

芳香環二水酸化酵素の電子伝達機構の解明

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 21 年度進学 梅田 隆志
指 導 教 員 山根 久和

目次

目次	i
略語表	iii
論文の内容の要旨	v
第一章 序論	1
第二章 CARDO コンポーネントの機能解析	21
2-1. 緒言	21
2-2. 結果と考察	21
2-2-1. Fd _{IIA} の基礎的な解析	21
2-2-1-1. Fd _{IIA} 発現用プラスミドの構築	21
2-2-1-2. Fd _{IIA} の精製	21
2-2-1-3. Fd _{IIA} の吸光スペクトル	21
2-2-2. Fd _{IIA} の酸化還元電位の測定	21
2-2-3. Fd _{IIA} の結晶構造解析	27
2-2-3-1. Fd _{IIA} の好気条件下における結晶化の試み	27
2-2-3-2. Fd _{IIA} の安定性の解析	28
2-2-3-3. 嫌気条件下における Fd _{IIA} の結晶化	28
2-2-3-4. X 線回折データの収集	28
2-2-3-5. 分子置換法による Fd _{IIA} の構造決定と精密化	31
2-2-4. Fd _{IIA} の結晶構造	31
2-2-4-1. Fd _{IIA} の全体構造	31
2-2-4-2. クラスの異なる Fd の構造比較	34
2-2-4-3. Proteo-type ferredoxin と Fd _{IIA} の構造比較	35
2-2-4-4. Fd _{IIA} の [2Fe-2S] クラスタ周辺の構造	35
2-2-4-5. Fd _{IIA} の [2Fe-2S] クラスタ周辺の水素結合ネットワーク	44
2-2-5. Fd _{IIA} の酸化還元電位の特異性	49
2-2-5-1. Fd _{IIA} の酸化還元電位の pH 依存性	49
2-2-5-2. Fd _{IIA} のアミノ酸置換体の酸化還元電位	52
2-2-6. Red _{IIB} の結晶構造解析	56
2-2-6-1. Red _{IIB} の結晶化	56
2-2-6-2. Red _{IIB} の結晶構造	57
2-2-6-3. Red _{IIB} の F _{IIB} 推定結合領域	57

第三章 KA1 株由来クラス IIA CARDO における電子伝達選択性の構造生物学的解明	62
3-1. 緒言	62
3-2. 結果と考察	59
3-2-1. Oxy:Fd 複合体の電子伝達選択性の構造的要因	63
3-2-1-1. Oxy _{IIA} :Fd _{IIA} 複合体予測構造の解析	63
3-2-1-2. 単体の静電表面の比較	63
3-2-1-3. クラス III 型, クラス IIB 型 CARDO との(推定)Oxy:Fd 相互作用様式の比較	70
3-2-2. Fd:Red 複合体の電子伝達選択性の構造的要因	70
3-2-2-1. クラス IIA 型 Fd : Red 複合体のドッキングシミュレーション	70
3-2-2-2. Fd _{IIA} :Red _{IIA} と BDO-F:BDO-R, Pdr:Pdx の相互作用領域の比較	73
3-2-2-3. 単体構造の静電表面の比較.	81
3-2-3. CARDO コンポーネント間相互作用の親和力の測定	85
3-2-3-1. Oxy-Fd の親和性	87
3-2-3-2. Fd-Red の親和性	91
3-2-3-3. 他の電子伝達複合体との解離定数の比較	100
3-2-4. クラス IIA CARDO コンポーネントアミノ酸置換体の親和性の解析	100
第四章 総括と展望	109
実験の材料および方法	111
参考文献	132

略語表

DDT	dichloro-diphenyl-trichloroethane
PCP	pentachlorophenol
CNP	2,4,6-trichlorophenyl-4' nitrophenylether
2,4,5-T	2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
CAR	carbazole
CARDO	carbazole 1,9a-dioxygenase
Oxy	terminal oxygenase component of CARDO
Fd	ferredoxin component of CARDO
Red	ferredoxin reductase component of CARDO
FAD	flavin adenine dinucleotide
RO	Rieske non-heme iron oxygenase
FMN	flavin mononucleotide
NDO	naphthalene 1,2-dioxygenase
BDO	biphenyl 2,3-dioxygenase
NADH	reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide
PCB	polychlorinated biphenyl
NDO-O	oxygenase component of NDO
NAD(P)H	reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
His-tag	6 x histidine tag
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
Adx	adrenodoxin
Pdx	putidaredoxin
HiPIP	high potential iron-sulfur protein
NMR	nuclear magnetic resonance
PDB	protein data bank
BDO-F	ferredoxin component of BDO
BDO-R	ferredoxin component of BDO
Fdx VI	ferredoxin VI from <i>Rhodobacter capsultas</i>
ONFR	oxygenase-coupled NADH ferredoxin oxidoreductase
RMSD	root mean standard deviation
ITC	isothermal titration calorimeter
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
CD	circular dichroism

Km	kanamycin
PCR	polymerase chain reaction
MOPS	3-Morpholinopropanesulfonic acid
SDS	sodium dodecylsulfate
TE	tris-EDTA
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
TEG	tris-EDTA-glucose
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
TAE	tris-acetate-EDTA
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside
BSA	bovine serum albumin
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylethylenediamine
APS	ammonium persulfate
FPLC	fast protein liquid chromatography
CV	column volume
DEAE	diethylaminoethyl
PF	photon factory
PF-AR	PF-advanced ring

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
 平成 21 年度博士課程 進学
 氏 名 梅田 隆志
 指導教員名 山根 久和

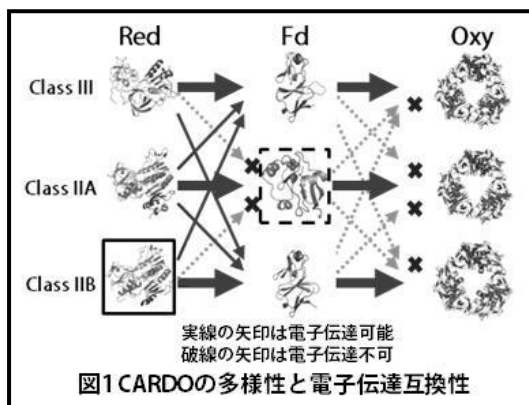
論文題目

芳香環二水酸化酵素の電子伝達機構の解明

Carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO)は、細菌によるカルバゾール(CAR)分解の初発酸化酵素であり、CAR の 1 位及び 9a 位の炭素に対する二原子酸素添加反応を触媒する。CARDO は実際に水酸化反応を触媒する oxygenase (Oxy)と、NADH からの電子を Oxy に伝達する ferredoxin reductase (Red), ferredoxin (Fd)の三つのコンポーネントから構成される (図 1)。

CARDO は Oxy が非ヘム鉄及び Rieske 型[2Fe-2S]クラスタを持つことから、Rieske non-heme iron oxygenase (RO)という酸化酵素群に属する。RO は電子伝達系の数と種類の違いにより、IA, IB, IIA, IIB, III の 5 つのクラスに分類される。当研究室では、CAR 資化菌として *Novosphingobium* sp. KA1 株、*Nocardioides aromaticivorans* IC177 株、*Pseudomonas resinovorans* CA10 株を単離しているが、それらに由来する

CARDO は、Oxy が互いに高い相同性を示し (一次配列で >44% identity, >75% similarity), かつ同一の化合物を主要な基質としているにも関わらず、Fd と Red の



特徴の違いからそれぞれクラス IIA, IIB, III に分類される。主要な基質が同一な RO において電子伝達系に多様性がある例は他になく, CARDO は RO の電子伝達機構を明らかにする上で格好の材料であると言える。

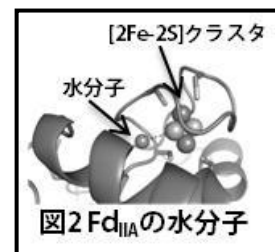
また, 以前の電子伝達系の互換性の解析から, CARDO においては, Oxy-Fd 間の認識は厳密で異なるクラスの組み合わせだと電子が伝達されない一方, Fd-Red 間の選択性が低くクラスの異なる組み合わせでも電子が伝達されることが明らかになったが, これは他の RO と同様の傾向であった。しかし興味深いことに, KA1 株由来 Fd は特異的に他のクラスの Red からは電子を受け取ることが出来ない。すなわち, クラス IIA 型 Fd は電子伝達のカウンターパートとの認識が厳密であるという他にない特徴を持つことが明らかとなっていた (図 1)。

本研究では, CARDO コンポーネントの結晶構造解析, コンポーネント間相互作用の親和性の解析を行うことにより, RO に普遍的なコンポーネント間相互作用の分子メカニズムを明らかにすること, また, クラス IIA CARDO の例外的な相互作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

クラス IIA 型 Fd の結晶構造解析

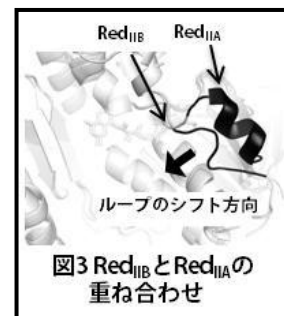
PEG MME550 を用いて嫌気条件下において Fd_{IIA} (以降, CARDO が属するクラスに基づき各々の株由来各コンポーネントを Fd_{IIA} のように表す) の結晶を取得し, 分解能 1.9 Å で構造を決定した (図 1 破線四角)。

Fd_{IIA} の主鎖全体構造は, 過去に報告がある, Fd_{IIA} と同じタイプである Proteo-type ferredoxin と類似していたが, Fd_{IIA} においてのみ [2Fe-2S] クラスタとクラスタ結合ループの間に水分子が存在していた (図 2)。Fd_{IIA} では, この水分子の存在により [2Fe-2S] クラスタ周辺に他とは異なる水素結合ネットワークが形成されていた。さらに, 水分子が [2Fe-2S] クラスタのリガンドである Cys の硫黄原子と水素結合を形成していた。



クラス IIB 型 Red の結晶構造解析

酒石酸カリウムナトリウムを用いて Red_{IIB} の結晶を取得し, 分解能 3.54 Å で構造を決定した (図 1 実線四角)。分解能が低いため, アミノ酸側鎖の詳細な議論は出来ないが, 主鎖構造を Red_{IIA} と比較した。Red_{IIB} は Red_{IIA} と比べて, 推定相互作用領域に存在するループが内側にシフトしていた (図 3)。Fd_{IIB} は Fd_{IIA} と比べて矢じりのような形に近く, 相互作用領域が狭い (図 1)。Red_{IIB} は当該ループをシフトさせて相互作用領域を狭めることで Fd_{IIB} と適切な複合体形成が行えると考えられる。



電子伝達複合体のドッキングシミュレーション

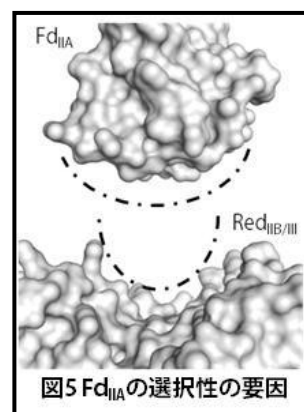
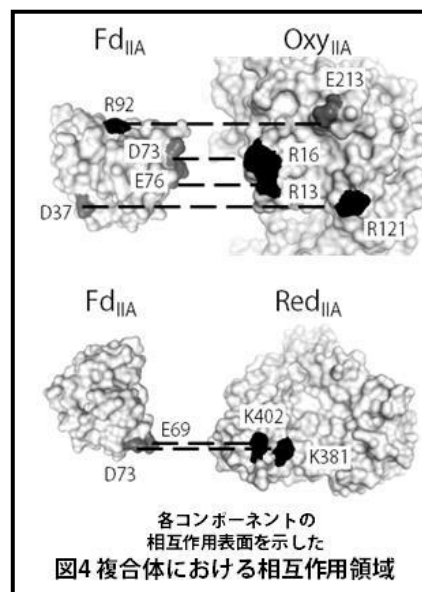
前任者により Oxy_{IIA}, Red_{IIA} の結晶構造が明らかとされているため, Oxy_{IIA}, Fd_{IIA}, Red_{IIA} の単体構造を基に ZDOCK による Oxy_{IIA}:Fd_{IIA}, Fd_{IIA}:Red_{IIA} 複合体のドッキングシミュレーションを行った。

推定相互作用領域では Oxy_{IIA} の窪んだ領域に対して Fd_{IIA} がはまり込むように結合しており, 鍵と鍵穴のように両者の形状が相補的になっていた。加えて,

Oxy_{IIA}の正に帯電している領域とFd_{IIA}の負に帯電している領域が接近するように結合しており局所的な電荷の対が形成されていた(図4上). この領域において, 水素結合や塩橋を形成しているアミノ酸残基が特に多く存在しており, 相補的な形状に加えて表面電荷の相補性が, Oxy_{IIA}:Fd_{IIA}複合体形成に重要な役割を果たすと考えられた.

また, OxyとFdの結合表面は, 各クラスのもので異なる形状と異なる電荷分布を持つ. このため, CARD_{OIIA}について本研究で示したような両者の相補性が各クラス特異的な複合体形成(各クラスのOxy-Fd間での厳密な相互認識)を引き起こす原因であり, 異なるクラス間での電子伝達を不可能にする要因と言える.

一方, Fd_{IIA}:Red_{IIA}複合体の推定相互作用領域ではOxy_{IIA}:Fd_{IIA}複合体と同様に形状が一致するように結合していた. しかし, 表面電荷の相補性はOxy_{IIA}:Fd_{IIA}と比べてそれほど観察されなかった(図4下). Red_{IIA}は他のクラスのFdへ電子を渡すことが可能であることを考え合わせると, Fd:Red複合体形成の可否には表面電荷の相補性は主要な要因ではなく形状の一致の有無に大きく依存する可能性が示唆された. Fd_{IIA}は他のクラスのFdと比べて相互作用領域が嵩高い形状をしており, これに対応するようにRed_{IIA}の窪み(相互作用領域)が, 構造が報告されているクラスIIBに属するreductaseよりもすり鉢状に広がっている. すなわち, Fd_{IIA}が他のクラスのRedから電子を受け取ることが出来ない理由は, 他のクラスRedの結合領域(窪み)が小さいために結合自体が起こらず電子伝達中心同士が接近出来ないからであると予想された(図5).



コンポーネント間相互作用の親和性の測定

上で, 電子伝達選択性の可否を決定する要因をタンパク質の立体構造の面から予測したが, “電子が伝達されない”ことが“複合体を形成しないから”なのか, あるいは“複合体は形成されても電子伝達が起こらないから”なのかは, 実験的に証明されていない. そこで, 等温滴定型熱量計(ITC: Isothermal Titration Calorimetry)を用いてコンポーネント間の解離定数などを求めることで結合状態を物理パラメーターを用いて評価した.

OxyとFdの本来のクラス間の組み合わせでは滴定に伴い吸熱反応が起きていることが確認され, 解離定数はIIA型, IIB型, III型でそれぞれ74.1 μM, 465 μM, 224 μMと弱い親和力をもち, 相互作用の主な駆動力は疎水性相互作用であることが示された. 一方, 異なるクラス間のOxyとFdの組み合わせでは滴定に伴う明確な熱量変化が観測されず, 複合体自体が形成されないことが明らかとなった. FdとRedの本来の組み合わせでは, Oxy-Fdと同様に吸熱反応が観察され, 解離定数はIIA型, IIB型, III型でそれぞれ53.6 μM, 125 μM, 296 μMであった. Fd-Redの

異なるクラスの組み合わせでは、Fd_{IIB}-Red_{IIA}の組み合わせでのみ熱量変化が観察され、解離定数は516 μM であった。他の組み合わせでは、相互作用はかなり弱い。そのため、電子が伝達されるものであっても解離定数を決定するには至らなかった。先述のように、複合体構造予測や親和性の測定結果から Fd-Red 間の相互作用は疎水性相互作用を駆動力とすることが示唆されたが、疎水性相互作用は非特異的に起こる場合が多い。このため、Fd と Red のクラスの異なる組み合わせでの電子伝達は電子伝達中心が接近しうる場合に偶発的に起こる可能性が考えられた。

クラス IIA 型 Fd の酸化還元電位の測定

Cyclic voltammetry を行った結果、Fd_{IIA} は+107 mV という酸化還元電位を示した。Fd_{IIA} のように鉄硫黄クラスタが Cys のみで配位される ferredoxin では、一部の [4Fe-4S]型 ferredoxin が高い酸化還元電位を示し、high potential iron-sulfur protein (HiPIP)と呼ばれているが、[2Fe-2S]型では類似の報告は知る限りなく、Fd_{IIA} は初めての [2Fe-2S]型 HiPIP の例であることが明らかとなった。この高い酸化還元電位は、Fd_{IIA} が特異的に水分子を [2Fe-2S]クラスタ近傍に有することに起因すると考えられる。クラスタ近傍の水素結合ネットワークは ferredoxin の酸化還元電位を決定するのに重要な因子であると考えられているが、Fd_{IIA} は水分子の存在により他の Proteo-type ferredoxin と比べて異なる水素結合ネットワークを有し、かつ水分子が [2Fe-2S]クラスタと直接水素結合を形成しており、還元型 [2Fe-2S]クラスタの安定化に寄与するためであると推測される。

また、水分子が Fd_{IIA} の酸化還元電位が高い要因であるということは、水分子のプロトン化状態の違いにより酸化還元電位が変化する可能性が考えられた。事実、[2Fe-2S]クラスタが二つの His と二つの Cys により配位される Rieske-type ferredoxin では酸化還元電位の pH 依存性が見られる。一方、[2Fe-2S]クラスタが Cys のみで配位される ferredoxin では酸化還元電位に pH 依存性は見られないが、Fd_{IIA} は pH が 1 上昇すると酸化還元電位が約 60 mV 低下するという結果が得られた。このことから、水分子が Fd_{IIA} の高い酸化還元電位の要因になっていることが明らかとなった。

総括

本研究では、今まで構造解析が完了していなかった CARDO コンポーネントの結晶構造を明らかにし、RO のコンポーネント間相互作用をシミュレーションと ITC を用いて解析することで電子伝達選択性の要因を提唱した。また、Fd_{IIA} が世界で初めての [2Fe-2S]型 HiPIP であることを発見し、その高い酸化還元電位の理由を提唱した。P450 の電子伝達系は RO と共通するものもあるが、電子伝達選択性は異なり、酸化酵素-ferredoxin 間でも電子が伝達されるものも多い。このため、RO と P450 のコンポーネント間相互作用様式の違いを見出すことで、RO のみならず、より包括的な、電子伝達タンパク質間相互作用のメカニズムに迫ることが期待される。

公表論文

Umeda et al., Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a novel ferredoxin involved in the dioxygenation of carbazole by *Novosphingobium* sp. KA1. *Acta Crystallogr. Sect. F* **64**:632-635 (2008).

第一章 序論

近年、人類の産業活動が急激な発展を遂げた結果、それまで自然環境中に見出されなかったような人為的化合物が製造・使用・廃棄といった過程でその性質に応じて環境中に大量に拡散している。それらの中には生体毒性を有し、かつ安定で分解されにくいために環境中に長く残存するものが存在する。特に化石燃料中に多量に含まれる芳香族化合物がその中心であり、大気、土壌、水圏での残存量が増加している [Blumer and Youngblood, 1975; Hites et al., 1977]。さらに、農薬として製造・使用されてきた、dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT), pentachlorophenol (PCP), 2,4,6-trichlorophenyl-4'-nitrophenylether (CNP), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)や、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)などのダイオキシン類などによる汚染も社会問題となっている。

これらの環境汚染物質は、環境中に物理的・化学的・生物学的分解や変化を受ける事が知られている。これら芳香族化合物による環境汚染は、高濃度で局所的な場合は、物理的・化学的分解による除去が適している。しかし、比較的 low 濃度で広範囲な汚染については、物理的・化学的分解による除去には高いコストがかかり事実上不可能である。このような場合における汚染物質除去に有用な方法は、微生物を用いた **bioremediation** と呼ばれる生物学的分解を用いる手法である。**Bioremediation** では、微生物が環境中での化学物質の分解に大きく寄与している [Alexander, 1981]と言われ、様々な環境汚染物質の分解菌が単離され、実用化されてきた。物質生産や物質変換に始まり、人類は古くから有用な微生物機能に関する研究を行ってきたが、環境汚染問題に対する関心から、現在では微生物機能を応用した環境浄化を目的とした研究も盛んに行われている。

Carbazole

Carbazole (CAR)は頁岩油、原油、コールタール中に含まれる [Creaser et al., 1993, Hsu et al., 1994, Mushrush et al., 1999], 天然に存在する化合物である。CARは産業面では多くの化合物(染料, 殺虫剤, 発色抑制剤など)の原料として広く使用されている有用な化合物ではあるが、変異原性 [Tsuda et al., 1982], 毒性を有する難分解性化合物でもある。また、CAR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、CARが原油の接触還元による脱硫において用いられる触媒の作用を阻害することなどから [Laredo et al., 2001], 原油中の CAR 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]。

CAR はジベンゾピロール骨格を持つが、ジベンゾピロール骨格は二つの芳香環が同一平面上にあり、扁平な構造をとる。このため、CAR は人為起源の環境汚染物質の中でも最も高い毒性を持つと言われるダイオキシンと似た構造をとる。このため、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].

Carbazole 代謝経路

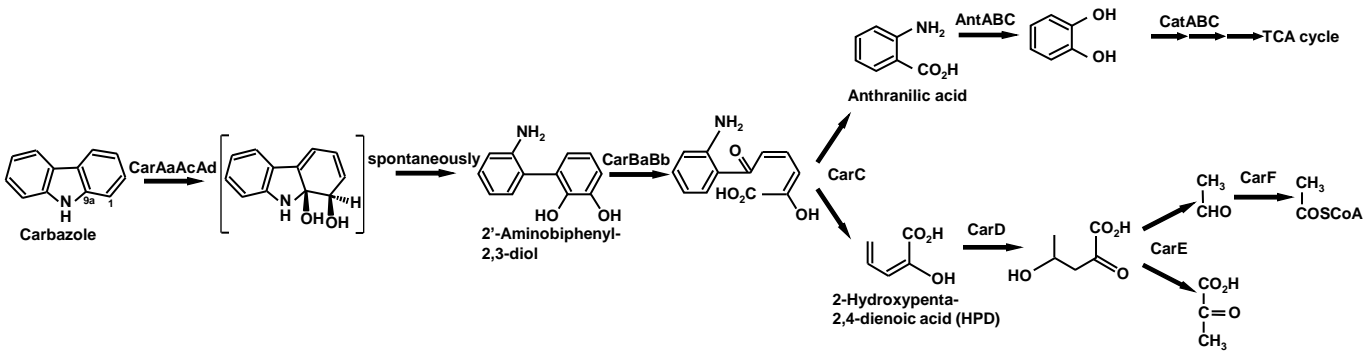
これまでに、CAR 分解菌が多数単離されており [Nojiri and Omori, 2007], その中でも、*Pseudomonas resinovorans* CA10 株については、当研究室で 1993 年に単離され、先駆的な研究が行われてきた。当研究室では CA10 株以外の CAR 資化菌も多数単離しており、他の代表的な菌株としては、*Janthinobacterium* sp. J3 株、*Novosphingobium* sp. KA1 株、*Nocardioides aromaticivorans* IC177 株がある。これら資化菌では CAR はまず *carAaAcAd* (KA1 株の場合は *CarAaI*, *CarAcI*, *fdrI* 及び *CarAaII*, *CarAcII*, *fdrII*) 遺伝子産物により二水酸化された後、自発的環開裂により 2'-aminobiphenyl-2,3-diol に変換される。その後、*carBaBb* 遺伝子産物によりメタ開裂反応が触媒され、*carC* 遺伝子産物により anthranilic acid と 2-hydroxypenta-2,4-dienoic acid の二つに分かれる。CA10 株, J3 株, KA1 株, IC177 株では、遺伝子構造は多少異なっているが、CAR から anthranilic acid までは同様の代謝経路を持つことが示されている (Fig. 1-1).

Carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO)

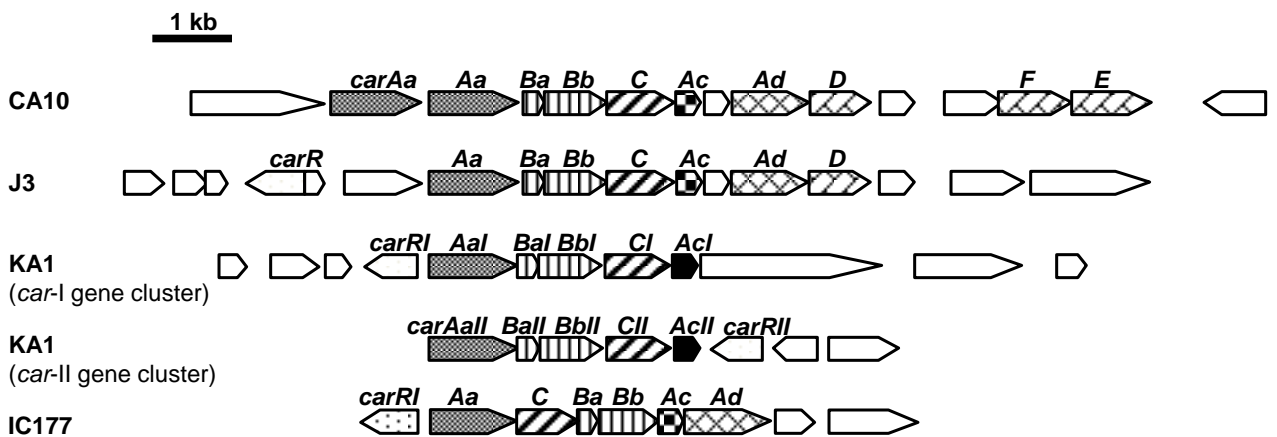
carAaAcAd (KA1 株の場合は *CarAaI*, *CarAcI*, *fdrI* 及び *CarAaII*, *CarAcII*, *fdrII*) 遺伝子は CAR 代謝の初発酸化酵素である carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) をコードしている。CARDO は terminal oxygenase (Oxy), ferredoxin (Fd), ferredoxin reductase (Red) の 3 つのコンポーネントで構成される (Fig. 1-2)。Oxy は基質に直接酸素を添加するが、その際、酸素の活性化のために電子を必要とする。その電子を Oxy へ受け渡す役割を持つのが Fd と Red である。酸化反応に必要な電子は NADH から Red, Fd を経て Oxy の Rieske [2Fe-2S] クラスタへ伝わり、さらに Oxy 分子内の活性中心の非ヘム鉄へ渡される。これにより酸素が活性化され、基質への酸素添加反応が起こる。CARDO が触媒する酸素添加反応は angular dioxygenation と呼ばれるが (Fig.1-2), CARDO のように angular dioxygenation を触媒する酵素の報告例は非常に少ない [Nojiri and Omori, 2002].

