn4676 are functional mobile genetic elements to distribute the carbazole/dioxin-degradative *car* gene cluster in different bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:370-382.
- Shintani, M., H. Nojiri, T. Yoshida, H. Habe, T. Omori. 2003. Carbazole/dioxin-degrading *car* gene cluster is located on the chromosome of *Pseudomonas stutzeri* strain OM1 in a form different from the simple transposition of Tn4676. *Biotechnol. Lett.* 25:1255-1261..
- Shintani, M., M. Urata, K. Inoue, K. Eto, H. Habe, T. Omori, H. Yamane, H. Nojiri. in press. The *Sphingomonas* plasmid pCAR3 is involved in complete mineralization of carbazole. *J. Bacteriol.* 189:2007-2020.
- Simon, M. J., T. D. Osslund, R. Saunders, B. D. Ensley, S. Suggs, A. Harcourt, W. -C. Suen, D. L. Cruden, D. T. Gibson, G. J. Zylstra. 1993. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB9816-4. *Gene* 127:31-37.

- Subraminian, V., T. -N. Liu, W. -K. Yeh, M. Narro, D. T. Gibson. 1981. Purification and properties of NADH-Ferredoxin<sub>TOL</sub> reductase. J. Biol. Chem. 256:2723-2730.
- Subraminian, V., T. -N. Liu, W. -K. Yeh, C. M. Serdar, L. P. Wackett, D. T. Gibson. 1985. Purification and properties of Ferredoxin<sub>TOL</sub>. J. Biol. Chem. 260:2355-2363.
- Suenaga, H., M. Sato, M. Goto, M. Takeshita, K. Furukawa. 2006. Steady-state kinetic characterization of evolved biphenyl dioxygenase, which acquired novel degradation ability for benzene and toluene. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70:1021-1025.
- Sylvestre, M., M. Sirois, Y. Hurtubise, J. Bergeron, D. Ahmad, F. Shareck, D. Barriault, I. Guillemette, J. M. Juteau. 1996. Sequencing of *Comamonas testosteroni* strain B-356-biphenyl/chlorobiphenyl dioxygenase genes: evolutionary relationships among Gram-negative bacterial biphenyl dioxygenases. Gene 174:195-202.
- Takagi, T., H. Nojiri, T. Yoshida, H. Habe, T. Omori. 2002. Detailed comparison between the substrate specificities of two angular dioxygenases, dibenzofuran 4,4a-dioxygenase from *Terrabacter* sp. and carbazole 1,9a-dioxygenase from *Pseudomonas resinovorans*. Biotechnol. Lett. 24:2099-2106.
- Tan, H. -M. 1999. Bacterial catabolic transposons. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51:1-12.
- Tanaka, A., H. Ito, R. Tanaka, N. K. Tanaka, K. Yoshida, K. Okada. 1998. Chlorophyll *a* oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll *b* formation from chlorophyll *a*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:12719-12723.
- Tarasev, M., A. Pinto, D. Kim, S. J. Elliott, D. P. Ballou. 2006. The "bridging" aspartate 178 in phthalate dioxygenase facilitates interactions between the Rieske center and the iron (II) - mononuclear center. Biochemistry 45:10208-10216.
- Tropel, D., J. R. van der Meer. 2004. Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63:474-500.
- Tsuda, M., H. -M. Tan, A. Nishi, K. Furukawa. 1999. Mobile catabolic genes in bacteria. J. Biosci. Bioeng. 87:401-410.
- Tsujishita, Y., J. H. Hurley. 2000. Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. Nat. Struct. Biol. 7:408-414.
- van der Meer, J. R., W. M. de Vos, S. Harayama, A. J. B. Zehnder. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. Microbiol. Rev. 56:677-694.
- Wolfe, M. D., J. V. Parales, D. T. Gibson, J. D. Lipscomb. 2001. Single turnover chemistry and regulation of O<sub>2</sub> activation by the oxygenase component of naphthalene 1,2-dioxygenase. J. Biol. Chem. 276:1945-1953.
- Wolfe, M. D., J. D. Lipscomb. 2003. Hydrogen peroxide-coupled *cis*-diol formation catalyzed by naphthalene 1,2-dioxygenase. J. Biol. Chem. 278:829-835.
- Wyndham, R. C., A. E. Cashore, C. H. Nakatsu, M. C. Peel. 1994. Catabolic transposons. Biodegradation 5:323-342.
- Yoder, M. D., L. M. Thomas, J. M. Tremblay, R. L. Oliver, L. R. Yarbrough, G. M. Helmkamp Jr. 2001. Structure of a multifunctional protein. Mammalian phosphatidylinositol transfer protein complexed with phosphatidylcholine. J. Biol. Chem. 276:9246-9252.
- Yoon, B. -J., D. -H. Lee, Y. -S. Kang, D. -C. Oh, S. -I. Kim, K. -H. Oh, H. -Y. Kahng. 2002. Evaluation of carbazole degradation by *Pseudomonas rhodesiae* strain KK1 isolated from soil contaminated with coal tar. J. Basic Microbiol. 42:434-443.
- Yu, B., P. Xu, S. Zhu, X. Cai, Y. Wang, L. Li, F. Li, X. Liu, C. Ma. 2006. Selective biodegradation of S and N heterocycles by a recombinant *Rhodococcus erythropolis* strain containing carbazole dioxygenase. Appl. Environ. Microbiol. 72:2235-2238.