CARDO の持つ特筆すべき特徴としては、電子伝達コンポーネントの多様性が挙げられる。CA10 株, J3 株, KA1 株, IC177 株の 4 つの Oxy はアミノ酸レベルの identity は 45% 以上と有意な同一性を示すのに対し (Table 1-1), Fd においては、CA10 株・J3 株・IC177 株の間の一次配列の identity は 30% 以上と相同性は

a)



b)



Gene product or putative gene product

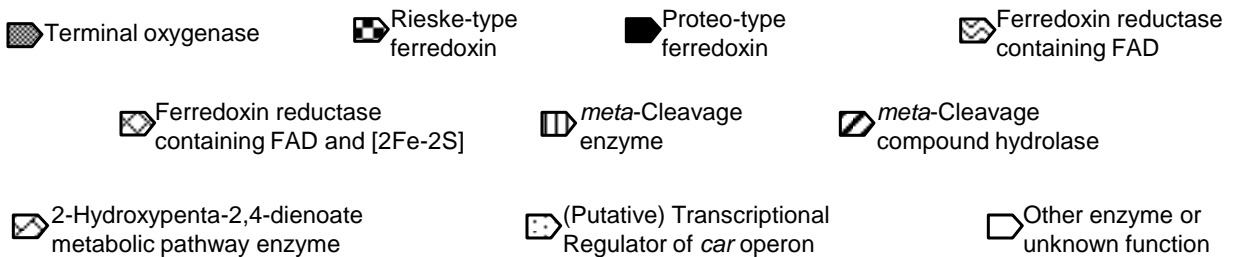


Figure 1-1. Carbazole代謝経路とcar遺伝子群

a) *Pseudomonas resinovorans* CA10株のcarbazole代謝経路[Sato et al., 1997a].b) *Pseudomonas resinovorans* CA10株 [Nojiri et al., 2001], *Janthinobacterium* sp. J3株 [Inoue et al., 2004], *Novosphingobium* sp. KA1株 [Urata et al., 2006], *Nocardiooides aromaticivorans* IC177株 [Inoue et al., 2006]のcar遺伝子群とその周辺の遺伝子クラスター。

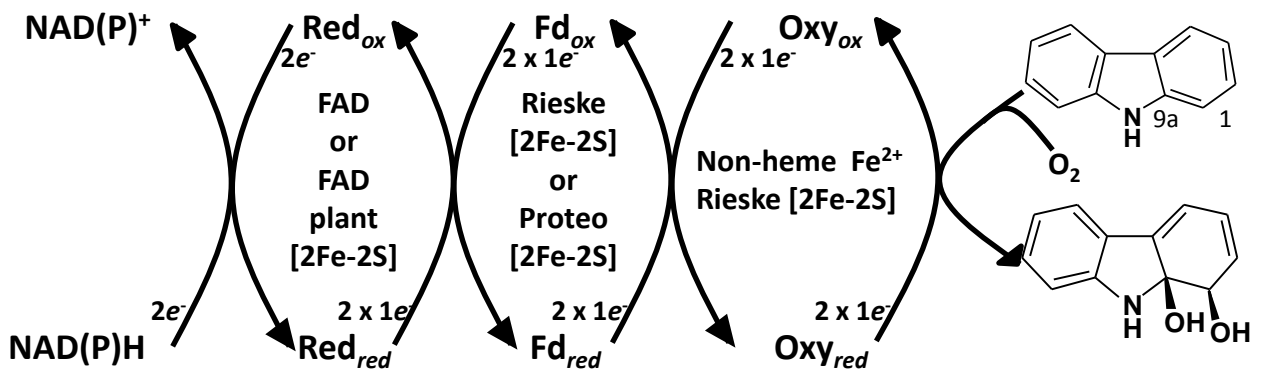


Figure. 1-2. CARDOの構成, その補因子, 触媒する反応

RedはRed (ferredoxin reductase), FdはFd (ferredoxin), OxはOxy (terminal oxygenase)を示す。矢印は電子の流れを示す。Redの補因子は、クラスIII RedがFADとplant型[2Fe-2S]クラスタであり、クラスIIA, IIB RedはFADのみである。Fdの補因子はクラスIIA Fdがputidaredoxin型[2Fe-2S]クラスタ、クラスIIB, IIIがRieske型[2Fe-2S]クラスタである。Oxyはいずれのクラスも非ヘム鉄とRieske型[2Fe-2S]クラスタを持つ。

Table 1-1. KA1株、CA10株、IC177株由来Oxyの一次配列のidentity (%)

	KA1 (CarAal)	KA1 (CarAall)	CA10	J3	IC177
KA1 (CarAal)		75	60	60	49
KA1 (CarAall)			57	57	49
CA10				99	45
J3					45
IC177					


Table 1-2. KA1株、CA10株、IC177株由来Fdの一次配列のidentity (%)


	KA1 (CarAcl)	KA1 (CarAclI)	CA10	J3	IC177
KA1 (CarAcl)		57	10	11	13
KA1 (CarAclI)			13	12	13
CA10				99	30
J3					31
IC177					

Table 1-3. KA1株、CA10株、IC177株由来Redの一次配列のidentity (%)

	KA1 (fdrI)	KA1 (fdrII)	CA10	J3	IC177
KA1 (fdrI)		57	14	14	31
KA1 (fdrII)			13	13	31
CA10				95	16
J3					15
IC177					

 identity<20%

 21%<identity<44%

 45%<identity

あるが、これらと KA1 株由来 Fd との identity はいずれも 13% 以下相同性は示さない (Table 1-2). Red においては, KA1 株と IC177 株の間の一次配列の identity は 31% と相同性はあるが, これらと CA10 株, J3 株由来 Red との identity は最大でも 16% と相同性は示さない (Table 1-3). アミノ酸配列の解析から, CA10 株・J3 株・IC177 株由来の Fd は, Rieske-type ferredoxin と呼ばれるタンパク質で, 酸化還元中心の [2Fe-2S] クラスタが 2 つの Cys と 2 つの His により配位される (Fig. 1-3d). 一方で, KA1 株由来 Fd は Proteo-type ferredoxin と呼ばれるタンパク質であり [Ewen et al., 2011], 酸化還元中心の [2Fe-2S] クラスタに配位しているアミノ酸残基は 4 つの Cys 残基であることが明らかになっている (Fig. 1-4d), これら 2 種の Fd 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る. Red では CA10 株, J3 株の FAD と plant-type [2Fe-2S] クラスタを補因子あるいは補欠分子族として持つことが明らかとなっており (Fig. 1-5a,c のタイプ) [Nam et al., 2002], 一方で, KA1 株, IC177 株の Red は補因子として FAD のみを持つ (Fig. 1-5b,d のタイプ) [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主要な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 と同類の酵素の中でも珍しい特徴と言える.

Rieske non-heme iron oxygenase (RO)

CARDO は Oxy が Rieske-type [2Fe-2S] クラスタと非ヘム鉄を有することから, Rieske non-heme iron oxygenase (RO) と呼ばれる酵素に分類される. RO に分類される酵素は, 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 2 コンポーネント型のもものと, ferredoxin と ferredoxin reductase を持つ 3 コンポーネント型のものである. CARDO は ferredoxin と ferredoxin reductase を持つ 3 コンポーネント型である. RO 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. しかし, 触媒する反応 (P450 が触媒する反応のほとんどが monooxygenation であるのに対し, RO に分類される酵素の多くは芳香族化合物を基質とした dioxygenation を触媒する) やヘムの有無など, 異なる点も多い.

1991 年に Batie らは RO 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. Table 1-4 にその分類方法を示す. RO の電子伝達コンポーネントの数が 1 つ (reductase のみ) ならばクラス I, ferredoxin と ferredoxin reductase の 2 であるなら, クラス II あるいは III に分類される. クラス I においては, 電子伝達タンパク質の補因子として FMN を持つならばクラ

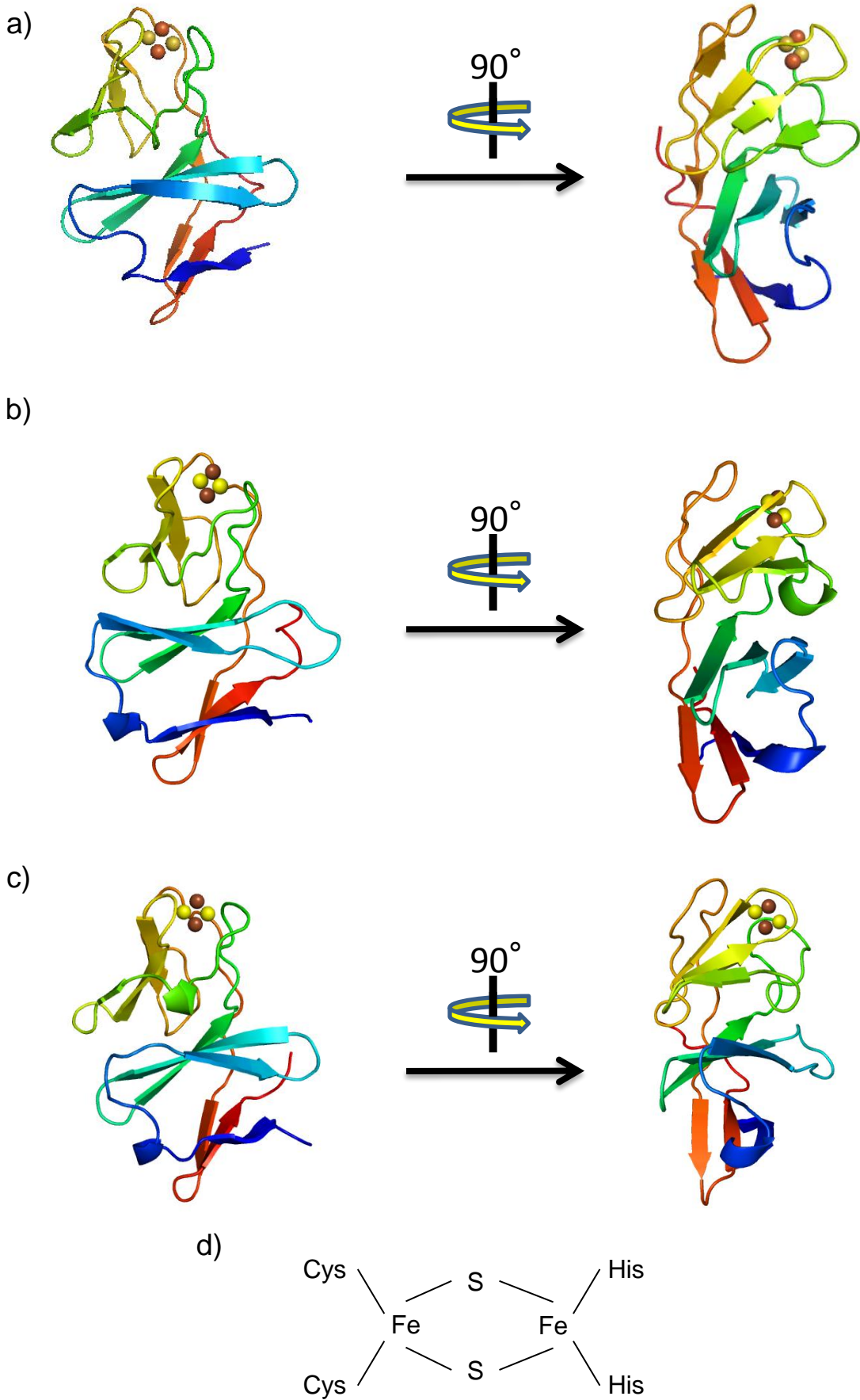


Figure 1-3. ROのferredoxinコンポーネントの立体構造

鉄, 硫黄原子をそれぞれ茶, 黄色で示した.

a)KKS102株由来BDO-F [Senda et al., 2007],

b)CA10株由来Fd [Nam et al., 2005],

c)IC177株由来Fd [Inoue et al., 2009].

d)Rieske型[2Fe-2S]クラスター

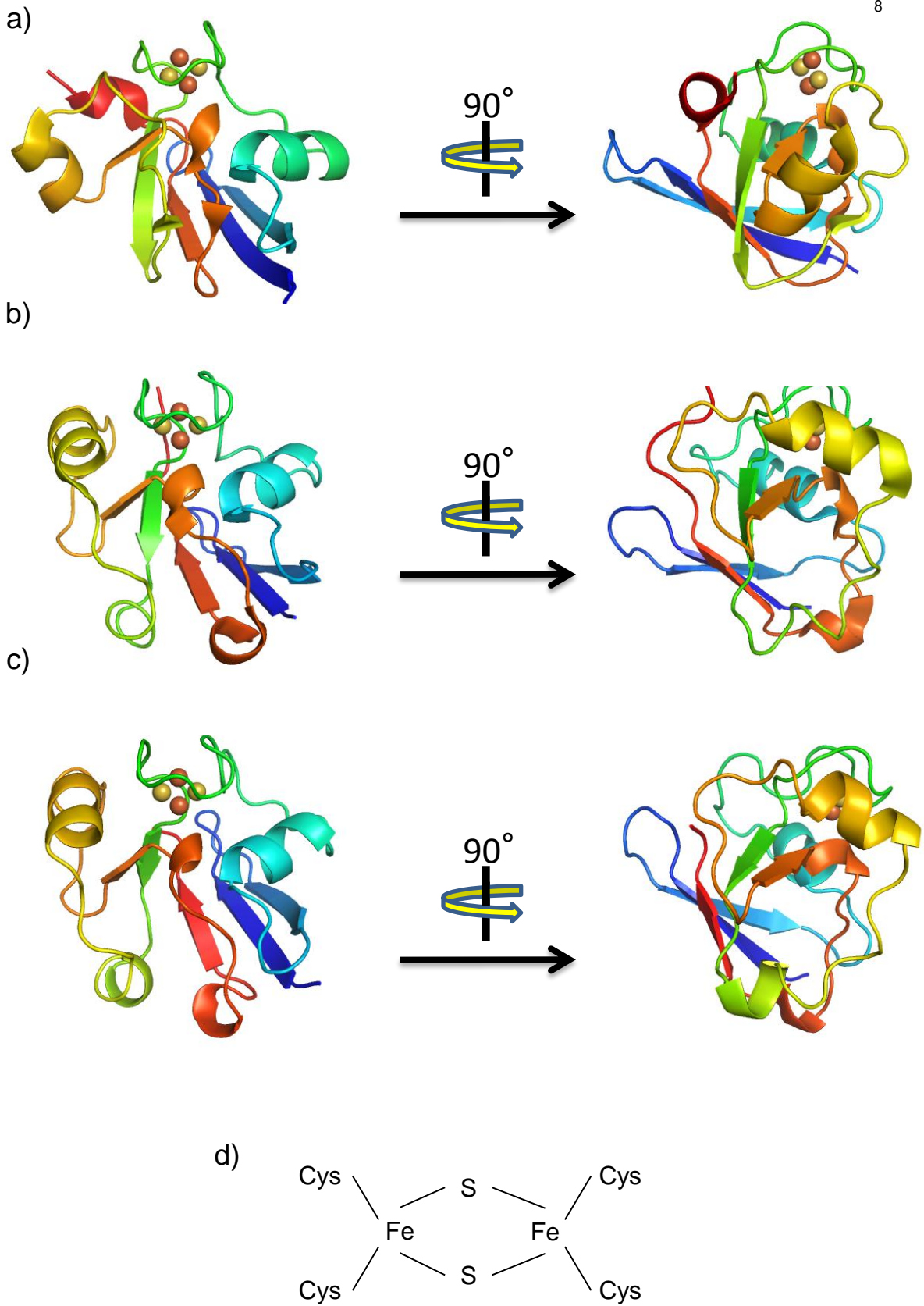


Figure 1-4. Plant型, Proteo型ferredoxinの立体構造

鉄, 硫黄原子をそれぞれ茶, 黄色で示した.

a) *Anabaena*由来ferredoxin (plant型) [Rypniewski et al., 1991],

b) putidaredoxin (Proteo型) [Sevrioukova et al., 2004],

c) Bovine由来adrenodoxin (Proteo型) [Muller et al., 1998].

d) Plant型/Proteo型[2Fe-2S]クラスター

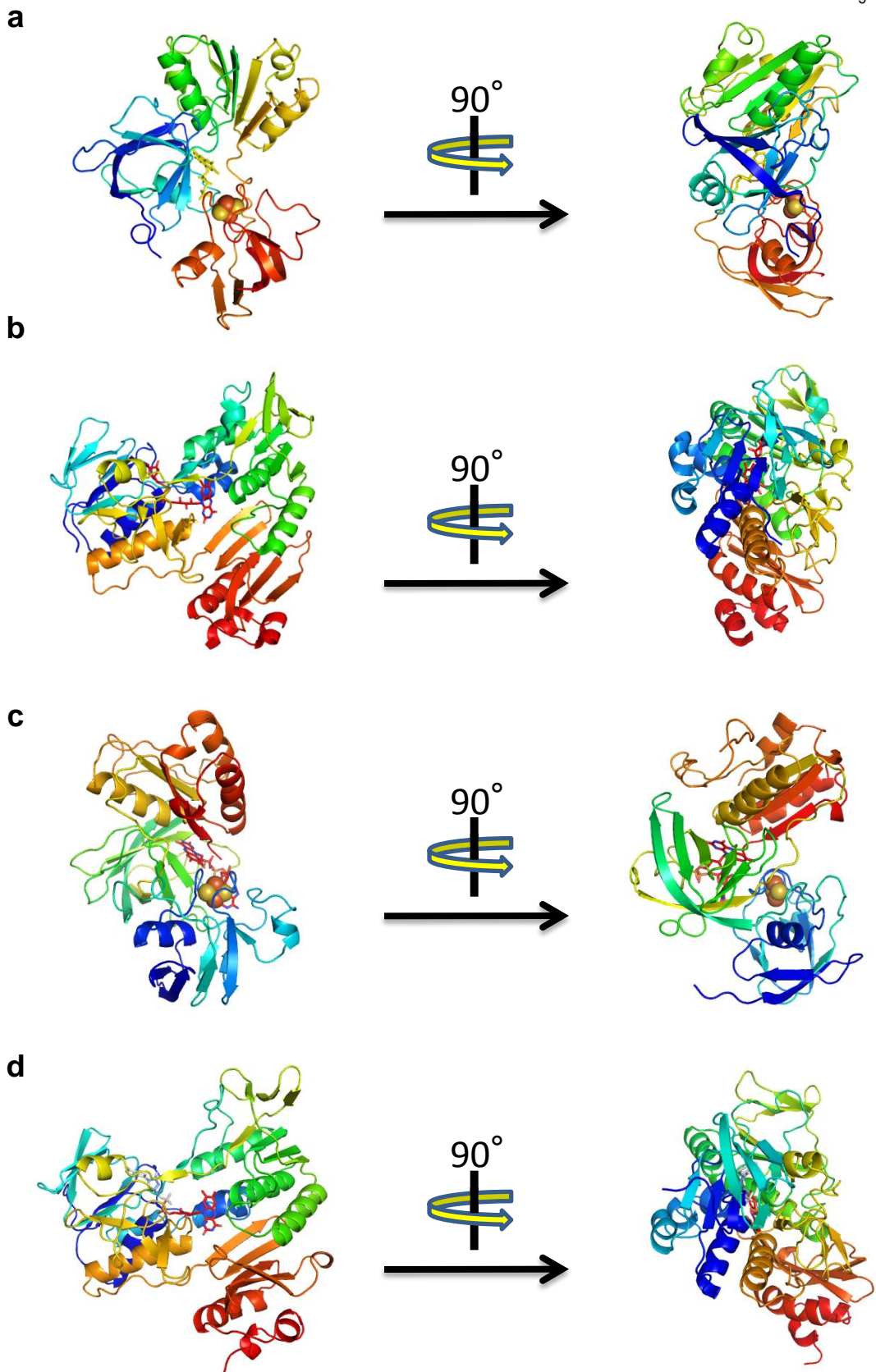


















Figure 1-5. ROのreductaseコンポーネントの立体構造

鉄, 硫黄原子を球で, FMN, FADをそれぞれスティックで示した.

- a) BD01株由来PDO-R [Correll et al., 1992],
- b) KKS102株由来BDO-R [Senda et al., 2000],
- c) J3株由来Red [Ashikawa et al., in preparation],
- d) KA1株由来Red [香月, 2008].

Table 1-4. ROの分類

Class	Red	Fd	Oxy	ROの例
I	IA 			Phthalateoxygenase (Burkholderia cepacia CBO1)
	IB 			2-oxoquinoline monooxygenase (Pseudomonas putida 86)
II	IIA 	Proteo-type 		Carbazole 1,9a- dioxygenase (KA1) Dicamba monooxygenase (Pseudomonas maltophiliaDI-6)
	IIB 	Rieske-type 		Carbazole 1,9a- dioxygenase (IC177) Biphenyldioxygenase (Rhodococcus jostii.RH1, Burkholderia xenovorans LB400)
III		Rieske-type 		Naphthalene 1,2-dioxygenase (Pseudomonas sp. NCIB9816-4) Nitrobenzene dioxygenase (Comamonas sp. JS765) Carbazole 1,9a- dioxygenase (CA10, J3)

 : FAD : [2Fe-2S]クラスター : FMN : 非ヘム鉄

ス IA, FAD を持つならばクラス IB に分類される。クラス II と III の違いは ferredoxin reductase の有する補因子の種類の違いである。補因子として FAD と plant-type [2Fe-2S]クラスタを持つ場合はクラス III, FAD のみを持つ場合はクラス II に分類される。クラス II はさらに ferredoxin のタイプにより細分化される。ferredoxin コンポーネントが Proteo-typeferredoxin ならば IIA, Rieske-type ferredoxin ならば IIB に分類される。この分類に従うと, CA10 株, J3 株の CARDO はクラス III に, IC177 株の CARDO はクラス IIB に, KA1 株の CARDO はクラス IIA に分類される。

RO 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, クラス III の naphthalene 1,2-dioxygenase (NDO), クラス 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, 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の作出 [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 [Erickson 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], *Sphingomonas* sp. CHY1 株 [Jouanneau et al., 2006], *Sphingobium yanoikuyae*. B1 株 [Khan 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, Jakoncic et al., 2007, Senda et al., 2007, Ferraro et al., 2008] 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, RO 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。

RO 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。RO 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 [Kauppi et al., 1998]. NDO はクラス III に分類される RO で (Table 1-4), Fig. 1-6 に示すように、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。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。また、*Pseudomonas putida* F1 株由来 toluene 2,3-dioxygenase では、ferredoxin コンポーネントが二つの α サブユニット境界面に結合するものと、 α と β サブユニット境界面に結合する可能性がドッキングシミュレーションにより示唆されている [Friemann et al., 2008] の 1 つの α サブユニットには Rieske-type [2Fe-2S] クラスタ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-type [2Fe-2S] クラスタに渡り、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-type [2Fe-2S] クラスタと非ヘム鉄で電子の伝達が行われる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ので、Rieske-type [2Fe-2S] クラスタ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 RO の oxygenase コンポーネント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。クラス IIB に属するものでは、*Rhodococcus jostii*. RHA1 株由来 BDO [Furusawa et al., 2004], *Sphingobium yanoikuyae* B1 株由来 BDO [Ferraro et al., 2007], *Pseudomonas fluorescens* IP01 株由来 cumene dioxygenase [Dong et al., 2005], *Pseudomonas putida* 86 株由来 2-oxoquinoline 8-monooxygenase [Martins et al., 2005], *Sphingomonas* sp. CHY1 株由来多環芳香族二水酸化酵素である PhnI [Jakoncic et al., 2007], クラス III に属するものでは、*Comamonas* sp. JS765 株由来 nitrobenzene dioxygenase [Friemann et al., 2005], *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 株由来高熱耐性 NDO [Gakhar et al., 2005] の報告がある。当研究室においては *Janthinobacterium* sp. J3 株由来 Oxy [Nojiri et al., 2005], *Nocardioides aromaticivorans* IC177 株由来の Oxy [Inoue et al., 2009], *Novosphingobium* sp. KA1 株由来の Oxy [香月, 2008] など、各 terminal oxygenase の立体構造が解明された (Fig. 1-6)。これまでに明らかとなっている RO の oxygenase コンポーネントのうち、CARDO と同じ α_3 の 4 次構造をとるの

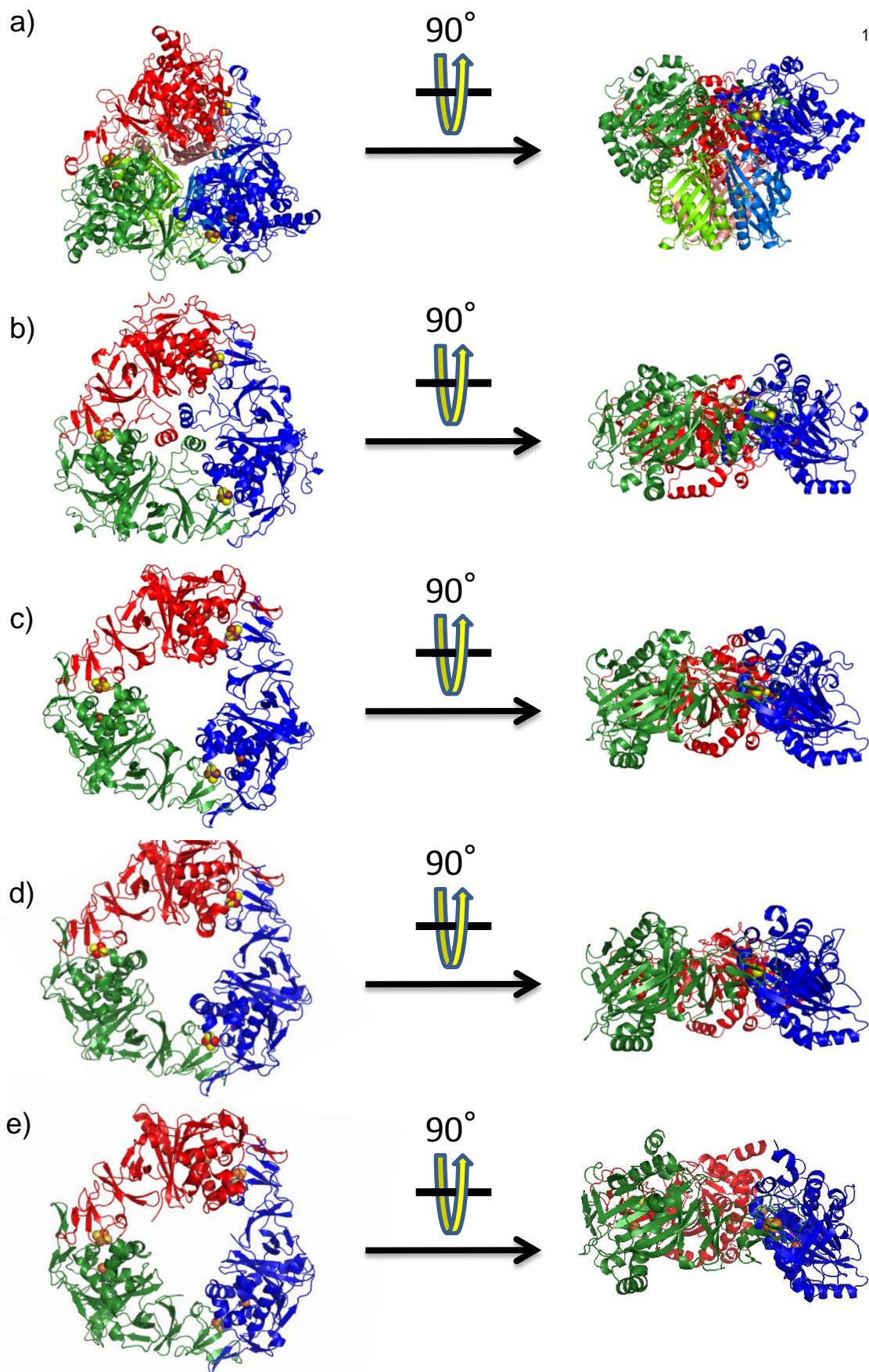


Figure 1-6. ROのterminal oxygenaseの立体構造

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 [Kauppi et al., 1998],

b) 86株由来2-oxoquinoline 8-monooxygenaseのterminal oxygenaseコンポーネント [Martins et al., 2005],

c) J3株由来Oxy [Nojiri et al., 2005],

d) IC177株由来Oxy [Inoue et al., 2009]

e) KA1株由来Oxy [香月, 2008].

は 2-oxoquinoline 8-monooxygenase と dicamba monooxygenase であり、生化学的な解析のみから α_6 の 4 次構造 ($\alpha_3\alpha_3$ 構造をとり、 α_3 が上下に二つ重なっていると想像される)をとるとされている *B. cepacia* DB01 株の phthalate dioxygenase の terminal oxygenase コンポーネント [Tarasev et al., 2006]を除く、他のものはすべて $\alpha_3\beta_3$ のヘテロヘキサマーである。上述の全ての構造において Rieske [2Fe-2S]クラスタ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。

RO 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。Fig. 1-5 に示すように、reductase に関しては、クラス IA に属する *Burkholderia cepacia* BD01 株由来 phthalate dioxygenase の reductase コンポーネント [Correll et al., 1992]、クラス IB に属する *Acinetobacter* sp. ADP1 株由来 benzoate 1,2-dioxygenase の reductase コンポーネント [Karlsson et al., 2002]、クラス IIB に属する *Acidovorax* sp. KKS102 株由来 BDO の ferredoxin reductase コンポーネント [Senda et al., 2000]、Toluene 2,3-dioxygenase の ferredoxin reductase コンポーネント [Friemann et al., 2009]の立体構造が明らかとなっている。当研究室においては、クラス IIA に属する KA1 株由来 Red [香月, 2008]、クラス III に属する J3 株由来 Red [Ashikawa et al., in preparation]の結晶構造が明らかとなっている。

Fig. 1-3 に示すように、ferredoxin においてはクラス IIB に属する *Sphingobium* sp. B1 株 BDO の ferredoxin [Ferraro et al., 2007]、*Acidovorax* sp. KKS102 株由来 BDO の ferredoxin コンポーネント [Senda et al., 2007]、*Burkholderia xenovorans* LB400 株由来の BDO の ferredoxin コンポーネント [Colbert et al., 2000]、クラス III に属する *Pseudomonas* sp. NCIB9816-4 株由来 NDO の ferredoxin コンポーネント [Brown et al., 2007]。当研究室では、クラス IIB に属する IC177 株由来 Fd [Inoue et al., 2009]、クラス III に属する CA10 株由来 Fd [Nam et al., 2005]が現在までのところ報告されている。

400 種以上もの報告例のある、RO に属する酵素の中で、クラス IIA に分類されるものは *Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株由来 dicamba monooxygenase、*Novosphingobium* sp. KA1 株由来 CARDO、*Sphingomonas wittichii* RW1 株由来 dioxin dioxygenase、*Pseudomonas* 由来 pyrazon dioxygenase の 4 例のみで、他のクラスと比較すると、詳細な解析がなされていない。このうち、立体構造が明らかとなっているものは、当研究室で明らかとなった KA1 株由来 Oxy, Red と dicamba monooxygenase [Dumitru et al., 2009, D'Ordine et al., 2009]である。クラス IIA RO の ferredoxin コンポーネントの立体構造は本実験開始当初明らかとなっていなかったが、クラス IIA RO の ferredoxin は活性中心に Proteo-type [2Fe-2S]クラスタを持つ。同様のタイプの ferredoxin では、plant-typeferredoxin

があり、それらの立体構造は明らかとなっている (Fig. 1-4). Plant-type ではシアノバクテリア由来 ferredoxin [Fukuyama et al., 1980, Tsukihara et al., 1978], *Aphanothece sacrum* 由来 ferredoxin [Tsukihara et al., 1990], *Anabaena* 7120 由来 ferredoxin [Rypniewski et al., 1991; Jacobson et al., 1993, *Equisetum arvense* 由来 ferredoxin [Ikemizu et al., 1994], *Chlorella fusca* 由来 ferredoxin [Bes et al., 1999], vertebrate-type では, bovine 由来 adrenodoxin [Müller et al., 1998], Proteo-type では *Pseudomonas putida* 由来 putidaredoxin [Sevrioukova et al., 2004; Smith et al., 2004; Sevrioukova, 2005], 大腸菌由来 ferredoxin [Kakuta et al., 2001], *Trichomonas vaginalis* 由来 ferredoxin [Crossnoe et al., 2002], *Rhodobacter capsultus* 由来 ferredoxin VI [Sainz et al., 2006]などの結晶構造が明らかとなっている.

RO のコンポーネント間電子伝達

電子伝達反応において、電子は酸化還元電位の低いものから高いものへ受け渡されるため、それぞれのコンポーネントの酸化還元電位が重要になる. クラス IA の RO に属する酵素において、phthalate dioxygenase の酸化還元電位の測定が行われている. Reductase が持つ酸化還元中心の FMN, plant-type [2Fe-2S] クラスタの酸化還元電位がそれぞれ -284 mV, -174 mV であり、terminal oxygenase の Rieske-type [2Fe-2S] クラスタの酸化還元電位が -120 mV であることから [Tarasev et al., 2006], 反応に必要な電子の流れは NADH, FMN, plant-type [2Fe-2S] クラスタ, oxygenase であることが明らかとなった. RO に分類される酵素における terminal oxygenase コンポーネントの [2Fe-2S] クラスタの酸化還元電位は -50 mV から -150 mV 程度と報告されているが [Correl et al., 1992, Rosche et al., 1995, Riedel et al., 1995, Beharry et al., 2003, Tarasev et al., 2006], KA1 株由来 Oxy の酸化還元電位は +160 mV とこれまでの報告例よりも高い酸化還元電位を持つことが明らかとなっている [香月, 2008].

また、クラス IIB や III の RO においては、LB400 株由来 BDO の ferredoxin と CA10 株由来の Fd, IC177 株由来の Fd の酸化還元電位がそれぞれ -157, -169, -185 mV を示す事が明らかになっている [Couture et al., 2001, Nam et al., 2005, Inoue et al., 2009]. また、Rieske-type ferredoxin あるいは Riske ferredoxin のとる酸化還元電位は +300 mV から -200 mV といった、幅の広い酸化還元電位の値を示すことが知られている. これは、His 残基が [2Fe-2S] クラスタに配位しているため、[2Fe-2S] クラスタ近傍の環境により His の pK_a が変化するためであると考えられる. 一般に、N-H 間の水素結合一本に対し約 -70 mV, O-H 間の水素結合一本に対し -140 mV の変化があると報告されている [Hunsicker-Wang et al., 2003].

一方、Plant-type や Proteo-type ferredoxin のとる酸化還元電位は、それぞれ約

-350 mV, -250 mV であり, 一般に低い酸化還元電位を取り, 由来の違いにより酸化還元電位の値の変化は少ない.

電子伝達複合体に関する構造解析は, 現在までにシトクロム関連の複合体が 2 例 [Pelletier and Kraut, 1992; Chen et al., 1994], ferredoxin とその reductase の複合体構造が 6 例報告されている [Morales et al., 2000; Kurisu et al., 2001; Müller et al., 2001; Hagelueken et al., Senda et al., 2007, Sevrioukova et al., 2010] (Fig. 1-7). 特に, Senda らの行った解析は, 電子伝達複合体及び, その酸化還元状態の異なる単体の結晶構造解析により, ferredoxin reductase と ferredoxin の酸化還元依存的な複合体の形成, 解離のメカニズムを明らかにした. 当研究室においては, J3 株由来の Oxy 単体と CA10 株由来の Fd 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 [Ashikawa et al., 2006] (Fig. 1-7a). この解析により, Oxy と Fd 間での相互作用領域が明らかとなり, また, 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. 更に, 酸化還元状態を制御した条件下での結晶構造の取得に成功し, 電子伝達前後の Oxy と Fd の結合と解離のメカニズムも提唱されている [相川, 2010]. RO 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 CARDO 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 RO 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.

P450 は RO のように酸化反応に必要な電子を NAD(P)H から電子伝達タンパク質を経由して受け取るが, 電子伝達タンパク質の数や構造の違いにより, Hannemann ら (2007)により 10 のクラスに分類される. その中でクラス I あるいは II に分類される P450 はクラス IIA 型 RO と同様の電子伝達系を有するが, 近年 P450 においても P450_{scc} (酸化酵素)と adrenodoxin (ferredoxin)複合体の結晶構造が報告された [Strushkevich et al., 2011]. P450_{scc} は酸化酵素:ferredoxin 及び ferredoxin:ferredoxin reductase の両者の結晶構造が明らかになっているが, このことから, ferredoxin がシャトルのように酸化酵素と ferredoxin reductase の間を行き来するというメカニズムが提唱されている.

また, 香月, 井上により, 精製酵素を用いた再構成系においてコンポーネントのクラスを組み替えた場合の CARDO 活性を, CAR 変換活性及び吸光スペクトルの変化を指標とした電子伝達活性を基にコンポーネントの電子伝達互換性の解析が行われた [香月, 2008, Inoue et al., 2009]. その結果を Fig. 1-8 に示す. Oxy と Fd のクラスを入れ替えた場合, 電子は伝達されず, Oxy と Fd では本来の組み合わせでしか電子の受け渡しが出来ないということが明らかとなった. この厳密なカウンターパートの認識は, 他の RO に属する酵素も同様の傾向を示

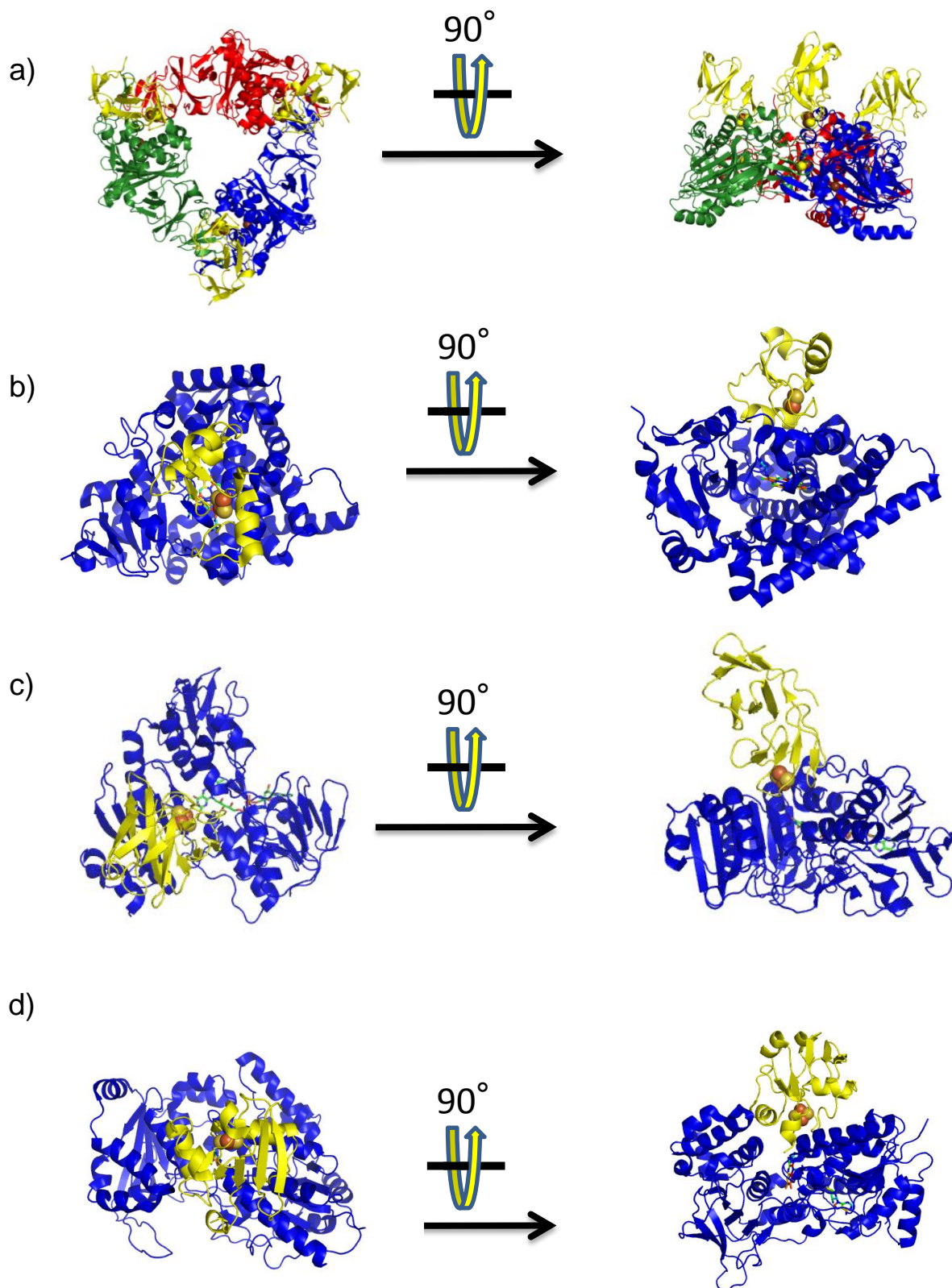


Figure 1-7. RO, P450における電子伝達複合体の立体構造

鉄、硫黄原子をそれぞれ茶、黄色で示した。FADはスティックにて表示した。Chain毎に色分けして示し、a)では深緑、赤、青はOxサブユニットを示し黄色がF_dを示した。b)では、青がBDO-R、黄色がBDO-Fを示した

a)J3株由来Ox:CA10株由来F_d複合体 [Ashikawa et al., 2006],

b)ヒト由来P450_{scc}:Adx複合体 [Strushkevich et al., 2011]

c)KKS102株由来BDO-F:BDO-R複合体 [Senda et al., 2007]..

d)Bovine由来Adx:Adr複合体 [Müller et al., 2001]

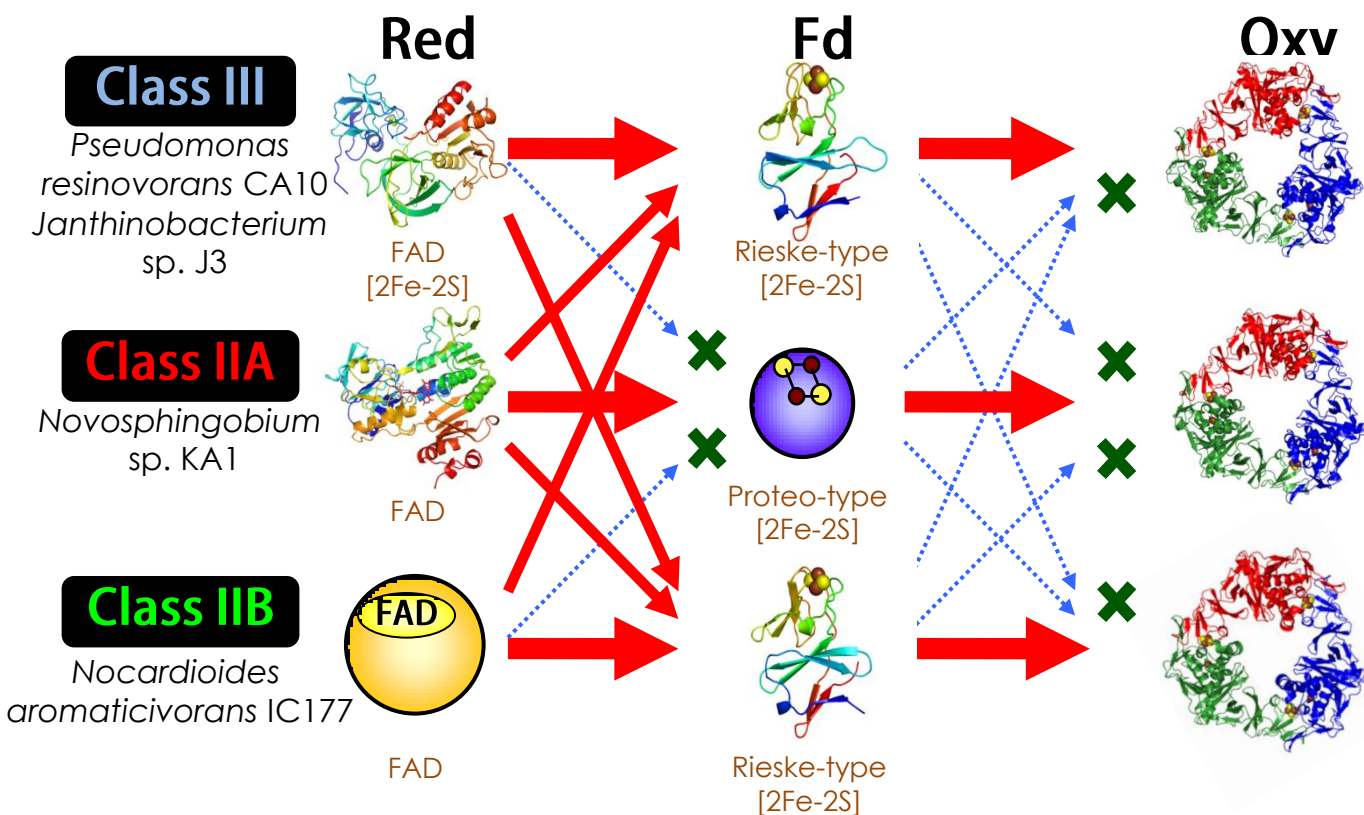


Figure 1-8. CARDOの電子伝達互換性

赤い矢印は電子伝達が可能であることを示し、その太さは電子伝達のし易さを表す。水色の破線矢印は電子伝達不可能であることを示す [香月, 2008, Inoue et al., 2009].

す [Hurtubise et al., 1995]. 一方, Fd と Red では, 他の RO と同様に電子伝達の選択性は低く, 本来の組み合わせではないものでも電子伝達が可能であることが明らかとなった. これも他の RO と同様の傾向を示す [Barriault et al., 1999] しかし, KA1 株由来 Fd は本来の組み合わせでしか電子が伝達されず, 厳密なカウンターパートの認識を持つことが明らかとなった.

これまでに述べてきたように, KA1 株由来 Fd は既知の Fd とはタイプが異なり RO の中でも例の少ない Proteo-type である. 加えて, 他の RO の Fd にはない興味深い特徴を持つが, 今まで詳細な解析がなされていなかった. 更に, CARDO は電子伝達系に多様性があるという, RO の中でも特異な特徴を持つため, CARDO は RO の電子伝達メカニズムを解明する上で格好の材料となることが考えられる. また, RO は P450 と電子伝達系が類似しているため, CARDO の電子伝達メカニズムの研究は RO のみならず電子伝達タンパク質に一般のメカニズムを提唱できる可能性がある.

そこで, CARDO の電子伝達メカニズムの解明に向けた研究の一環として, 本研究では, これまでに成されていなかった, KA1 株由来 Fd の機能・構造解析, IC177 株由来 Red の結晶構造解析を行い, 他の類似タンパク質との機能と構造の違いを明らかにした (第 2 章), また, これらの構造情報を用いて電子伝達互換性を決定づける構造的要因についての解析を行った (第 3 章).

なお, 以降では, それぞれの CARDO が属するクラスに基づき, KA1 株由来, IC177 株由来, CA10 株, J3 株由来 Oxy, Fd, Red は以下のように表記する.