---

芦川雄二, 平成 17 年度, 東京大学博士論文

宇佐美裕亮, 本年度, 東京大学博士論文

東京大学医科学研究所制癌研究部編, 1993 年, 細胞工学実験プロトコール, 秀潤社.



## 謝辞

本修士論文研究の遂行にあたり、多くの方々からご指導、ご協力を賜りました。厚く御礼申し上げます。

素晴らしい研究の場を与えてくださると共に、懇切丁寧なご指導ご鞭撻、暖かいご配慮を賜りました、東京大学生物生産工学研究センター環境保全工学部門教授 山根久和先生に深く感謝いたします。

学部4年次から修士1年までの2年間、懇切丁寧なご指導ご鞭撻をいただきました、芝浦工業大学大学院教授 大森俊雄先生に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、直接ご指導頂き、終始厳しいご指導と御教示、暖かいご配慮を賜りました東京大学生物生産工学研究センター環境保全工学部門助教授 野尻秀昭先生に心より感謝いたします。

研究生活全般に渡り、活発な議論、適切な御助言を頂きました同センター環境保全部門助手 岡田憲典先生、産業技術総合研究所環境化学技術研究部門 羽部浩博士に厚く御礼申し上げます。

土壌や活性汚泥など、貴重なサンプルの提供を賜りました秋田県立大学助手 春日和先生、アサヒビール未来技術研究所 斎木祐子博士、産業技術総合研究所海洋資源環境研究部門 布施博之先生に深く感謝いたします。

菌株の単離や基本的な実験技術についての懇切丁寧な御指導と適切な御助言を賜りましたガドジャンマダ大学ウィダダ ジャカ博士、カリフォルニア大学サンフランシスコ校博士研究員 遠藤隆主博士、サッポロビール株式会社 中井誠一郎氏に深く感謝いたします。

酵素の酸化還元電位の測定を行うにあたり、快く機器類を使用させて頂き、また、それらの取り扱い方、測定条件の検討など実験についての懇切丁寧な御指導と貴重な御助言を頂きました東京大学農学生命科学研究科講師 安保充先生に深く感謝いたします。

X線結晶構造解析を行うにあたり、解析のご指導と貴重な御助言を頂きました独立行政法人農業生物資源研究所 藤本瑞博士に深く感謝いたします。

本研究の共同研究者であり、日々の親身な御助言、御協力を頂きました野口治子博士、浦田雅章博士、芦川雄二博士、宇佐美裕亮氏、香月隼一氏、梅田隆志氏に深く感謝いたします。

日々の生活の中で、熱心な御指導、有益な御助言、御協力、励ましの言葉を頂きました内田英二博士、新谷政己博士、同期の岡田敦氏、宮腰昌利氏をはじめとする環境保全工学研究室の皆様、及び、卒業生の方々に深く感謝いたします。

本研究遂行にあたり、研究生活における経済面からの御支援を賜りました日本学術振興会に深く感謝いたします。

最後に、本研究を進めるにあたり常に暖かく見守り、励ましてくれた妻 真穂、両親をはじめ家族にこの論文を捧げます。

2007年1月 井上 謙吾