	Terminal oxygenase	Ferredoxin	Ferredoxin reductase
KA1 株由来 (クラス IIA)	Oxy _{IIA}	Fd _{IIA}	Red _{IIA}
IC177 株由来 (クラス IIB)	Oxy _{IIB}	Fd _{IIB}	Red _{IIB}
CA10, J3 株由来 (クラス III)	Oxy _{III}	Fd _{III}	Red _{III}

第二章 CARDO コンポーネントの機能解析

2-1. 緒言

本章は、CARDO の電子伝達機構について解明するために、結晶構造が明らかとなっていなかった Fd_{IIA} 及び Red_{IIA} の結晶構造解析を行うことを目的とした。また、機能解析の一環として、 Fd_{IIA} の触媒する電子伝達反応に重要な要素の一つである酸化還元電位を測定した。

2-2. 結果と考察

2-2-1. Fd_{IIA}の基礎的な解析

2-2-1-1. Fd_{IIA}発現用プラスミドの構築

Fd_{IIA} は精製のための時間を短縮することを目的として、His-tag を用いたアフィニティークロマトグラフィを利用することとした。Proteo-type ferredoxin は C 末端側が [2Fe-2S] クラスタの近くに存在するため、C 末端側に His-tag を付加させると電子伝達複合体の形成に悪影響を起す可能性が考えられたことから、N 末端に His-tag を付加させるようなプラスミドを構築し、塩基配列の確認を行い、発現用プラスミドを構築した。

2-2-1-2. Fd_{IIA}の精製

Fd_{IIA} は N 末端に His-tag が付加された状態で発現されることから、アフィニティークロマトグラフィ及びゲル濾過クロマトグラフィの二段階の精製を行った。ただし、結晶化に用いる Fd_{IIA} はイオン交換クロマトグラフィをアフィニティークロマトグラフィとゲル濾過クロマトグラフィの間に行うことで、より精製度を高めた。各精製段階でのタンパク質を tricine SDS-PAGE に供したものを Fig. 2-1 に示す。精製によって Fd_{IIA} が得られたことが確認できた。二段階での精製では、Fd_{IIA} の分子質量である 12.3 kDa 付近と約 30 kDa 付近に二つのバンドが見られたが、概算して 90%以上の精製度であった。三段階の精製操作を行うことで、ほぼ単一のバンドになるまで Fd_{IIA} を精製することが出来、概算して 95%以上の精製度の Fd_{IIA} を取得出来た。タンパク質の収量は、SB 培地 1 L 当たりにつき約 5 mg であった。

2-2-1-3. Fd_{IIA}の吸光スペクトル

吸光度測定の結果を Fig. 2-2 に示す。波長 410 nm, 460 nm 付近に酸化型 Proteo-type [2Fe-2S] クラスタの持つ特有なピーク [Armengaud et al., 1997]に一致するピークが見出された。また、Fd_{IIA} に電子を受け渡す Red_{IIA} の微量存在下で NADH を添加すると、これらのピークが消失し新たに 540 nm 付近にピークが現れた。このピークは還元型 Proteo-type [2Fe-2S] クラスタに特有なピーク [Armengaud et al., 1997]であり、精製されたタンパク質は Fd_{IIA} であることを確認すると共に、Fd_{IIA} は電子を受け取ることが出来る、すなわち活性のある状態で精製されていることを確認した。

2-2-2. Fd_{IIA}の酸化還元電位の測定

これまでに酸化還元電位が判明している CARDO コンポーネントは Oxy_{IIA}, Fd_{IIB} 及び Fd_{III} であり、その値はそれぞれ、+160 mV, -185 mV, -169 mV である[Nam et al., 2005, Inoue et al., 2009]. タンパク質の酸化還元電位は、電子伝達の可否を決める上で重要な性質であ

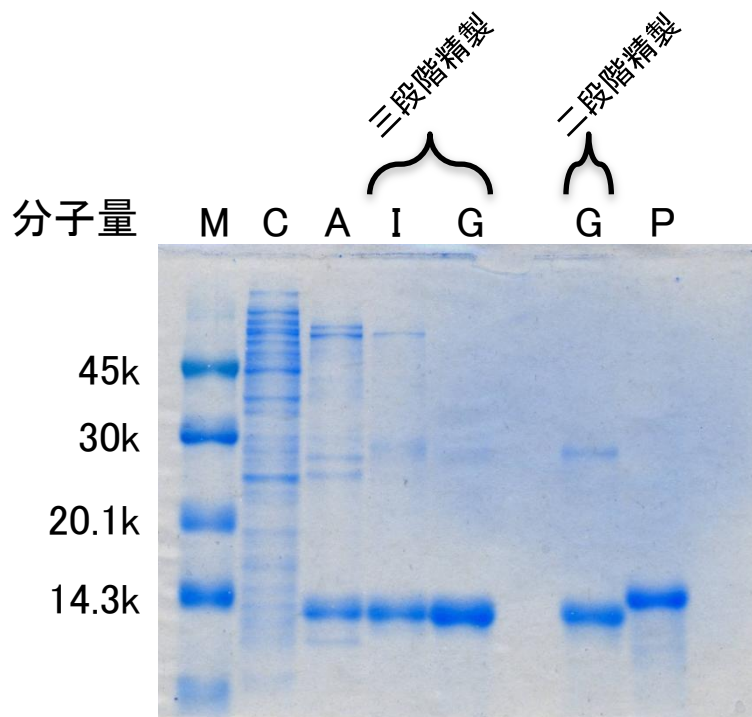


Figure 2-1. 各精製段階でのSDS-PAGEの結果

M: マーカー, C: 粗酵素抽出液, A: アフィニティクロマトグラフィ後, I: イオン交換クロマトグラフィ後
G: ゲル濾過クロマトグラフィ後, P: F_{dIII}.

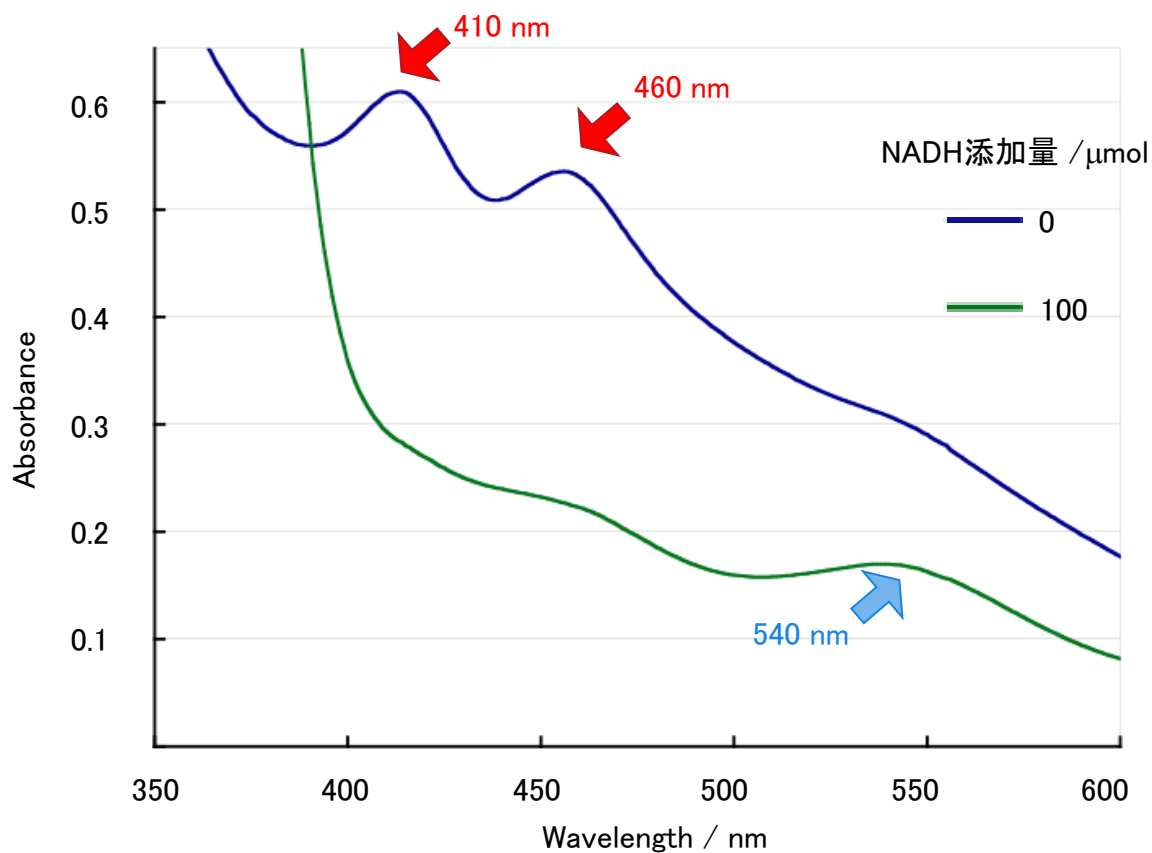


Figure. 2-2. Fd_{IIA} の吸光スペクトル

80 μM の Fd_{IIA} 、0.2 μM の Red_{IIA} を含む溶液の吸光スペクトルを示す。

青: 精製直後の Fd_{IIA} の吸光スペクトル. 赤い矢印は酸化型Proteo-type [2Fe-2S]クラスタ特有に現れるピークを示す。

緑: 酸化型 Fd_{IIA} にNADHを100 μmol 加え、還元した際の吸光スペクトル. 水色の矢印は還元型Proteo-type [2Fe-2S]クラスタ特有に現れるピークを示す。

る。なぜならば、酸化還元電位の高いものから低いものには電子は自発的に伝達されないからである。このため、電子伝達の選択性が酸化還元電位の違いに起因する可能性が大いに考えられる。このことから、Fd_{IIA} の酸化還元電位を決定することは CARDO_{IIA} の電子伝達システムを明らかにする上で不可欠である。

酸化還元電位の測定は cyclic voltammetry により行った。結果を Fig. 2-3a に示す。まず、水の電気分解が起こらない-800 mV から 700 mV までの範囲での測定を行った。その結果、cyclic voltammetry で酸化、還元両方のピークが確認された。このピークが Fd_{IIA} に由来するものである確認のために、[2Fe-2S]クラスターが抜け落ちたと考えられる Fd_{IIA} の測定も行った。これは、Fd_{IIA} を常温で数日間静置することで得られるものであり、精製直後は濃い茶色をしていた Fd_{IIA} の色が抜けてほぼ無色になったものである。Fd_{IIA} とアミノ酸配列の相同性の高い Pdx でも同様の現象が起こることが確認されており [Sevrioukova et al., 2003], Sevrioukova らはタンパク質表面に存在する Cys 残基がジスルフィド結合を形成し、それに伴う構造変化によって[2Fe-2S]クラスターが落ちたものだと考察している。色の抜けた Fd_{IIA} のサイクリックボルタモグラムの Fig. 2-3b に示す。Fd_{IIA} では見られたピークが消失したため、このピークは Fd_{IIA} に由来するものであることが明らかとなった。次に、電位の範囲を 400 mV から -200 mV まで狭めた条件において測定を行った。結果を Fig. 2-4 に示す。それぞれのピークの中点から Fd_{IIA} の酸化還元電位を求めると、標準水素電極電位に換算して +107 mV という値になった。

これまでに、Fd_{IIA} と同様の活性中心を持つ ferredoxin は plant-type ferredoxin, Proteo-type ferredoxin と thioredoxin-type ferredoxin の三種類があるが、plant-type ferredoxin の酸化還元電位の値は一般的に -350 mV [Weber-Main et al., 1998], Proteo-type ferredoxin に分類される、P450_{sc} の ferredoxin コンポーネントである adrenodoxin (Adx), P450_{cam} の ferredoxin コンポーネントである putidaredoxin (Pdx), *Sphingomonas wittichii* RW1 株由来 dioxin dioxygenase の ferredoxin コンポーネントの酸化還元電位は、それぞれ、-274 mV, -245 mV, -230 mV をとる [Grinberg et al., 2000, Armengaud et al., 1997, Ewen et al., 2011]. Plant-type と Proteo-type では前者が光合成に関与し、後者が酸化反応に関与するという役割の違いにより酸化還元電位に約 100 mV の違いがあるが、同様の役割を果たす、すなわち同一の type の中では由来の違いにより酸化還元電位の値に大きな差がない。これまでに酸化還元電位が明らかとなっている 4Cys [2Fe-2S] ferredoxin (plant-type, Proteo-type ferredoxin の総称としてこの表記を用いる)の中で最も高い値をとるものは dicamba demethylase の ferredoxin コンポーネント (Proteo-type)であり、その値は -171 mV である [Herman et al., 2005].

この様な背景及び、CARDO_{IIA} コンポーネントの酸化還元電位の値から、Fd_{IIA} の酸化還元電位は -150 mV 程度であろうと予想していたが、実際の値は予想とは大きく異なるものであった。Oxy_{IIA} と Red_{IIA} のもつ酸化還元電位の値と Fd_{IIA} のそれとの関係から、CARDO_{IIA} 内の電子伝達におけるそれぞれのコンポーネントの酸化還元電位の妥当性を評価するためにそれぞれのコンポーネントの酸化還元電位を次に示す。先に述べた様に Oxy_{IIA} の酸化還

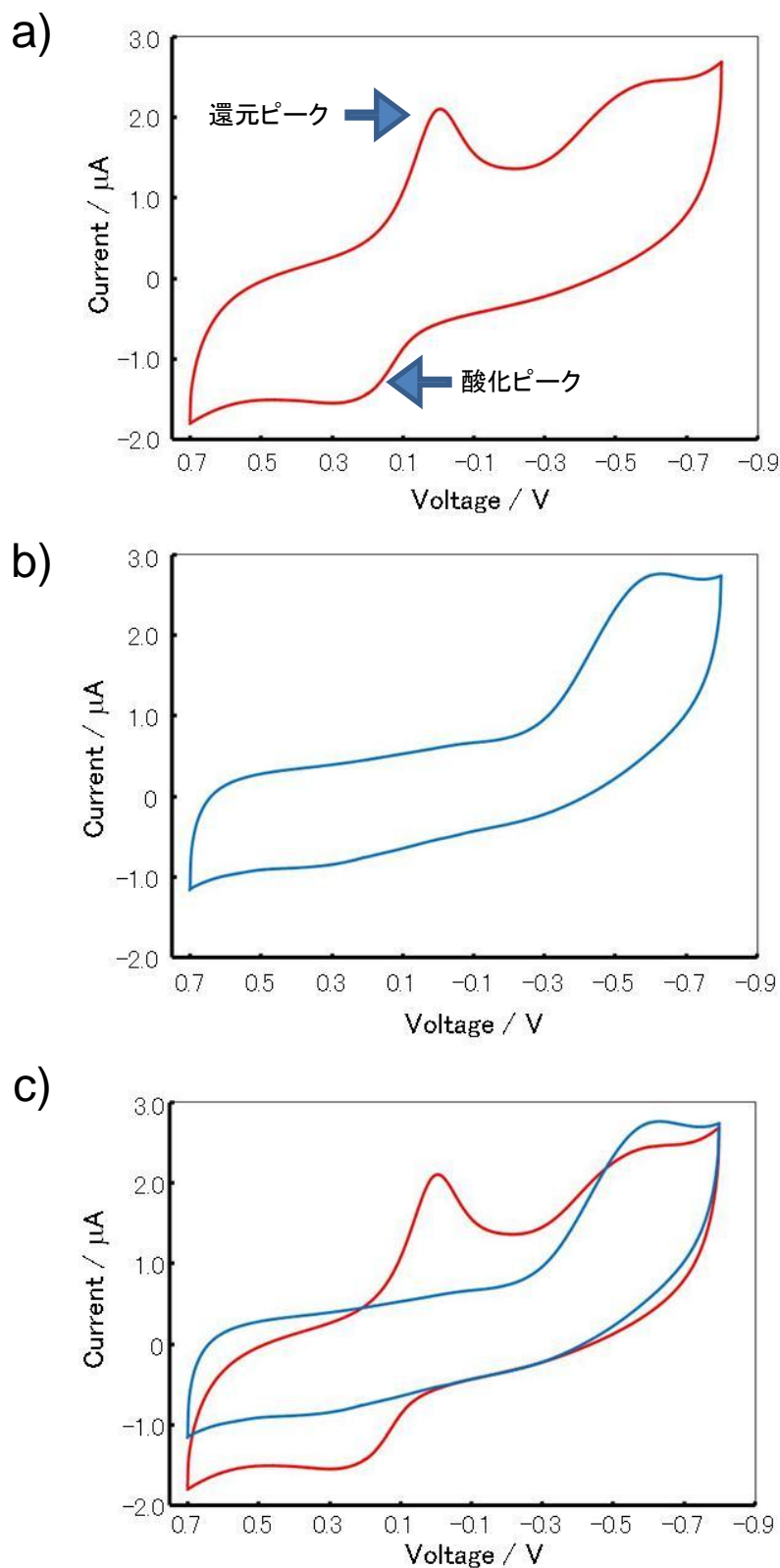


Figure 2-3. 活性型 Fd_{IIA} , 不活性型 Fd のcyclic voltammogram

1 mM Fd_{IIA} , 1 mM DTT, 50 mM Tris-HClを含む溶液を測定した結果を示す。横軸が電位を縦軸は電流値を表す。掃引範囲は-800 mVから+700 mV, 掃引速度は100 mV/sの条件にて測定を行った。酸化還元電位は標準水素電極電位に換算した値を示す。

a): 活性型 (赤)

b): 不活性型 (青)

c): 不活性型と活性型の結果を重ね合わせた図

活性型において見られたピークが不活性型では見られなくなった。

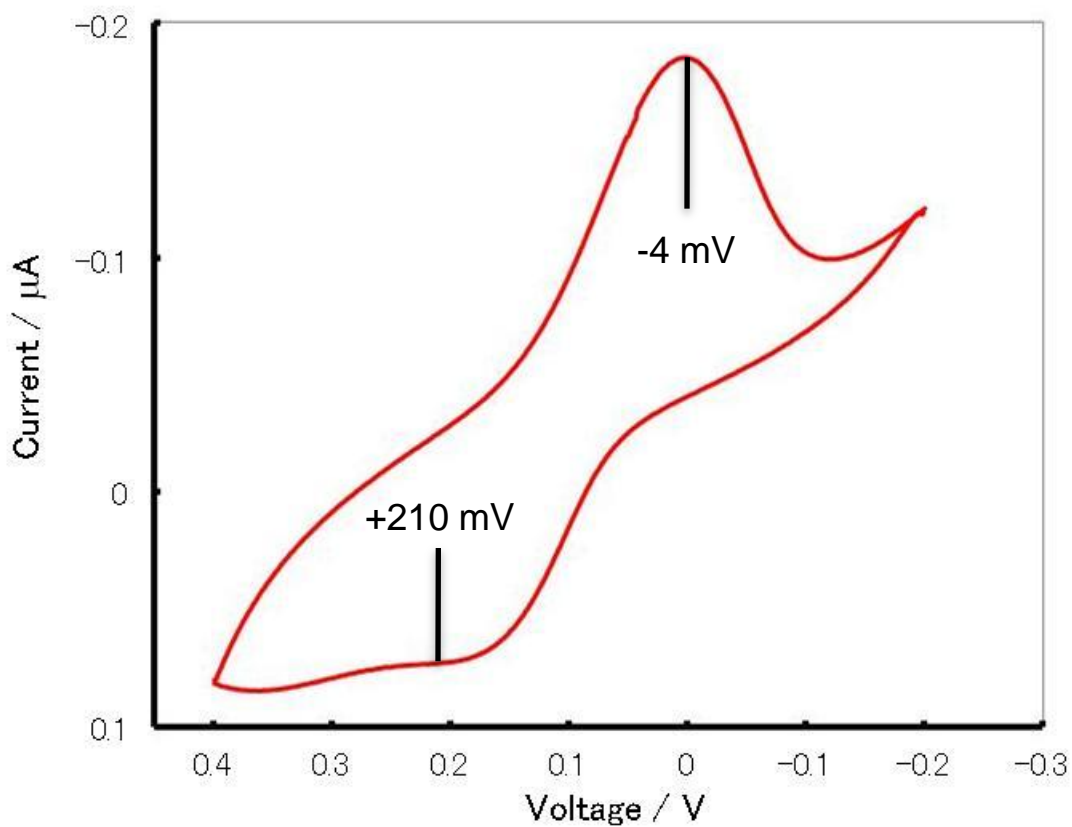


Figure 2-4. 活性型Fd_{IIA}のcyclic voltammogram

1 mM Fd_{IIA}, 1 mM DTT, 50 mM Tris-HClを含む溶液を測定した結果を示す. 横軸が電位を縦軸は電流値を表す. 掃引範囲は-200 mVから+400 mV, 掃引速度は10 mV/sの条件にて測定を行った. 酸化ピークの時の電位は+ 210 mV, 還元ピークの時の電位は-4 mVであったことから, その中央値である+ 107 mVをFd_{IIA}の酸化還元電位とした.

元電位はそれぞれ+160 mV であり, Red_{IIA} の酸化還元電位は明らかとなっていないものの, Fd_{IIB} や Fd_{III} に (それぞれ-185 mV, -169 mV [Nam et al., 2005; Inoue et al., 2009]) 電子を渡す事が出来る事から, それらよりも低い酸化還元電位をとると考えられる. このことから, Fd_{IIA} の酸化還元電位はその間の値であるため, クラス内においては電子伝達反応を触媒するに妥当な結果であると考えられる.

また, Red_{IIB} や Red_{III} の酸化還元電位は測定されていないが, Red_{IIA} の場合と同様に, Red_{IIB} や Red_{III} は Fd_{III} や Fd_{IIB} の酸化還元電位よりも高い値をとることはない. そのため, Fd_{IIA} が他のクラスの Red から電子を受け取ることが出来ないのは酸化還元電位の違いが主原因ではないことが考えられる. 一方で, Oxy_{IIB} や Oxy_{III} の酸化還元電位も Red と同様に測定されていないものの, RO に属する他の RO の oxygenase コンポーネントの酸化還元電位は, -50 mV から-150 mV であるという報告があり [Correl et al., 1992, Rosche et al., 1995, Riedel et al., 1995, Beharry et al., 2003, Trasev et al., 2006], 一般的に負の値をとる. Fd_{IIB} や Fd_{III} のとる酸化還元電位は, 他の RO における ferredoxin と同様のであるため, Oxy_{IIB} や Oxy_{III} は Oxy_{IIA} とは異なり, 一般的な RO のとる酸化還元電位である可能性も考えられる. このため, Oxy_{IIB} や Oxy_{III} の酸化還元電位がこれらと同様の値をとると仮定すると, Fd_{IIA} はそれよりも高い値になってしまうため, Fd_{IIA} が他のクラスの Oxy に電子が渡せないのは酸化還元電位が原因になっている可能性が考えられる. Oxy_{IIB} や Oxy_{III} の酸化還元電位がどのような値をとるか大変興味深い.

これまで述べてきたように, Fd_{IIA} の酸化還元電位は他の 4Cys [2Fe-2S] ferredoxin よりも約 300 mV も高い値をとる. これまで, 高い酸化還元電位を示す ferredoxin としては, 呼吸鎖 bc 複合体に含まれる ISF (iron-sulfur fragment) が中性付近で+265 mV から+320 mV という高い酸化還元電位が知られている. しかしこれは, Rieske タンパク質であり, Fd_{IIA} とはリガンドのタイプが異なるものである. 一方, [2Fe-2S] クラスタが Cys のみにより配位される ferredoxin には [2Fe-2S]型, [3Fe-4S]型, [4Fe-4S]型があるが, いずれの ferredoxin も低い酸化還元電位をとる (*Clomatum pvinosum* 由来 2[4Fe-4S] ferredoxin: -400 mV [Kyritsis et al., 1998], *Sulfolobun acidocaldarius* 由来[3Fe-4S][4Fe-4S] ferredoxin: -275 mV [Breton et al., 1995]). しかし, 唯一の例外として, 高電位鉄硫黄タンパク質 (HiPIP, high potential iron-sulfur protein) と呼ばれる [4Fe-4S]型 ferredoxin が報告されており, その酸化還元電位は+50 mV から+450 mV である [Sticht and Rosch, 1998]. 4Cys [2Fe-2S]型 ferredoxin ではこれまでに高い酸化還元電位を示すものの報告例がないことから, Fd_{IIA} は [2Fe-2S]型 クラスタを持つ ferredoxin の中での初の HiPIP の報告例であるといえる.

2-2-3. Fd_{IIA} の結晶構造解析

2-2-3-1. Fd_{IIA} の好気条件下における結晶化の試み

タンパク質濃度は 5-25 mg/mL の間で行った. 好気条件下において幾つかの条件でタンパ

ク質の凝集が確認された。その条件と凝集の状態を Table 2-1 に示す。これらの条件では、同じ reagent の組成であってもドロップが異なれば凝集の形が変化していた。また、得られた凝集物に対して X 線回折データの取得を試みたが、回折データの取得が行えないことから、これは結晶ではなくアモルファスではないかと考えられた。

2-2-3-2. Fd_{IIA} の安定性の解析

好気条件、嫌気条件にて室温で静置した Fd_{IIA} の吸光スペクトルを Fig. 2-5 に示す。前章で述べた通り、Fd_{IIA} と相同性の高い Pdx は精製直後には濃い茶色をしているが、数日経つと色が抜け落ちてしまうという報告がある [Sevrioukova et al., 2003]。Fd_{IIA} でも同様の現象が起こり、精製直後には見られた Proteo-type [2Fe-2S] クラスタに特有なピーク (Fig. 2-5 青) が室温で三日間静置した後は消失していた (Fig. 2-5 緑)。Pdx においては、分子表面に存在する Cys 残基が酸化されることで分子間ジスルフィド結合を形成し、それに伴う構造変化によって [2Fe-2S] クラスタが抜け落ちてしまうことが安定性の低さの原因であると考えられている。この Cys 残基は Fd_{IIA} でも保存されていることから Fd_{IIA} も同様の機構により不安定化が起きている可能性が考えられる。色が抜け落ちてしまった Fd_{IIA} を不活性型 Fd_{IIA} とした。一方、嫌気条件下では室温で静置したこと、あるいは溶液中に微量に残存した酸素が原因であると考えられるタンパク質の失活と思しき吸光度の低下はみられたものの、好気条件下の時と比べて格段に安定性が増していることが明らかとなった (Fig. 2-5. 赤)。

Pdx の結晶構造解析を行うために、Sevrioukova らは分子表面に存在する Cys 残基を Ser に変異させることで分子間ジスルフィド結合の形成を防ぎ、安定性を上昇させ、結晶化に成功した [Sevrioukova et al., 2003]。Fd_{IIA} は嫌気条件下において比較的安定に存在することが明らかとなったため、嫌気条件下での Fd_{IIA} の結晶化を行った。

2-2-3-3. 嫌気条件下における Fd_{IIA} の結晶化

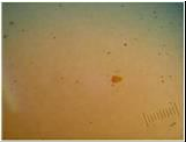
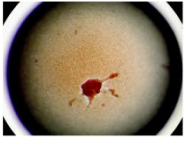
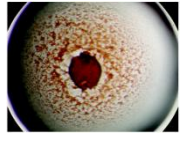



嫌気条件下において得られた結晶を Table 2-1 最下段に示す。大きさが 0.25 x 0.2 x 0.05 mm 程度の平板状結晶が得られた。結晶の生成には 20°C で約 2 週間の incubation を要した。

嫌気条件下で結晶が得られた条件を好気条件下において試してみたが、結晶は生成しなかった。好気条件下においては 2 週間の incubate の過程で Fd_{IIA} の不活性化が起こる。これにより Fd_{IIA} の三次構造が保持されなくなり、好気条件下において結晶が得られなかったと考えられる。また、得られた結晶のほとんどはカバーガラスに貼り付いた状態で生成していた。

2-2-3-4. X 線回折データの収集

得られた結晶を用いて高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory において X 線データの取得を行った。結晶化 reagent をそのまま抗凍結剤として使用し、X 線を照射したところ、分解能 1.9 Å の反射データが得られた。最大で 1.6 Å 以上の反射点が得られていたが、

Table 2-1. 凝集あるいは結晶生長の見られた条件

写真	結晶化試薬	結晶化条件
	0.33 M HEPES sodium pH 7.5 0.67% (v/v) Polyethylene glycol 400 0.67 M Ammonium sulfate	好気条件下 20°C
	0.01 M Cobalt (II) chloride hexahydrate 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6 1.0 M 1,6-Hexanediol	好気条件下 5°C
	30% MPD 0.1 M Na Acetate pH 4.6 0.02 M Calcium Chloride	好気条件下 5°C
Fd _{IIA} 	0.1 M Ammonium acetate 0.1 M Bis-Tris pH 5.5 17% w/v Polyethylene glycol 10,000	好気条件下 5°C
	1.0 M Sodium citrate CHES pH9.5	好気条件下 5°C
	0.05 M Calcium chloride dihydrate 0.1 M Bis-Tris pH6.5 30% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550	嫌気条件下20°C

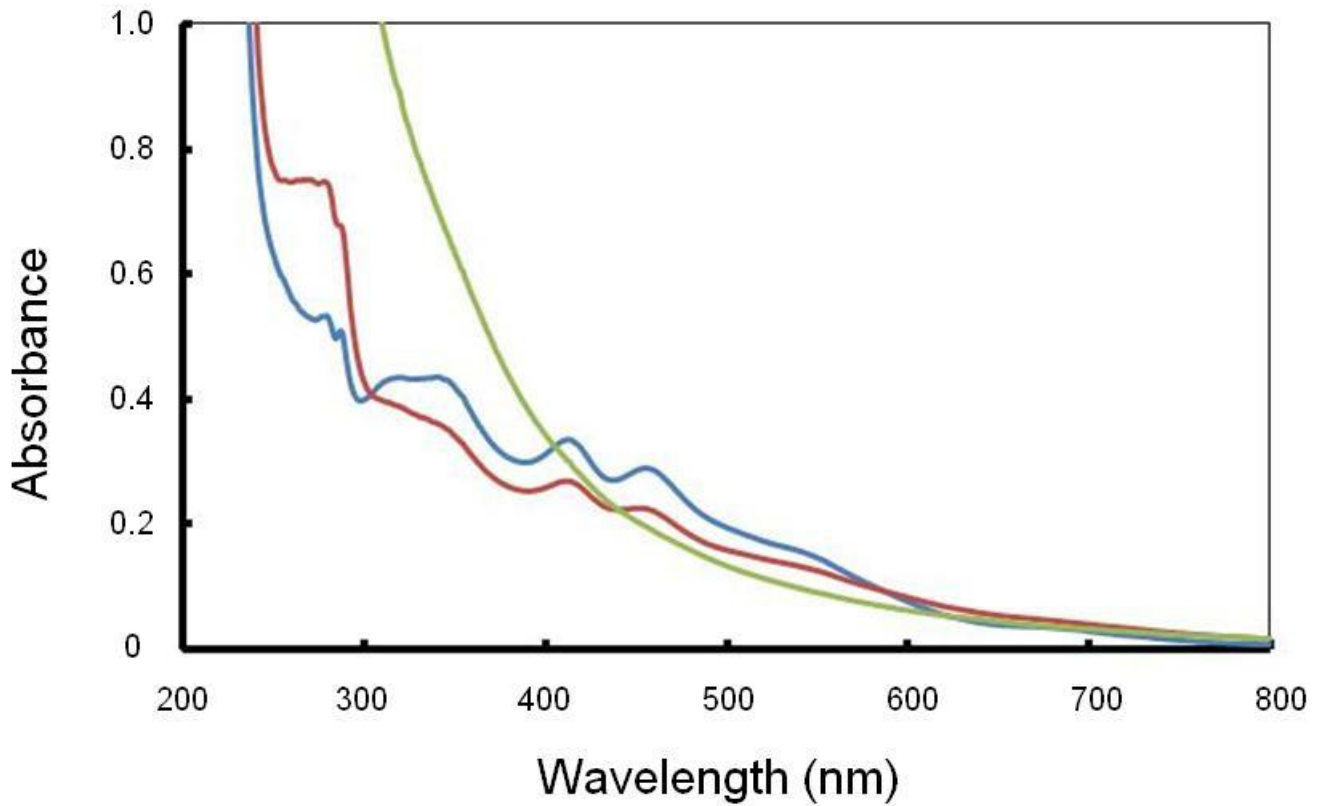


Figure 2-5. Fd_{IIA}の吸光度による安定性の解析

100 mMのFd_{IIA}溶液の吸光スペクトルを示す. 200 nmから800 nmの範囲で吸収スペクトルを測定した.

青: 精製直後のFd_{IIA}

赤: 精製後, 嫌気条件下において室温で3日間静置したFd_{IIA}

緑: 精製後, 好気条件下において室温で3日間静置したFd_{IIA}.

分解能を高めにして *scaling* を行うと R_{merge} が大きくなり過ぎてしまい (>50%), 明瞭な電子密度が観察されなくなったことから, R_{merge} が 35% 以下になるように分解能 1.9 Å で *scaling* を行った. R_{merge} が高くなる原因に関しては, 結晶がカバーガラスに張り付いていたことが考えられる. カバーガラスの表面は微視的に見ると平らではないと考えられ, 凹凸が原因で結晶が生成する過程でタンパク質が奇麗に積み重なることが出来なくなったと推測される. あるいは, 結晶をカバーガラスから剥がす際には結晶にある程度の力を加えなければならないため, それが結晶中でのタンパク質の並びをいくらか崩してしまっただけの可能性もある. 実際, 結晶の *mosaicity* は 0.8 を超えていた.

この結晶の空間群は $C222_1$ であり, その格子定数は $a = 53.4 \text{ \AA}$, $b = 77.8 \text{ \AA}$, $c = 43.5 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ であった. 非対称単位内に存在する Fd_{IIA} の分子数を推定するために V_M 値 [Matthews, 1968] を計算した. その結果, 非対称単位内に 1 分子の Fd_{IIA} が存在すると仮定したときに $1.83 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ という値となり, 適正な V_M 値となった. この時の溶媒含量は 33.0% であった. 結晶学的パラメータを Table 2-2 示す.

2-2-3-5. 分子置換法による Fd_{IIA} の構造決定と精密化

Pdx の NMR 構造 (PDB ID: 1PDX) をモデル分子とした分子置換法によって初期位相の決定を行い, Fd_{IIA} の立体構造を求め, 構造の修正と評価, 精密化を重ねた. R 因子 19.4%, フリー R 因子 25.4% まで精密化を行った. R 因子と比べてフリー R 因子が高いが, これは結晶の *mosaicity* が高いこと, 結晶中の水分含量が大きいことが原因と考えられる. 更なる精密化を試みたが, フリー R 因子は下がらなかった. また, 大きな $F_o - F_c$ マップが見られなかったこと, 及び Ramachandran plot において全てのアミノ酸残基が許容値をとったため, これを最終構造とし, 本論文における構造-機能相関解析にはこの構造を使用した. 精密化パラメータを Table 2-2 に示す. N 末端は Met 残基に相当する電子密度が見えており, 構造を決定できたが, C 末端の 108 番目の Gln と 109 番目の Leu に相当する電子密度は disorder しており, この部分の構造は決定できなかった.

2-2-4. Fd_{IIA} の結晶構造

2-2-4-1. Fd_{IIA} の全体構造

Fd_{IIA} の全体構造を Fig. 2-6 に示す. Fd_{IIA} は人為的に付加した His-tag を除くと $30 \times 35 \times 35 \text{ \AA}$ 程度の大きさをしていて, Fd_{IIA} は 4 つの α ヘリックス ($\alpha 1$: Leu27-Asn34, $\alpha 2$: V58-Arg63, $\alpha 3$: Ser88-Glu90, $\alpha 4$: Ser88-Gln90) と 5 つの β ストランド ($\beta 1$: Thr6-Ala11, $\beta 2$: Gly14-Val21, $\beta 3$: His53-Ile55, $\beta 4$: Ser85-Leu87, $\beta 5$: Ala101-Asn101) 構成される. $\beta 1$ と $\beta 2$ と $\beta 5$, $\beta 3$ と $\beta 4$ はそれぞれ逆平行 β シートを形成していた. この三次構造は他の Proteo-type Fd で保存されていた. また, Val40 から Cys52 までの領域はループ構造をしており, [2Fe-2S] クラスタと結合していた.

Table 2-2. Fd_{IIA}の結晶学的パラメータ

	Fd _{IIA}
Beamline	BL6A
Wavelength (Å)	1.0000
Space group	C222 ₁
Unit cell parameters (Å, °)	$a = 53.373$ $b = 77.815$ $c = 43.469$ $\alpha = \beta = \gamma = 90$
Resolution range (Å)	30.93–1.90
No. of reflections	50995
No. of unique reflections	7436 (715)
Completeness (%)	99.9 (100)
average I/s	43.1 (7.3)
R _{sym} (%)	6.5 (32.8)
Multiplicity	6.9 (6.9)
Refinement	
R (%)	19.4
R _{free} (%)	25.5
RMSD	
Bond lengths (Å)	0.009
Bond angles (°)	1.38

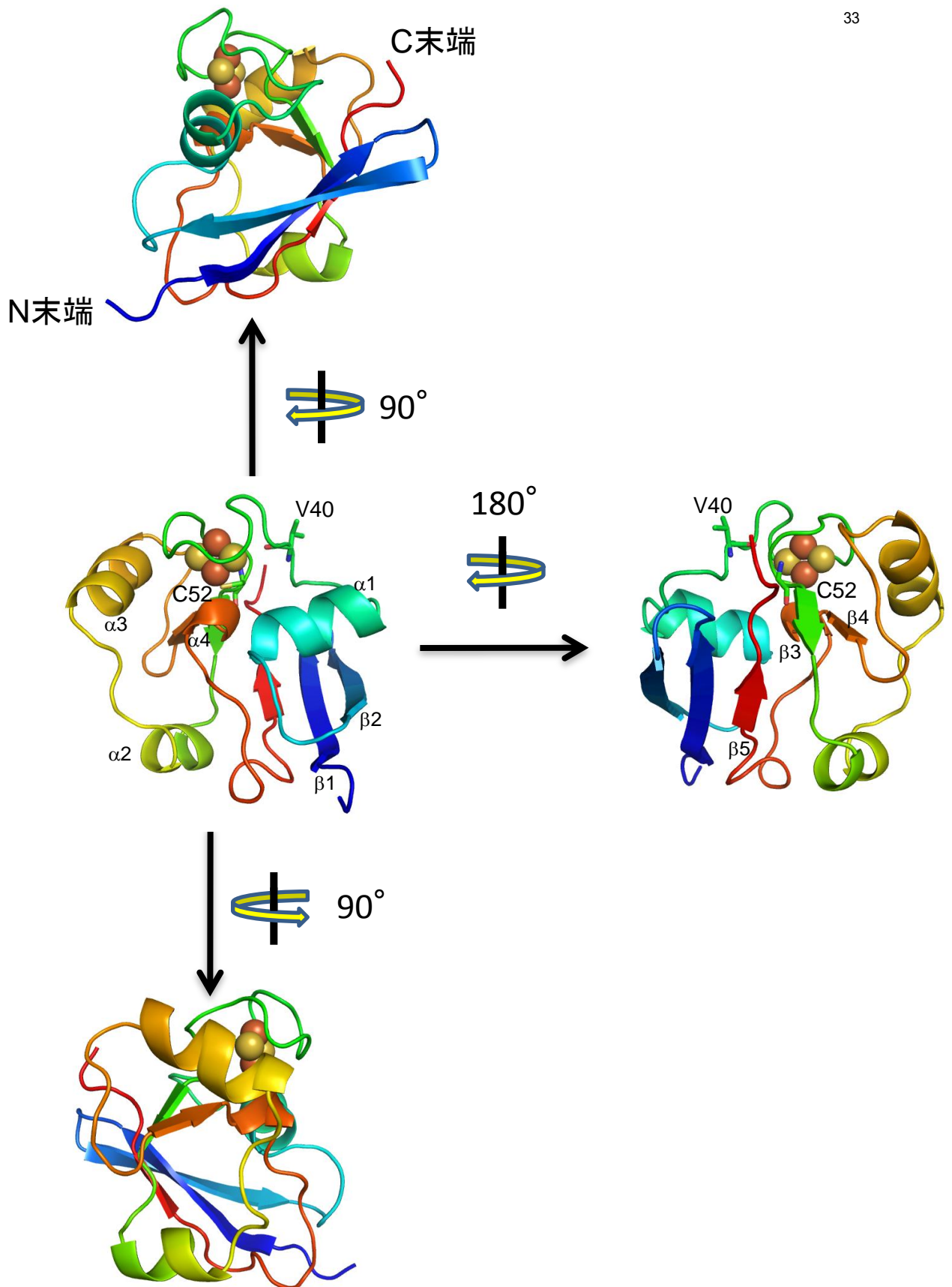


Figure 2-6. Fd_{IIA}の全体構造

鉄原子, 硫黄原子をそれぞれ茶色, 黄色の球で表示した。タンパク主鎖はN末端からC末端に進むに従い, 青→水色→緑→黄緑→黄色→橙→赤となるように色付けした。クラスタ結合ループの始まりと終わりの残基をスティックで表示した。αヘリックス及びβシートを表示した。

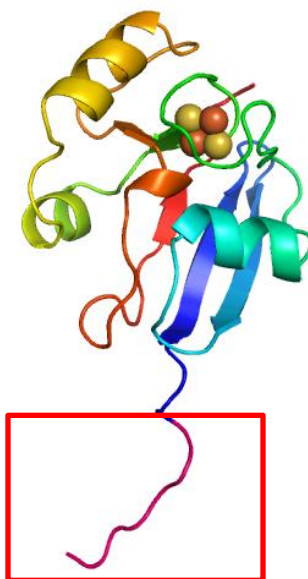
His-tag は[2Fe-2S]クラスターの反対側に位置しており、電子伝達反応には大きな影響を与えないことが考えられた。His タグ (6 残基、本論文では4 番目から 1 番目までの残基番号をつけた)を含めた Fd_{IIA}の構造を Fig. 2-7 に示す。また、His-3 と His0 が Fe 原子と配位しており、更にこの Fe 原子は隣の Fd_{IIA} 分子の His-3 と His0 及び水分子と 5 つの配位結合を形成していた。Fd_{IIA} の結晶化条件には含まれていないが、失活した Fd_{IIA} から抜け落ちた Fe イオンあるいは精製操作で取り除けなかった Fe イオンであると推測された。His タグは二次構造をとっておらず、また、Fd_{IIA} から突出しており、結晶化の妨げになると考えられるが、Fe への配位により His-tag の構造が固定化され、結晶化が成功した可能性が考えられる。

2-2-4-2. クラスの異なる Fd の構造比較

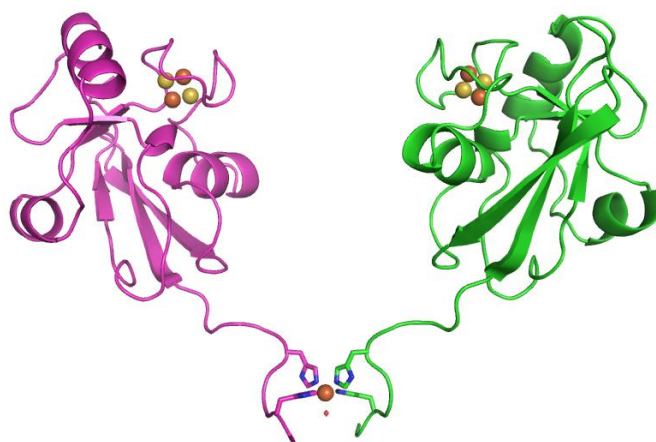
異なるクラスに属する Fd_{IIB} と Fd_{III} の構造[Nam et al., 2005, Inoue et al., 2009]と Fd_{IIA} の構造を重ね合わせた図を Fig. 2-8 に示す。Fd_{IIA} は Rieske-type である Fd_{IIB}, Fd_{III} と異なる Proteo-type であり、アミノ酸配列の同一性も低い (<13%)。また、Fd_{IIB} と Fd_{III} の大きさは共に 25×30×45 Å 程度であるため、Fd_{IIA} はこれらと比べてより球状に近い形状をしている。三次構造も異なっており、Fd_{IIB} と Fd_{III} は 3 つの β シートと 2 つの短い α ヘリックスからなり、Fd_{IIA} よりも β シートの占める割合が大きい。また Fd_{IIA} の [2Fe-2S]クラスターのリガンドを含むループは 1 本の連続したペプチド領域から成る (Val40-Cys52)のに対し、Fd_{IIB} と Fd_{III} のそれは 2 本の別々のポリペプチド領域から成る (Fd_{IIB}, Cys51-Slu55, Cys72-Gly77, Fd_{III}: Cys45-Ile50, Cys65-Gly70)という点も異なる。このため、secondary structure matching では構造の重ね合わせが出来なかった。Fig. 2-8d は、[2Fe-2S]クラスターと、それに配位している原子のみでの重ね合わせを行ったものを示す。

電子伝達反応の際にはカウンターパートとのタンパク質複合体の形成が必須である。Oxy_{III}:Fd_{III} 複合体において、Fd_{III} は Oxy_{III} の窪んでいる領域に [2Fe-2S]クラスター側から突き刺さるようにして結合することが明らかとなっている (Fig. 1-7a)。クラス IIB に属する BDO-F (BDO の ferredoxin コンポーネント)と BDO-R (BDO の ferredoxin reductase コンポーネント)の場合も BDO-F は BDO-R の窪んだ領域に対して結合している (Fig. 1-7c)。タンパク質複合体形成に直接関与するであろう Fd_{IIA} と他のクラスの Fd の間の構造上の大きな違いは、Fd_{IIA} のみに存在する [2Fe-2S]クラスター付近の α ヘリックス (α1, α3)であった (Fig. 2-8d)。このヘリックスがある故に、Fd_{IIA} はより球状に近い構造となり、相互作用領域が広がっている可能性が考えられた。特に α3 は [2Fe-2S]クラスターの真横に存在するため、電子伝達複合体形成時にこのヘリックスの大きなシフトが伴わないとすれば、広い相互作用領域をもつ Fd_{IIA} をカウンターパートとする Red_{IIA}, Oxy_{IIA} は相互作用領域、すなわち窪んだ領域の面積が広がっていると考えられ、この面積の違いが電子伝達の可否に関わる可能性は十分高いと考えられる。

a)



b)



c)

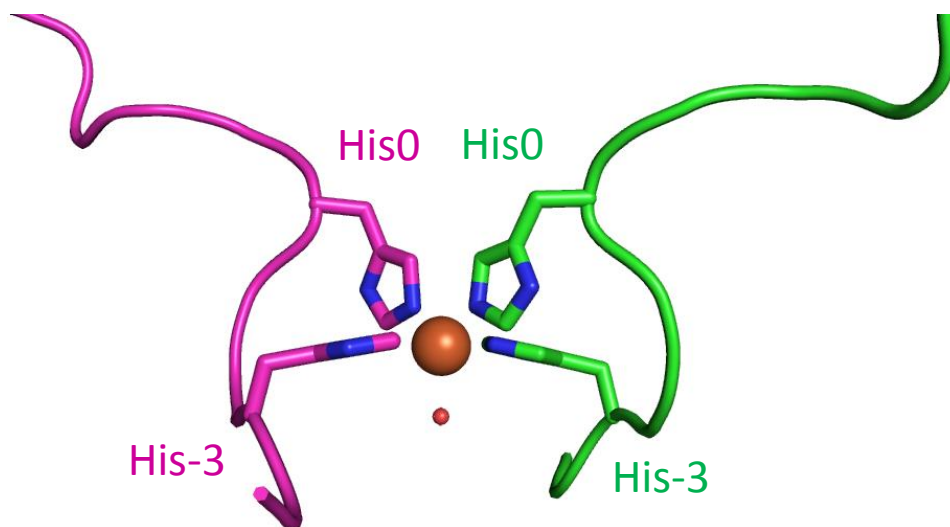


Figure 2-7. Hisタグを含めたFd_{IIA}の全体構造

a): 全体構造. Hisタグ領域を赤い四角で示した.

b): 結晶中でのHisタグを介したFd_{IIA}の相互作用.

c): 鉄原子のHisと水による配位の様子. 鉄, 水はそれぞれ茶色, 赤色の球で示した.

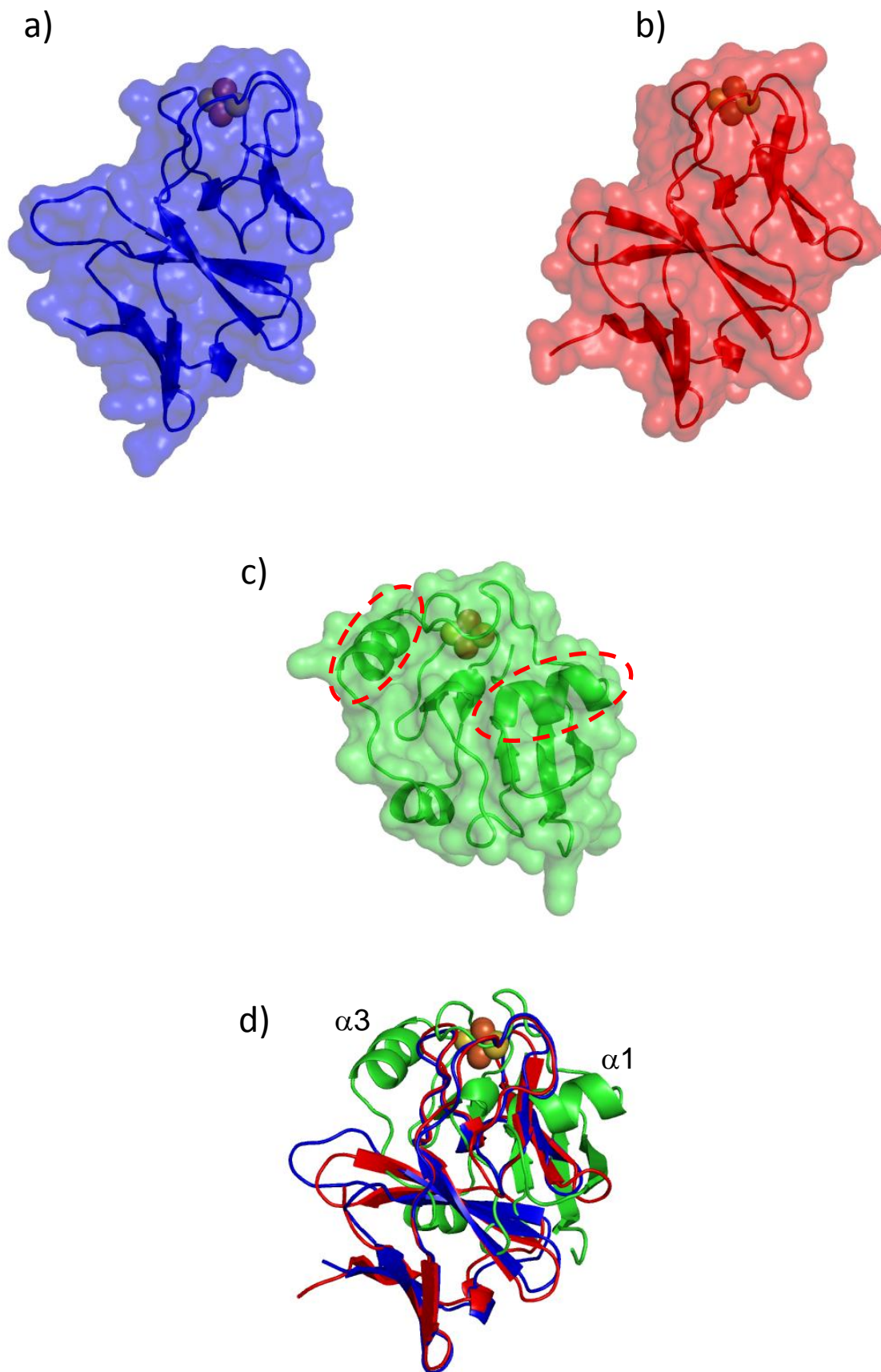


Figure 2-8. それぞれのクラスのFdの全体構造比較

a)からc)は主鎖構造と分子表面を示し, d)は主鎖構造のみを示した. c)については特徴的な α ヘリックスを赤破線で囲んだ

a): Fd_{III} (青) [Nam et al., 2005].

b): Fd_{IIB} (赤) [Inoue et al., 2009].

c): Fd_{IIIA} (緑).

d): Fdの重ね合わせ. 色はa)からc)と対応させてある.

2-2-4-3. Proteo-type ferredoxin と Fd_{IIA} の構造比較

Proteo-type ferredoxin である Adx (アミノ酸レベルで 26.6% identity; PDB ID, 1AYF [Müller et al., 1998]), Pdx (アミノ酸レベルで 44.6% identity; PDB ID, 1XLP [Sevrioukova et al., 2005]), *Rhodobacter capsulatus* 由来 ferredoxin VI (Fdx VI : アミノ酸レベルで 46.4% identity; PDB ID, 1E9M [Sainz et al., 2006]) との構造の重ね合わせを Fig. 2-9 に示す。

Adx, Pdx, Fdx VI と Fd_{IIA} との RMSD はそれぞれ 1.33 Å (102 原子), 1.02 Å (103 原子), 0.95 Å (103 原子) であった。Adx のみは、クラスタ結合ループの直前の領域に 1 残基の挿入があるため、この部分の位置のずれがあるが (Fig. 2-9 中段, 四角で囲まれた領域), その他に大きな構造の違いは見つからなかった。

2-2-4-4. Fd_{IIA} の [2Fe-2S] クラスタ周辺の構造

各々のタンパク質の [2Fe-2S] クラスタ周辺の構造を比較解析した。Fd_{IIA}, Adx, Pdx, Fdx VI のそれぞれの構造において、[2Fe-2S] クラスタから 12 Å 以内の距離に存在しているアミノ酸残基を各タンパク質の一次構造のアラインメント内に示した (Fig. 2-10), その結果、それらのほとんどがアミノ酸配列で相同性の高い領域に含まれていた。[2Fe-2S] クラスタ周辺の構造とその重ね合わせを Fig. 2-11 に示す。Fd_{IIA} には、他のタンパク質では見られない特徴として、[2Fe-2S] クラスタ近傍に水分子が存在した (Fig. 2-11a)。Fig. 2-12 に Fd_{IIA} の [2Fe-2S] クラスタ周辺の電子密度マップを示す。精製のロットの異なる Fd_{IIA} とロットの異なる結晶化溶液を使用して得られた結晶構造においても、この水分子は同様の位置に存在していたため、結晶中に偶然に存在していたものではないと考えられる。

Fig. 2-13 に、Adx, Pdx, Fdx VI, Fd_{IIA} の [2Fe-2S] クラスタ周辺の構造と重ね合わせたものを示す。タンパク質の二次構造を基に行った重ね合わせ (Secondary structure matching) では、[2Fe-2S] クラスタとクラスタ結合ループにずれが生じていたため、重ね合わせは [2Fe-2S] クラスタとそれに配位する Cys 残基の S 原子で行った。Fd_{IIA} は水分子の存在により、クラスタ結合ループの終わりに近い領域である Ala50 と Thr51 の主鎖が [2Fe-2S] クラスタの反対側へシフトしていた。Fig. 2-13 のシフトの様子を示す (四角で囲まれた領域)。Ala50 は主鎖が水分子に一番近い位置に存在しているアミノ酸残基であり、Ala50 の C α 原子と水分子との距離は 3.25 Å である。他のタンパク質で Fd_{IIA} の Ala50 と相同のアミノ酸残基は、Adx が Ser53, Pdx が Ala46, Fdx VI が Ser46 であり、これらの C α 原子と水分子との距離はそれぞれ、2.45 Å, 2.48 Å, 1.80 Å である。Fd_{IIA} のループは、部分的に他のタンパク質のそれよりも 0.7 Å から 1.5 Å シフトしていた。ループが部分的にシフトすることで、Fd_{IIA} の内部に隙間が生まれることが考えられる。そこで、各々の構造において水分子を除いた、タンパク質のみの表面を描画した (Fig. 2-14)。その結果、Fd_{IIA} のみに水が存在する部分に空間が見られた。タンパク質表面の描画に用いられるプローブ半径は 1.4 Å で行うことが多いが、この半径で描画させた時には空間は現れず、1.2 Å 以下にした場合に空間が現れた。このことから、水分子はタンパク質にきつく挟まれたような状態で存在していることが考えられる。

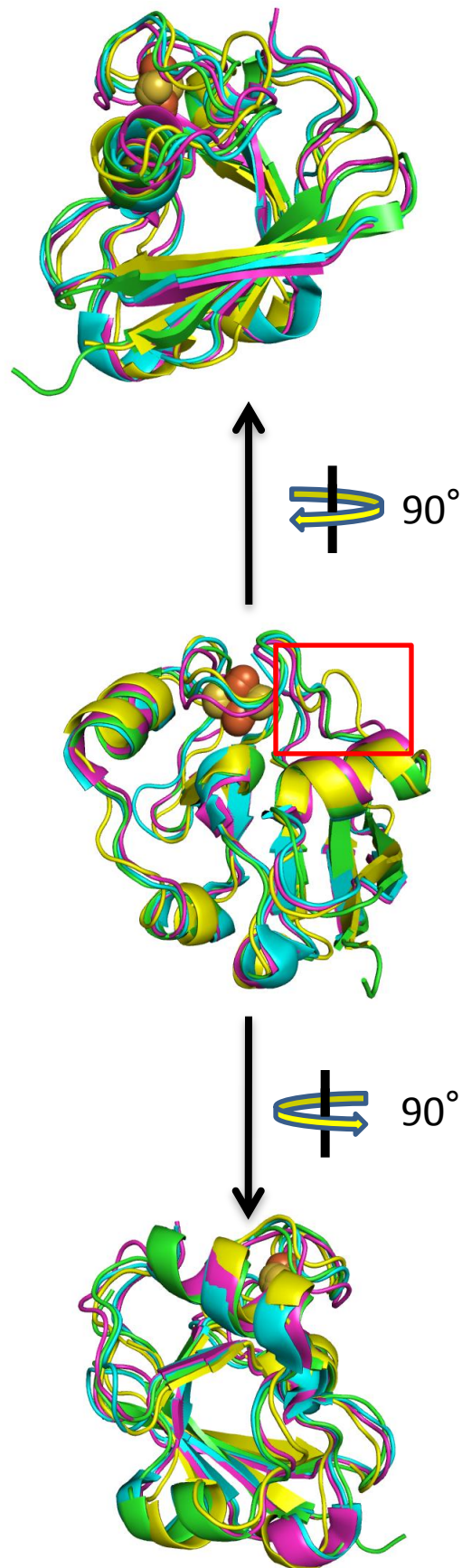


Figure 2-9. Adrenodoxin, putidaredoxin, ferredoxin VIとFd_{IIA}の重ね合わせ

緑: Fd_{IIA}

黄色: adrenodoxin [Muller et al., 2001]

赤: putidaredoxin [Sevrioukova et al., 2005]

青: ferredoxin VI [Sainz et al., 2006]

ループ位置の異なる部分を赤い四角で示した.

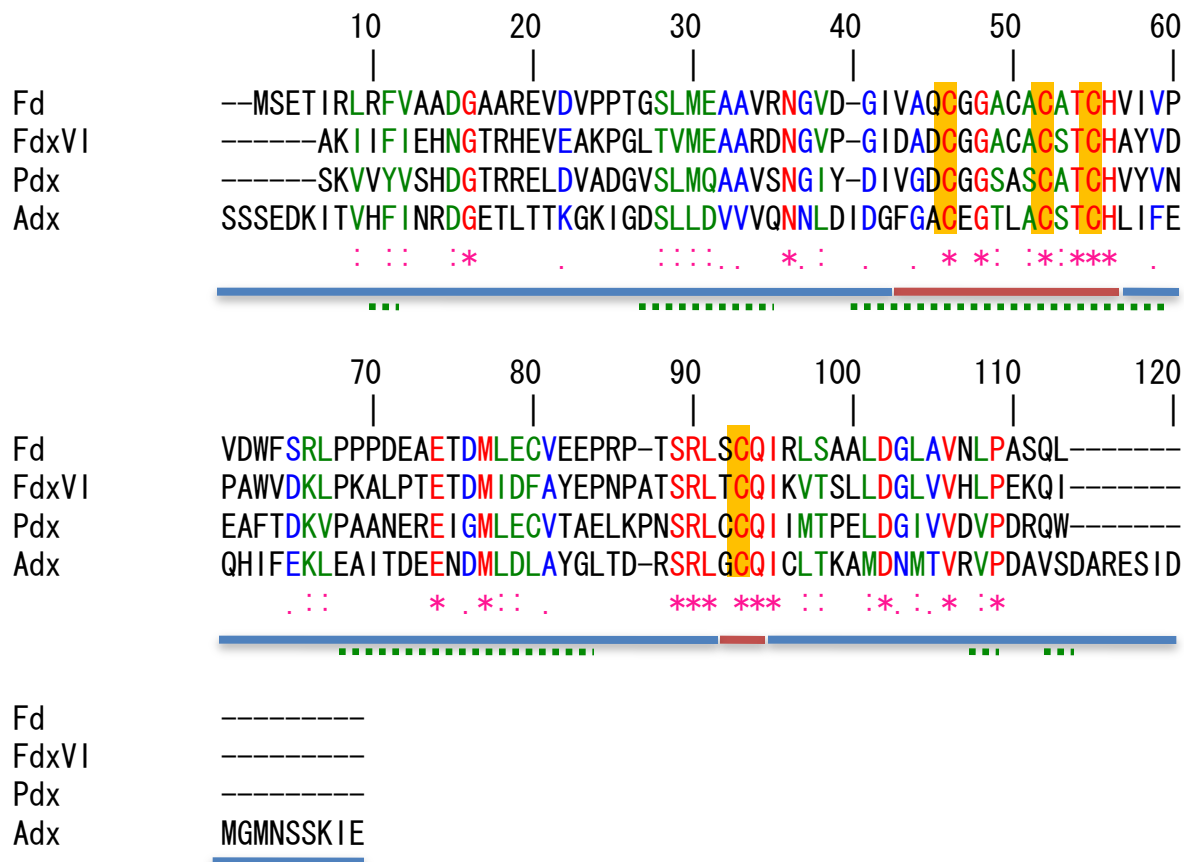


Figure 2-10. Adrenodoxin (Adx), putidaredoxin (Pdx), ferredoxin VI (FdxVI) とFd_{IIA} (Fd) の一次配列のアライメント解析

赤: Identicalなアミノ酸残基

緑: 高いsimilarityを示す残基

青: 弱いsimilarityを示す残基

[2Fe-2S]クラスターと配位する4つのCys残基の背景をオレンジで示した。下の実線はregionの範囲を示した。Core regionは赤、basal regionは青で示した。破線は[2Fe-2S]クラスターから12 Å以内に存在する残基を示す。

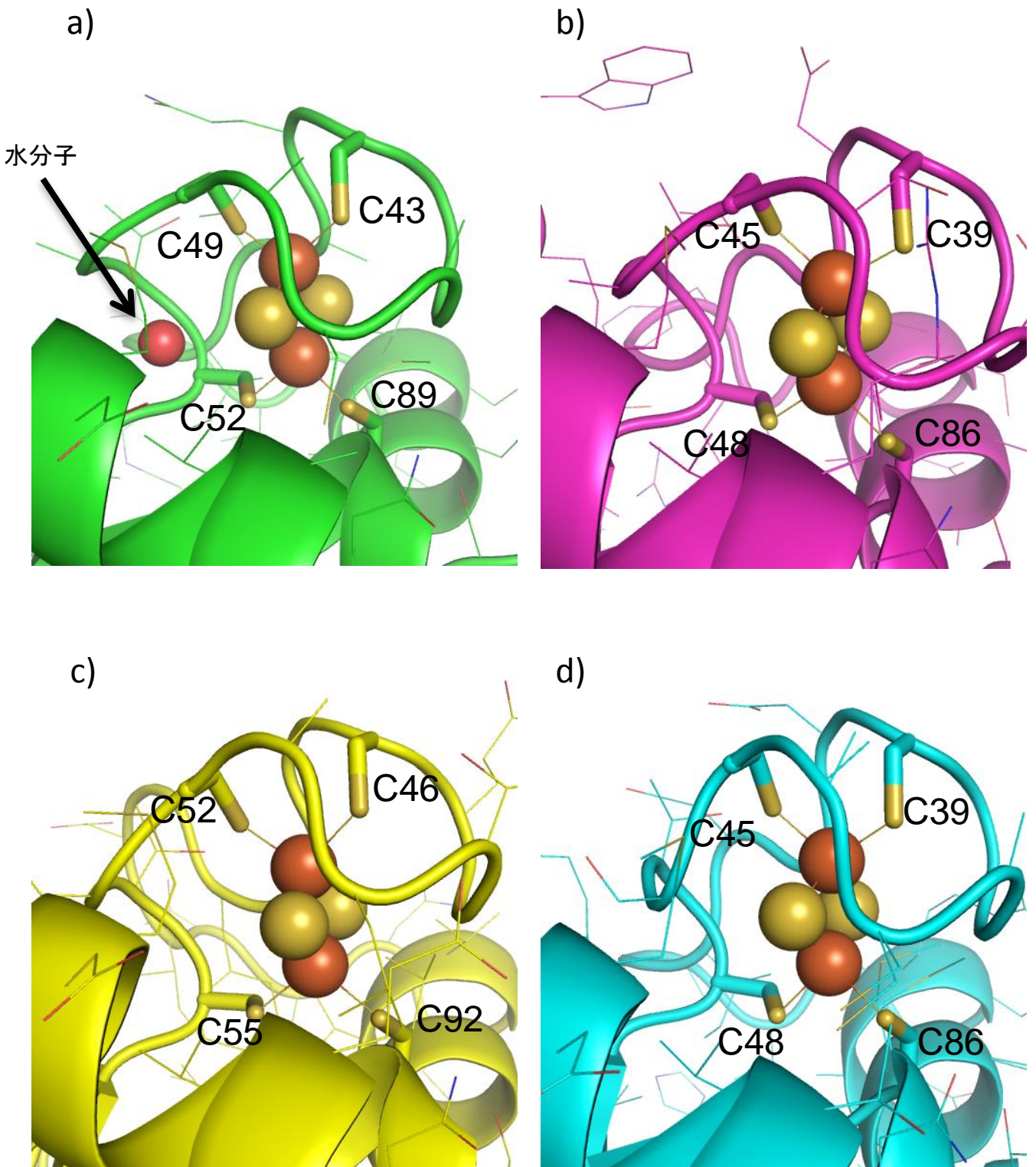


Figure 2-11. Adrenodoxin, putidaredoxin, ferredoxin VIとFd_{IIA}の[2Fe-2S]クラスター周辺の構造

a): Fd_{IIA}

b): adrenodoxin [Muller et al., 2001]

c): putidaredoxin [Sevrioukova et al., 2005]

d): ferredoxin VI [Sainz et al., 2006]

鉄原子, 硫黄原子をそれぞれ茶色, 黄色の球で表示した. a)において, Fd_{IIA}のみで見つかった水分子を赤色の球で示した.

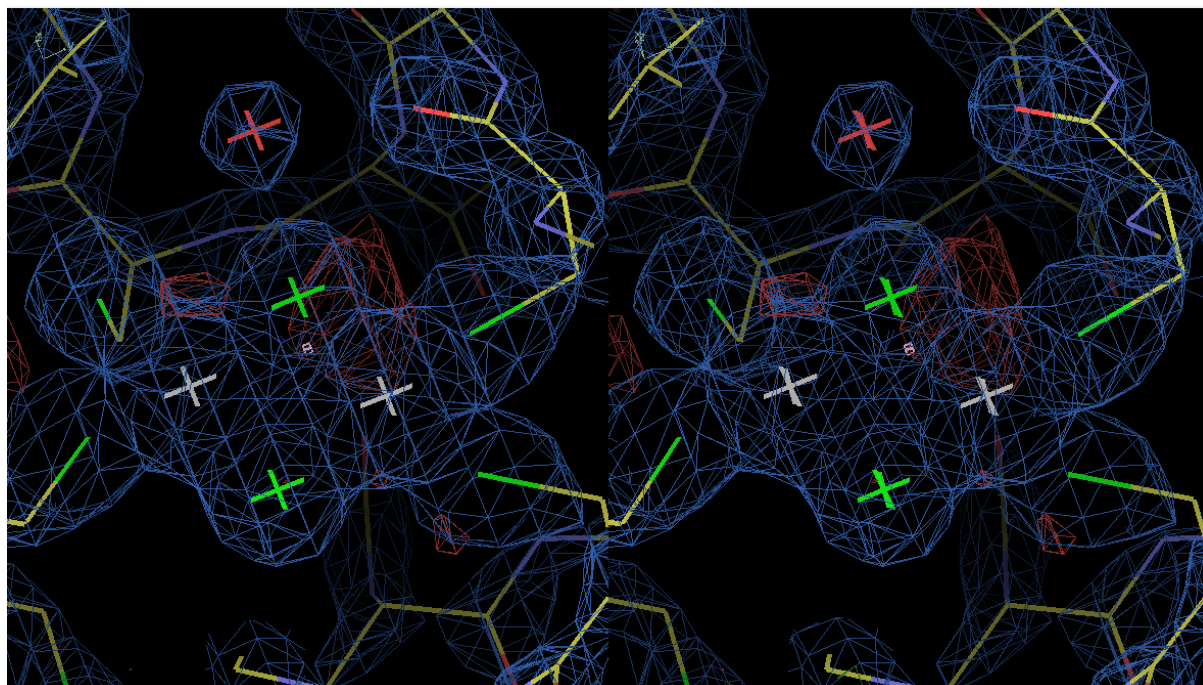


Figure 2-12. Fd_{IIA} の[2Fe-2S]クラスター周辺の電子密度マップ

$2F_o-F_c$ マップ (青), F_o-F_c マップ (緑, 赤)はそれぞれ 1σ , $+3\sigma$, -3σ で示した. 硫黄原子は緑, 鉄原子は白, 酸素原子は赤で示した. ステレオ図で示した.

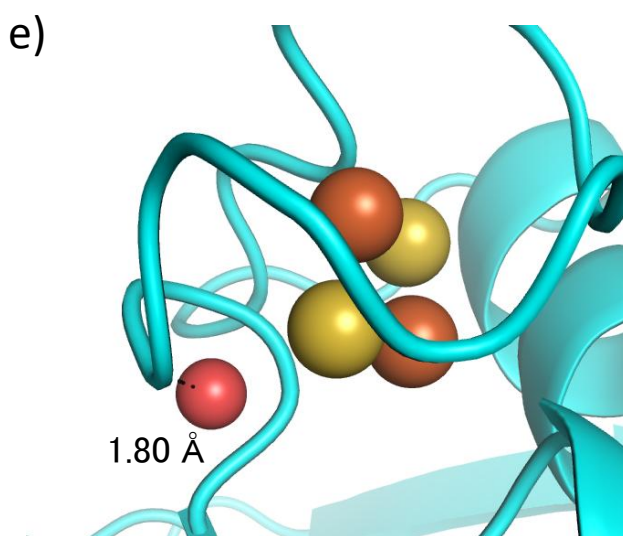
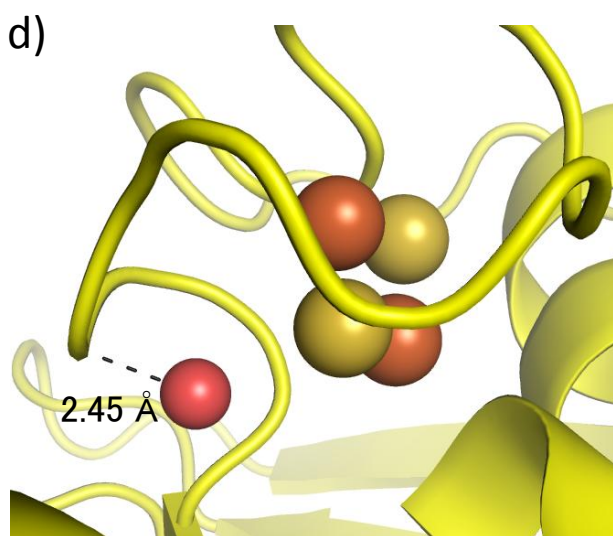
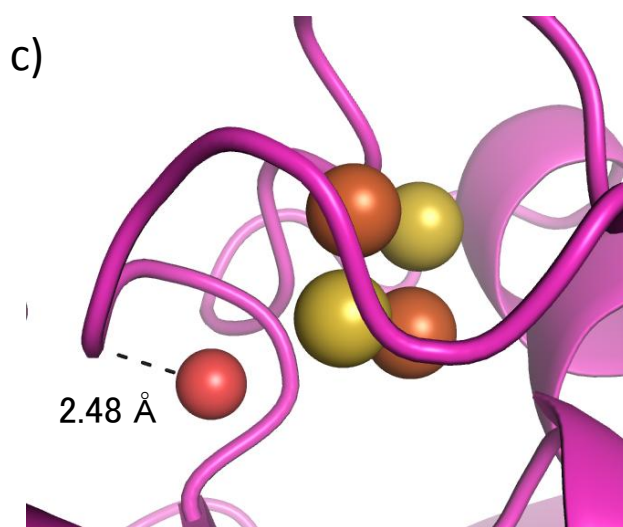
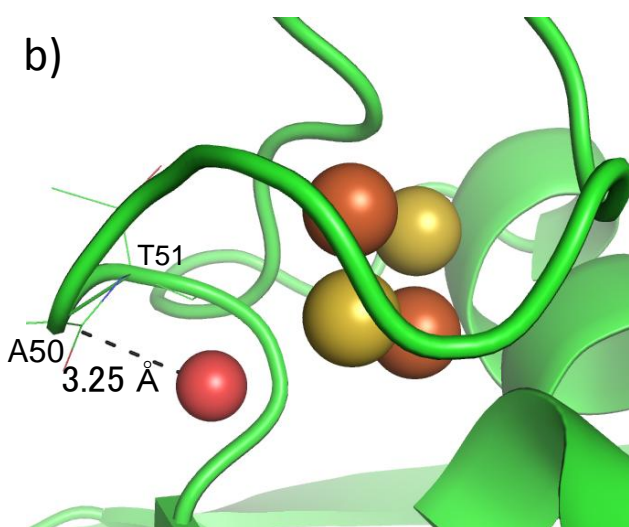
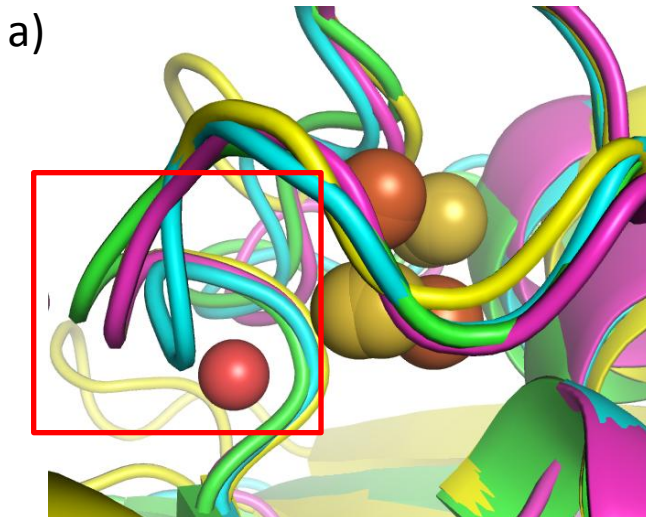


Figure 2-13. Adrenodoxin, putidaredoxin, ferredoxin VIとFd_{IIA}の[2Fe-2S]クラスタ周辺の重ね合わせ

緑: Fd_{IIA}

黄色: adrenodoxin [Muller et al., 2001]

赤: putidaredoxin [Sevrioukova et al., 2005]

青: ferredoxin VI [Sainz et al., 2006]

部分的なループのシフトが生じている領域を赤い四角で示した。鉄原子、硫黄原子をそれぞれ茶色、黄色の球で表示した。ステレオ図で示した。a)において、Fd_{IIA}のみで見つかった水分子を赤色の球で示した。

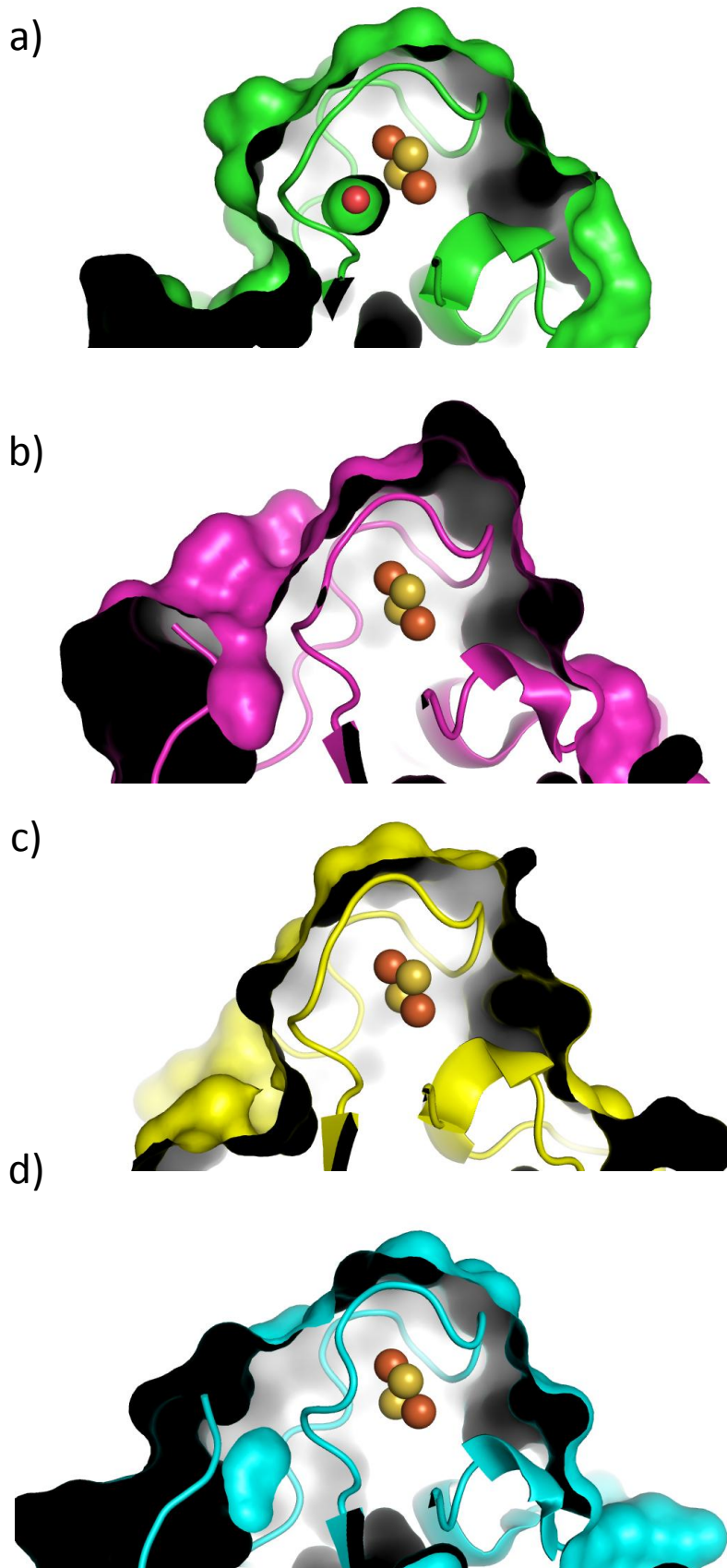


Figure 2-14. Adrenodoxin, putidaredoxin, ferredoxin VIとFd_{IIA}のタンパク質表面

a): Fd_{IIA}

b): adrenodoxin [Muller et al., 2001]

c): putidaredoxin [Sevrioukova et al., 2005]

d): ferredoxin VI [Sainz et al., 2006]

Probe radiusを1.2 Åに設定してaccessible surface areaを描画した。鉄原子、硫黄原子をそれぞれ茶色、黄色の球で表示した。a)において、Fd_{IIA}のみで見つかった水分子を赤色の球で示した。

実際、水分子の温度因子は 15.1 \AA^2 で、タンパク質全体、[2Fe-2S]クラスタでは、それぞれ 24.6 \AA^2 , 18.7 \AA^2 であるため、水分子は揺らぎが小さい。また、この空間は完全に閉じており、タンパク質内部に存在している。すなわち、水分子が入るためのルートが存在しない。これらのことから、この水分子は apo-Fd_{IIA} の段階からタンパク質に取り込まれている、あるいは [2Fe-2S]クラスタと同時に Fd_{IIA} に取り込まれる可能性が考えられる。得られた結晶構造全てが水分子を持つことから、この水分子は Fd_{IIA} の構造維持に必要なのではないかと推測される。

2-2-4-5. Fd_{IIA} の [2Fe-2S]クラスタ周辺の水素結合ネットワーク

Adrenodoxin, putidaredoxin, ferredoxin VI の酸化還元電位はそれぞれ -273 mV [Grinberg et al., 2000], -251 mV [Wong and Vikler, 1998], -306 mV [Sainz et al., 2006] である。Fd_{IIA} はそれらよりも約 300 mV 高い +107 mV の酸化還元電位を示す。

各々のタンパク質の [2Fe-2S]クラスタ周辺の水素結合ネットワークを Fig. 2-15 に示した。Fd_{IIA} では、水分子が [2Fe-2S]クラスタ (S1) と、それに配位している Cys52 の S 原子の両方に水素結合を形成している可能性が考えられた。しかし、両者と水素結合を形成すると仮定すると、その角度が 65.8° となってしまうため (Fig. 2-16a) 水の水素原子の位置を考慮すると、両者と水素結合を形成するとは考えづらい。このことから、水分子の形成する水素結合の組み合わせは、Cys52 の S 原子と Cys49 のカルボニル酸素 (角度 126.1°)、[2Fe-2S]クラスタ (S1) と Cys52 のアミド窒素 (角度 111.4°) であると考えられるが (Fig. 2-16b, c), どちらの組み合わせで実際に水素結合を形成しているかは定かではない。しかしながら、[2Fe-2S]クラスタの形成する水素結合ネットワークに水分子が関与しているということは Fd_{IIA} において特異的に見られていることであり、これが、Fd_{IIA} が高い酸化還元電位を示す要因である可能性が高い。

また、Rieske ferredoxin では、クラスタとそれに配位する原子に対する水素結合の数が酸化還元電位に関係があると言われているが [Hunsicker-Wang et al., 2003], Table 2-3 に示すように、Fd_{IIA} の水素結合の数は 9 本であり、putidaredoxin と ferredoxin VI の 8 本、adrenodoxin の 10 本と比較しても、水素結合の数が特に多いわけではない。Adrenodoxin では、水素結合の多い、N 末端と C 末端の両端を削った 4~108 残基で形成される truncated 型 adrenodoxin の方が、水素結合の少ない full-length adrenodoxin よりも酸化還元電位が低く、4Cys [2Fe-2S] ferredoxin では水素結合の数と酸化還元電位に密接な関係はない傾向が見られる [Grinberg et al., 2000] と考えられているが、Fd_{IIA} でも同様に水素結合の数の違いが高い酸化還元電位の要因ではないことが明らかとなった。

Fd_{IIA} は特異的に [2Fe-2S]クラスタ近傍に水分子を有するだけでなく、Fig. 2-17 に示すように、Val40 と Ala41 の間のカルボニル酸素がフリップしていた。ループの部分的なシフトによる構造の歪みを緩和させるためにフリップが生じるのではないかと推測されるが、フリップの要因は定かではない。このフリップと先に述べたループの部分的なシフトによっ

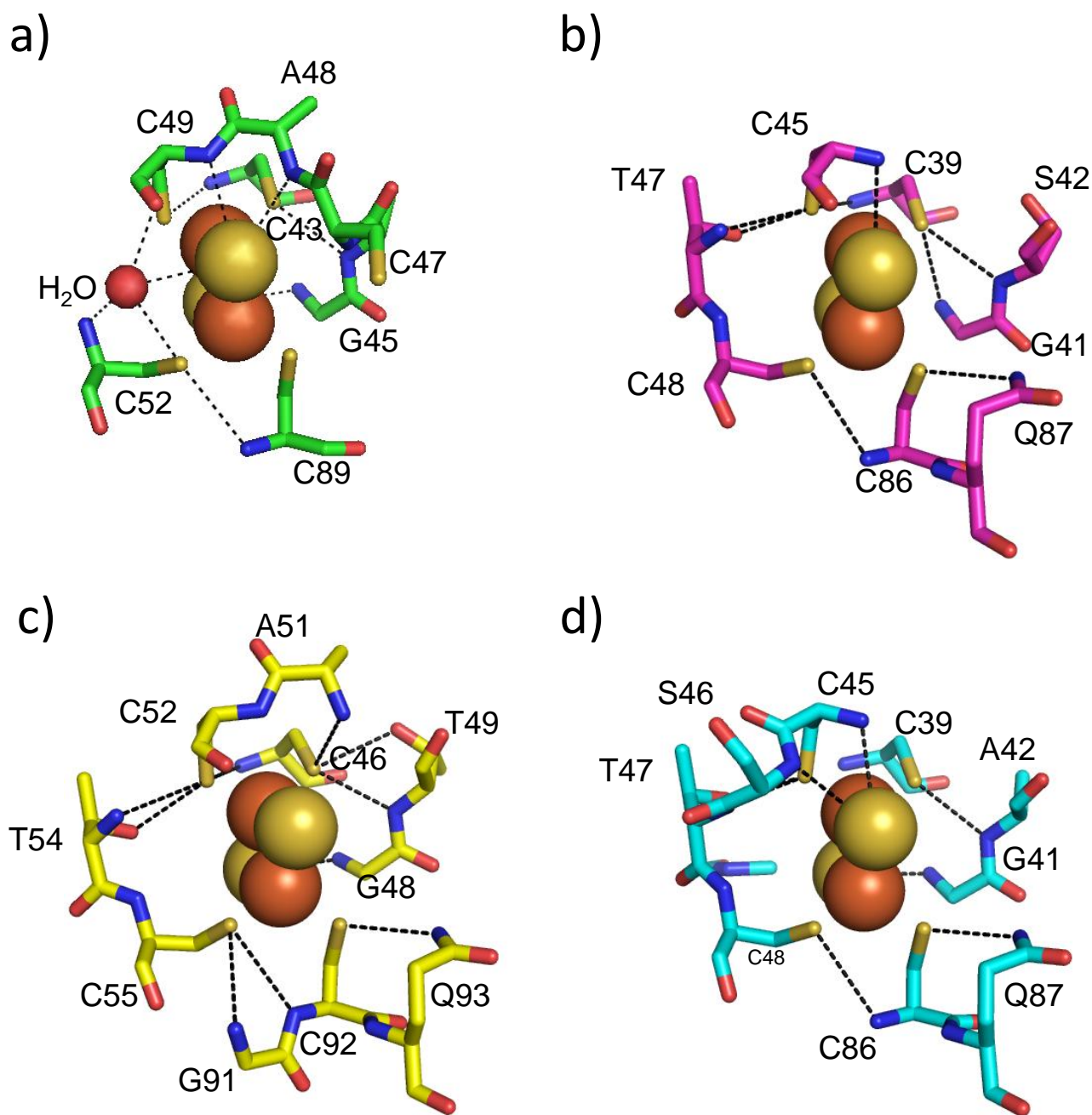


Figure 2-15. Adrenodoxin, putidaredoxin, ferredoxin VIとFd_{IIA}の [2Fe-2S]クラスタの水素結合ネットワーク

a): Fd_{IIA}

b): adrenodoxin [Muller et al., 2001]

c): putidaredoxin [Sevrioukova et al., 2005]

d): ferredoxin VI [Sainz et al., 2006]

点線は水素結合を示し、S原子の形成する水素結合はN-H...Sの距離が3.7 Å以内で、角度が120°以上を基準とした。

a)において、Fd_{IIA}のみで見つかった水分子を赤色の球で示した。

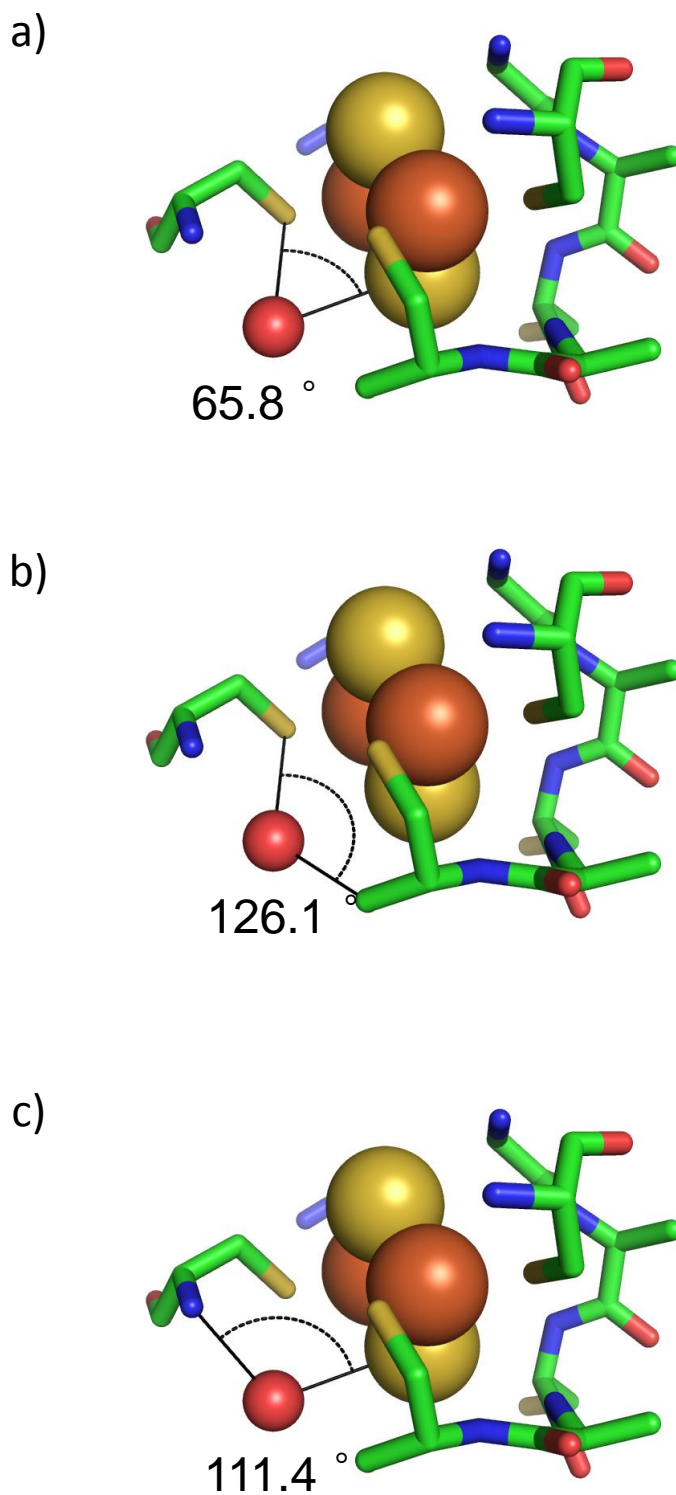


Figure 2-16. Fd_{IIA}の水分子の形成する可能性のある水素結合の組み合わせ

点線は水素結合を示し、S原子の形成する水素結合はN-H...Sの距離が3.7 Å以内で、角度が120° 以上を基準とした。Fd_{IIA}のみで見つかった水分子を赤色の球で示した。

a): [2Fe-2S]クラスターのS1原子とC52のS原子との組み合わせ. 角度65.8 °

b): Cys52のS原子、C49のカルボニル酸素との組み合わせ. 角度126.1 °

c): [2Fe-2S]クラスターのS1原子、C52のアミド窒素との組み合わせ. 角度111.4 °

Table 2-3. それぞれのferredoxinの[2Fe-2S]クラスタに対する水素結合

Fd _{IIA}		
Donor	Acceptor	Distance (Å)
A48N	S1	3.35
C49N	S2	3.51
G45N	S2	3.3
A49N	C43S	3.13
C43N	C49S	3.61
Water	C52S	3.24
C89N	C52S	3.51
Water	C49O	2.77
C52N	Water	2.91

Putidaredoxin		
Donor	Acceptor	distance (Å)
C45N	S1	3.54
CS42N	C39S	3.33
G41N	C39S	3.43
T47OG	C45S	3.01
C39N	C45S	3.49
T47N	C45S	3.48
C86N	C48S	3.59
Q87NE	c86S	3.47

Adrenodoxin		
Donor	Acceptor	distance (Å)
G48N	S2	3.26
T49OG	C46S	3.35
A51N	C46S	3.46
T49N	C46S	3.13
T54OG	C52S	3.25
C46N	C52S	3.47
T54N	C52S	3.65
G91N	C55S	3.55
C92N	C55S	3.62
Q93NE	C92S	3.4

Ferredoxin VI		
Donor	Acceptor	distance (Å)
G41N	S1	3.19
S46N	S2	3.46
C45N	S2	3.52
A42N	C39S	3.15
T47N	C45S	3.37
C86N	C45S	3.65
Q87NE2	C86S	3.37
T47OG	C45S	2.95

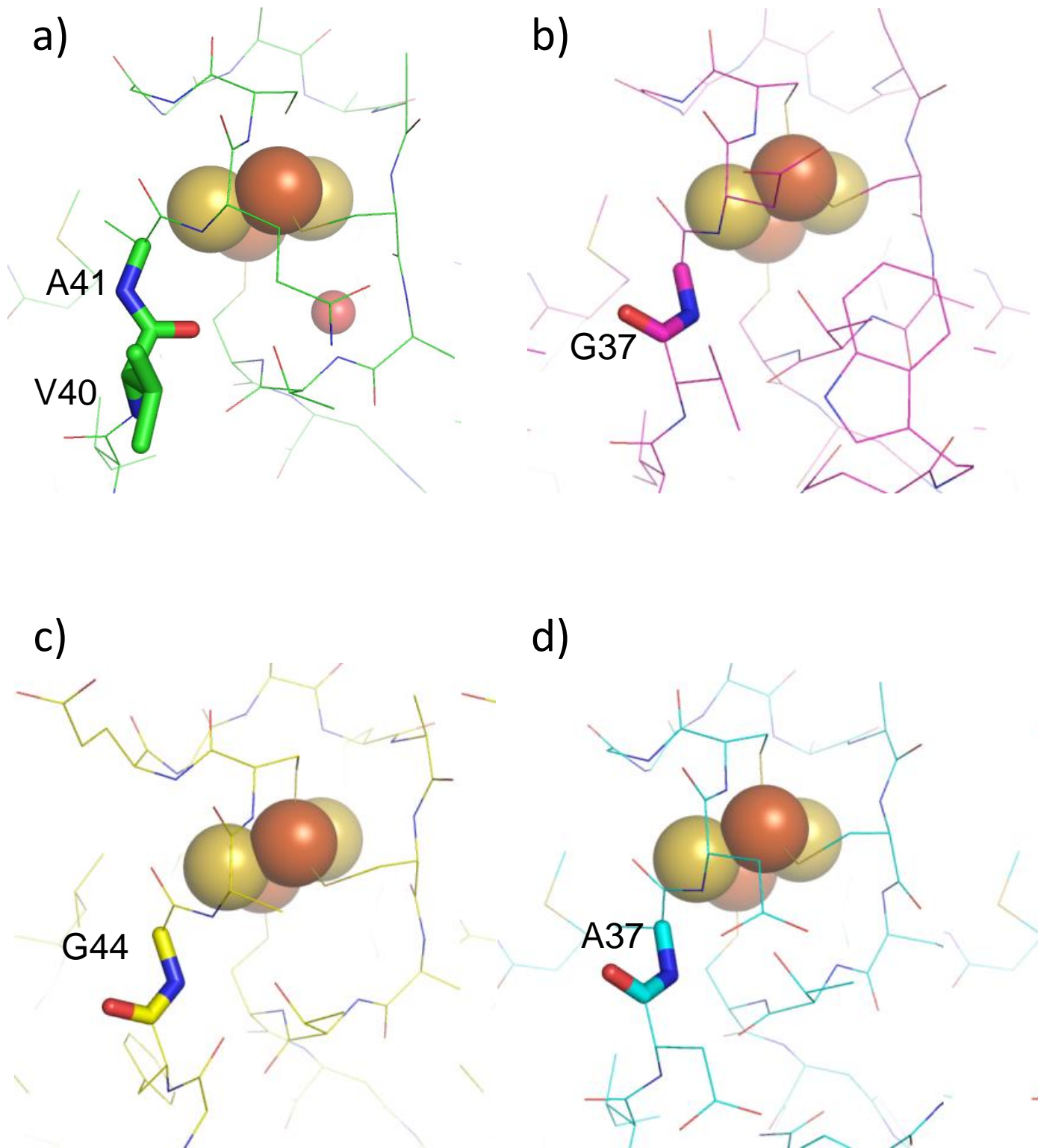


Figure 2-17. Fd_{IIA}の特有なペプチド結合のフリップ

a): Fd_{IIA}

b): adrenodoxin [Muller et al., 2001]

c): putidaredoxin [Sevrioukova et al., 2005]

d): ferredoxin VI [Sainz et al., 2006]

フリップの起きているペプチド結合をstick, その他はlineで表示した。鉄原子, 硫黄原子をそれぞれ茶色, 黄色の球で表示した。a)において, Fd_{IIA}のみで見つかった水分子を赤色の球で示した。

て、Thr51 の水素結合ネットワークが他のものと大きく異なっていることが明らかとなった。Fig. 2-18, Table 2-4 に Thr の水素結合ネットワークを示す。Fd_{IIA} では Thr51OG と Val40O, Val40N と Thr51N の二つの水素結合しか形成しない、かつ Thr51 が [2Fe-2S] クラスタ周辺の水素結合ネットワークに関与しないのに対し、他のものでは 4 から 5 つの水素結合を形成し、かつ [2Fe-2S] クラスタ周辺の水素結合ネットワークに関与していた。この位置の Thr は多くの 4Cys [2Fe-2S] ferredoxin では Thr か Ser, まれに Asp であり、いずれも側鎖に酸素分子を持つアミノ酸で保存されている [Uhlmann et al., 1995]。ここにアミノ酸置換を導入すると酸化還元電位が大きく変わることが Adx で報告されており、野生型 Adx の -274 mV の酸化還元電位に対して T54S では 55 mV, T54A では 66 mV の酸化還元電位が低下する [Uhlmann et al., 1995]。Thr と Ser では、両者とも酸素原子を側鎖に持ち、置換により水素結合ネットワークに変化は見られないと考えられるが、Pdx では、Adx の T54 に相当するアミノ酸が Asp であり、Pdx の酸化還元電位が -235 mV であることから、この位置のアミノ酸の種類によっても酸化還元電位が変化するということが大変興味深い。このように、Thr, Ser あるいは Asp の作る水素結合ネットワーク、あるいは酸素原子自体の電子求引性が 4Cys [2Fe-2S] ferredoxin の酸化還元電位に重要であることが示されている。

2-2-5. Fd_{IIA} の酸化還元電位の特異性

2-2-5-1. Fd_{IIA} の酸化還元電位の pH 依存性

ウシ心臓由来, *Thermus thermophilus* 由来, *Rhodobacter sphaeroides* 由来の cytochrome *bc₁* complex における Rieske タンパク質では、pH が 8 以上になるとその酸化還元電位が減少することが明らかとなっている [Link et al., 1996, Zu et al., 2003]。また, *Burkholderia* sp. LB400 由来 biphenyl dioxygenase の ferredoxin コンポーネントである BphF では pH が 10 以上で酸化還元電位が低下する。pH が 1 変化すると、酸化還元電位の変化幅は Rieske タンパク質では約 90 mV であり、Rieske-type ferredoxin では約 75 mV 程度低下する [Zu et al., 2003] ことが知られている。これは、[2Fe-2S] クラスタに配位する His 残基のプロトン化状態の変化により引き起こされていると考えられている。一方、4Cys [2Fe-2S] ferredoxin ではクラスタに配位する残基は全て Cys であるためにプロトン化は起こらず、酸化還元電位は pH に依存しないと考えられている。実際、Adx では pH が 4.0 から 8.3 の間ではその酸化還元電位に変化は見られなかったとの報告がある [human 由来 Adx : Johnson et al., 2003, bovine 由来 Adx : Huang et al., 1983]。Fd_{IIA} が特異的に水分子を持ち、その水分子が [2Fe-2S] クラスタと水素結合を形成することにより酸化還元電位に大きな変化が生じるということは、Fd_{IIA} の酸化還元電位が他の 4Cys [2Fe-2S] ferredoxin のそれと異なる挙動を示す、すなわち、Rieske タンパク質のように酸化還元電位が pH に依存して変化する可能性が考えられる。このため、pH を変化させた条件において Fd_{IIA} の酸化還元電位の測定をすることで、Fd_{IIA} の酸化還元電位の pH 依存性の有無を確認することとした。酸化還元電位の測

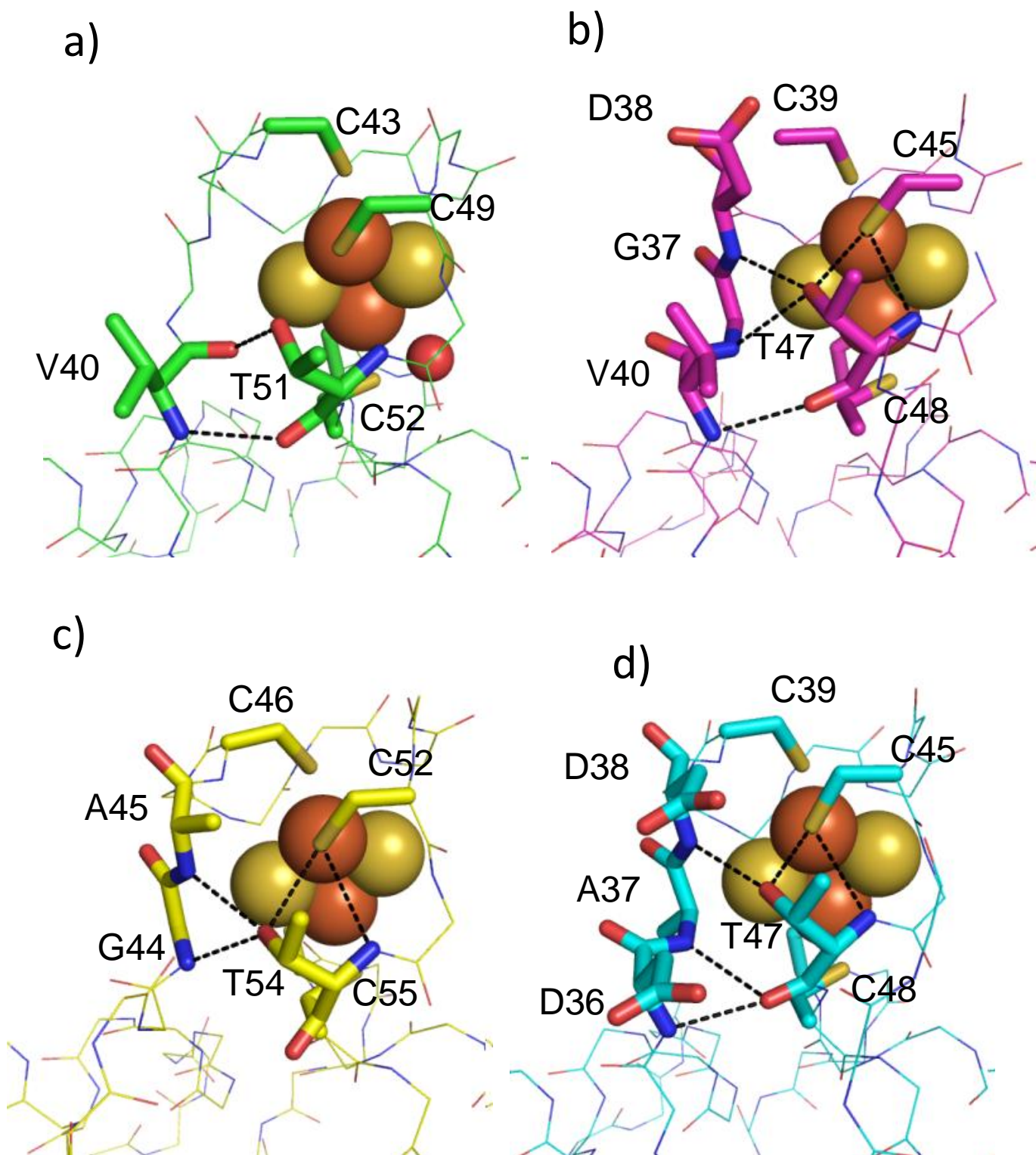


Figure 2-18. Adrenodoxin, putidaredoxin, ferredoxin VIとFd_{IIA}の保存されているThr残基の形成する水素結合

a): Fd_{IIA}
 b): adrenodoxin [Muller et al., 2001]
 c): putidaredoxin [Sevrioukova et al., 2005]
 d): ferrodoxin VI [Sainz et al., 2006]

点線は水素結合を表わし、S原子の形成する水素結合はN-H...Sの距離が3.7 Å以内で、角度が120°以上を基準とした。水素結合に関与するアミノ酸残基をstick、その他の残基をlineで示した。鉄原子、硫黄原子をそれぞれ茶色、黄色の球で示した。a)において、Fd_{IIA}のみで見つかった水分子を赤色の球で示した。

Table 2-4. それぞれのferredoxinにおける保存されたThr (Fd_{IIA}ではThr51に相当)に対する水素結合

Fd _{IIA} (Thr51)		
Donor	Acceptor	distance (Å)
T51OG	V40O	2.59
V40N	T51O	2.96

Putidaredoxin (Thr47)		
Donor	Acceptor	distance (Å)
T47N	C45S	3.48
T47OG	C45S	3.01
G37N	T47OG	3.23
V36N	T47O	2.92
D38N	T47OG	2.88

Adrenodoxin (Thr54)		
Donor	Acceptor	distance (Å)
T54N	C52S	3.65
T54OG	C52S	3.25
G44N	T54OG	2.89
A45N	T54OG	2.97

Ferredoxin VI (Thr47)		
Donor	Acceptor	distance (Å)
T47N	C45S	3.37
T47OG	C45S	2.95
D36N	T47O	2.96
A37N	T47O	3.01
D38N	T47OG	2.87

定には、感度の高い square wave voltammetry で行った。その結果、二つのピークが観察され、どちらかが Fd_{IIA} に由来するピークであると考えられた。Fig. 2-19 に示すように、このピークの片方は neomycin の添加により増大することから、還元方向では -0.2 V、酸化方向では 0 V 付近に現れるピークが Fd_{IIA} 由来のものであると判断した。このピークの位置は cyclic voltammetry の結果と一致している。

pH を変化させて測定した結果を Fig. 2-20 に示す。pH が 1 上昇すると、 Fd_{IIA} の酸化還元電位は約 60 mV 低下することが明らかとなった。このことから、 Fd_{IIA} は他の 4Cys [2Fe-2S] ferredoxin とは異なる挙動、すなわち酸化還元電位の pH 依存性を示すことが明らかとなった。また、 Fd_{IIA} の [2Fe-2S] クラスターのリガンドの中で、プロトン化状態が変化するものは水分子のみであるため、 Fd_{IIA} のみで見出された水分子が Fd_{IIA} の高い酸化還元電位に寄与するという可能性が強く示唆された。

Rieske タンパク質や Rieske-type ferredoxin では、二つの His リガンドの取る pK_a が算出されている。これらのタンパク質の酸化還元電位は両者がプロトン化あるいは脱プロトン化されている pH 条件下だと変化せず、それぞれの His 残基のプロトン化の度合いに比例して酸化還元電位が変化する。一方、水、オキソニウムイオン (H_3O^+) の pK_a はそれぞれ 15.74、-1.74 であり、pH が 1 から 14 の間でオキソニウムイオンの量は変化する。このことから、 Fd_{IIA} は水溶液のとする全ての pH の範囲内でその酸化還元電位を変える可能性が考えられる。現在までのところ、pH が 7 から 9 までの範囲のみの測定しか行っていないが、pH の範囲をより広げて測定を行うことで、より詳細な Fd_{IIA} の酸化還元電位の特性が明らかとなると考えられる。

2-2-5-2. Fd_{IIA} のアミノ酸置換体の酸化還元電位

Fd_{IIA} の Thr51 は他の Proteo-type ferredoxin とは異なり、[2Fe-2S] クラスター周辺の水素結合ネットワークを形成していない。前述の通り、Adx においては Thr54 のアミノ酸置換体の酸化還元電位は野生型よりも 50 mV 以上低下する。 Fd_{IIA} の Thr51 が水素結合ネットワークを形成しないと仮定すると、Thr51 のアミノ酸置換体は酸化還元電位が変化しない可能性が考えられる。この仮説を検証するために Thr51 を Ala, Ser, Asp に置換した Fd_{IIA} 、及び Cys リガンドと水素結合を形成していた Gln90 を Ala に置換した Fd_{IIA} を作製し、その酸化還元電位を測定することにした。結果を Fig. 2-21 に示す。T51A, T51S, T51D, Q90A の酸化還元電位はそれぞれ、+96.5 mV, +119.5 mV, +101 mV, +105 mV、となり、野生型 Fd_{IIA} (+107 mV) と大きな変化はなかった。T51A, T51S は Adx においてはその酸化還元電位がそれぞれ 66 mV, 55 mV 低下する置換体であるが、 Fd_{IIA} において変化が無かったことは、 Fd_{IIA} の Thr51 は Fd_{IIA} の酸化還元電位に影響しないことを示していた。T51D は [2Fe-2S] クラスターと新たな水素結合を形成し得る可能性があるアミノ酸置換体として作製したが、酸化還元電位に変化が無かった。一方、Q90A は Cys リガンドと水素結合を形成せず、[2Fe-2S] クラスター周辺の水素結合ネットワークを縮小させるような置換体であるが、これもまた酸化還

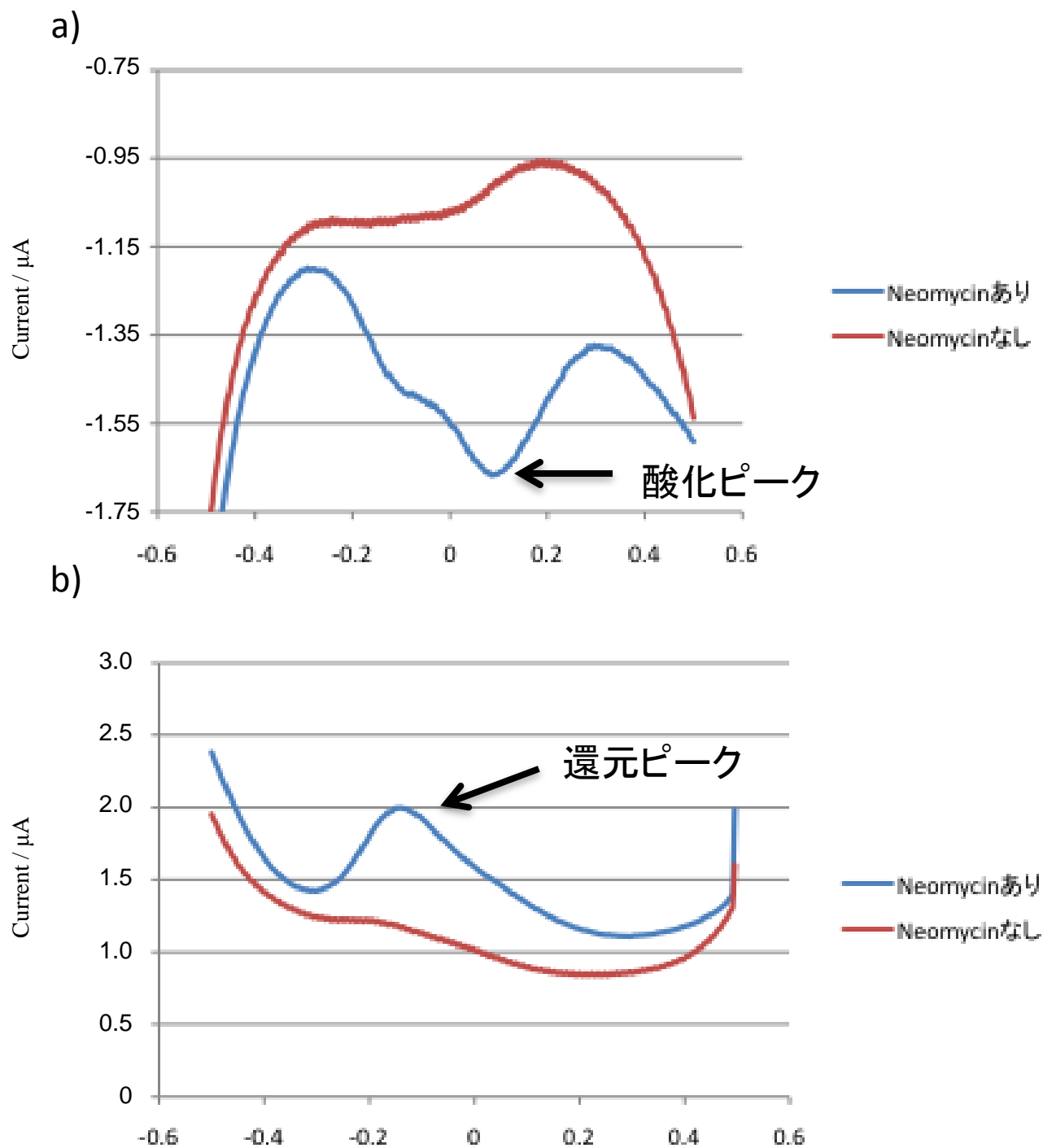


Figure 2-19. Fd_{IIA} のsquare wave voltammogram

- a): 酸化方向の掃引
b): 還元方向の掃引

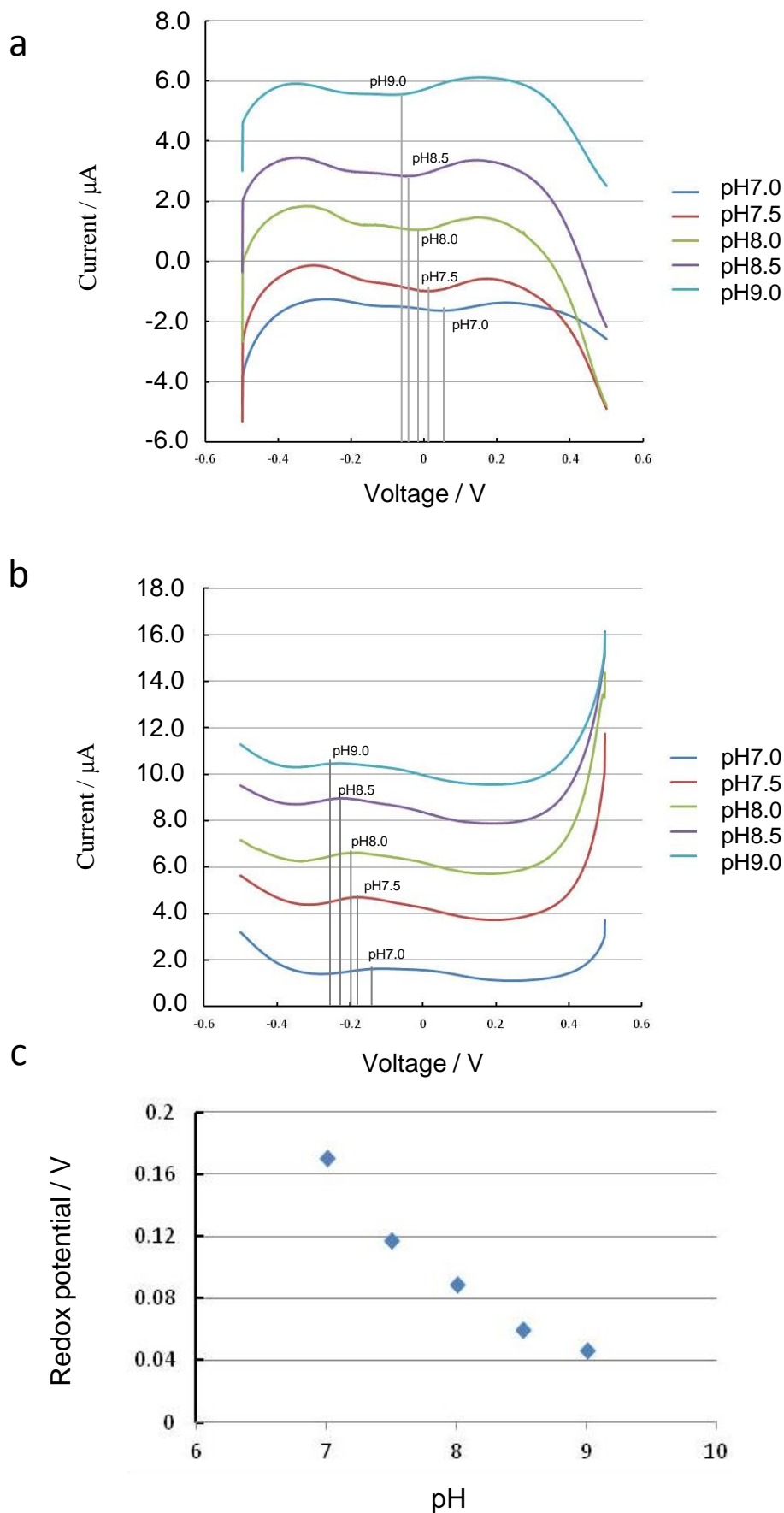


Figure 2-20. Fd_{IIA} の酸化還元電位のpH依存性

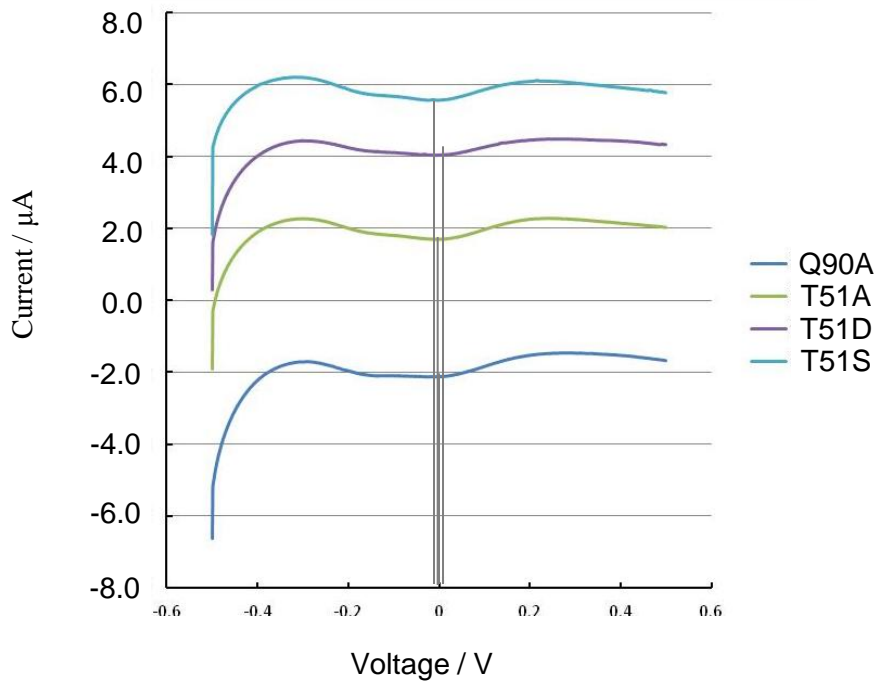
a): 酸化方向の掃引

b): 還元方向の掃引

c): 酸化還元電位とpHの関係

a), b)において、それぞれのグラフは位置をずらして表示した。それぞれのpHでのピークは灰色の実線で示した。c)はそれぞれのpHでのピーク中点から算出された酸化還元電位 (vs SHE)のプロットである。

a



b

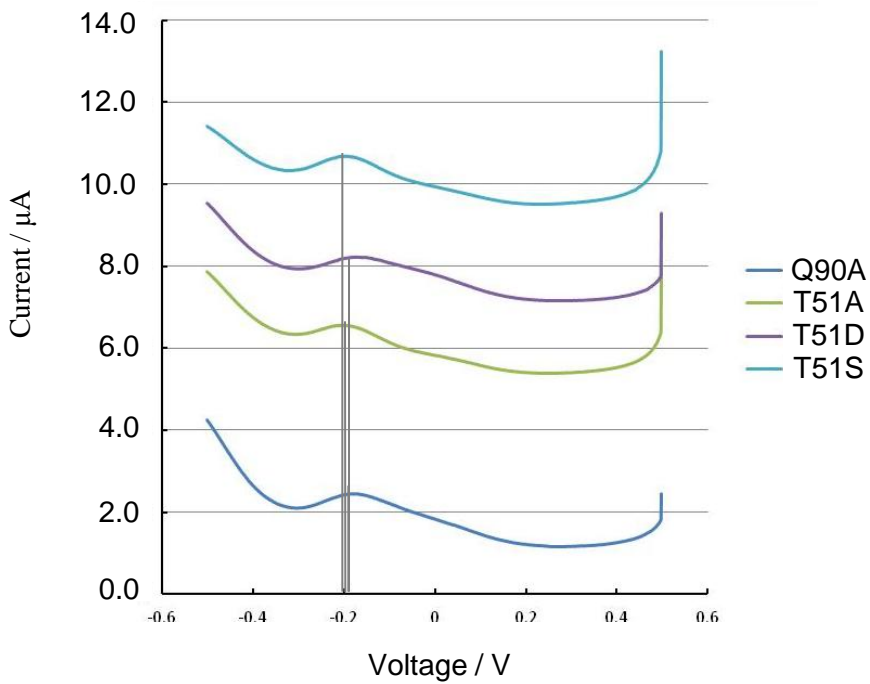


Figure 2-21. Fd_{IIA} のアミノ酸置換体の酸化還元電位

a): 酸化方向の掃引

b): 還元方向の掃引

a), b)において、それぞれのグラフは位置をずらして表示した。それぞれのpHでのピークは灰色の実線で示した。

元電位に大きな変化は見られなかった。Rieske タンパク質や Rieske-type ferredoxin では、[2Fe-2S]クラスタ周辺の水素結合ネットワークに関して N-H...S の水素結合一本当たり 70 mV、O-H...S の水素結合一本当たり 140 mV の酸化還元電位が上昇することが示唆されているが [Hunsicker-Wang et al., 2003], Proteo-type ferredoxin ではそのような傾向は見られないことが示唆されており [Müller et al., 1999], Fd_{IIA} の Q90A の酸化還元電位が野生型のそれとほぼ同様の値を示したということはこれまでの知見と合致する結果であると考えられる。

Fd_{IIA} の Thr51 は [2Fe-2S]クラスタ周辺の水素結合ネットワークに関与しないことから、Thr51 は Fd_{IIA} の酸化還元電位の上昇に関与しないと考えられ、Adx の Thr54 が酸化還元電位寄与を考慮すると、水分子のみで約 450 mV の上昇の効果が得られることが示唆された。

2-2-6. Red_{IIB} の結晶構造解析

2-2-6-1. Red_{IIB} の結晶化

濃度 8 mg/mL の Red_{IIB} (5 mM Tris-HCl に溶解)を用いて、Sitting drop 蒸気拡散法により、結晶化条件の検討を行った。その結果、wizard I (Emerald biosystems)の No. 38 の条件において 5°Cで一週間静置することにより結晶を得た (Table 2-5)。この条件を基に、結晶化条件を最適化したところ、1.0 M K/Na tartrate, 0.4 M Li₂SO₄, 0.1M CHES pH9.5 を結晶化溶液とし、これに対して 1.0 M CeCl を additive として 20%(v/v)加えたものと Red_{IIB} 溶液で drop を作製し、1 週間 5°Cで静置することで比較的大きな結晶 (0.2×0.2×0.2 mm)が得られるようになった。そこで、結晶化溶液に対して 20%の ethylene glycol を抗凍結剤として使用し、高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory にて結晶に X 線を照射したところ、分解能 3.54 Å での反射データを取得した。なお、この際に drop 中に浮遊している結晶ではなく、sitting drop を作製するために使用した bridge に張り付いた結晶の方が、より分解能が高かった。分解能がそれほど高くなかったことから、データ測定の際の抗凍結剤の使用で結晶の損傷したのではないかと考え、capillary を用いて常温にて反射データの取得を試みたが、分解能は向上しなかった。結晶の空間群は $P4_332$ であり、格子定数は $a = b = c = 169.3 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ であった。この結晶の溶媒含量は非対称単位に Red_{IIB} が二分子存在すると仮定した場合、48.0%となり、この場合の Matthews coefficient, V_M は $2.36 \text{ \AA}^3 / \text{Da}$ となり、一般的な値である $1.62 < V_M < 3.53 \text{ \AA}^3 / \text{Da}$ の間の値となった。しかし、非対称単位中に一分子の Red_{IIB} が存在せず、二分子分の電子密度は見えなかった。このことから、Red_{IIB} 結晶の溶媒含量は 74.0%, V_M は $4.73 \text{ \AA}^3 / \text{Da}$ ことが明らかとなった。

Red_{IIB} と一次配列の相同性が 47.1%である BDO-R (identity : 28.2%, similarity : 18.9%)をモデル分子として、Molrep を用いて分子置換法による位相決定を行い、構造モデルの構築を coot, 精密化は Refmac5 を用いて構造精密化を進めた。他にも Red_{IIA} (identity : 30.6%, similarity : 34.1%)や Pdr (identity : 26.3%, similarity : 34.2%)を用いて分子置換を行ったが、

R 因子やフリーR 因子が下がらなかったため、BDO-R をモデル分子とした際のものを採用した。

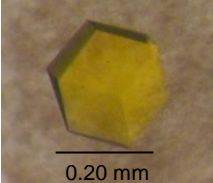
2-2-6-2. Red_{IIIB} の結晶構造

Red_{IIIB} はおおよそ 30×50×60 Å の大きさで、3つのドメインで構成されていた。これは、これまでに立体構造が報告されている他の ONFRs (**O**xxygenase-coupled **N**ADH **F**erredoxin **R**eductase [Aliverti, 2005] : 酸化酵素と共役して電子伝達を行う ferredoxin reductase) と同様である (Fig. 2-22a)。なお、1-2 番目、57, 番目、70-72 番目、145-147 番目、209-212 番目のアミノ酸残基の電子密度は見えなかったため、アミノ酸残基の帰属は出来なかった。それぞれのドメイン構成は、NADH-binding domain (1-110 番目のアミノ酸残基、243-322 番目のアミノ酸残基)、FAD-binding domain (111-242 番目のアミノ酸残基)、C-terminal domain (323-390 番目のアミノ酸残基) であり、これらは既知の報告 [Aliverti, 2005] に従い分類した。NADH-binding domain は 4つの α ヘリックスとつの 4 平行 β シート、5つの逆平行 β シートから構成されていた。FAD-binding domain は 3つの α ヘリックスとつの平行 β シート、4つの逆平行 β シートから構成されていた。C-terminal domain は 1つの α ヘリックスと 4つの平行 β シート、3つの逆平行 β シートから構成されていた。FAD は Red_{IIIB} の中心に存在していた (Fig. 2-22b)。BDO-R, Red_{IIIA} 及び Pdr との C α の RMSD はそれぞれ、1.41 Å (374 原子)、1.51 Å (355 原子)、1.42 Å (362 原子) であり、主鎖構造は非常に良く似ていた。分解能が 3.54 Å と低く、アミノ酸側鎖の詳細な位置などの議論は出来ないため、主鎖構造の比較を行った。

2-2-6-3. Red_{IIIB} の Fd_{IIIB} 推定結合領域

現在までに、Pdr:Pdx 複合体、BDO-F:BDO-R 複合体などの結晶構造が得られており、その reductase コンポーネントの一次配列の相同性は高い。そのため、reductase コンポーネントの ferredoxin との相互作用領域はほぼ同様の位置であると考えられる。このため、これらの構造情報を利用して Red_{IIIB} の Fd_{IIIB} との相互作用領域を推定することとした。相互作用領域において、Red_{IIIB} は Pdr や Red_{IIIA} と比べてループ構造 (Arg63~Tyr68) の位置が相互作用領域の中心に向かってシフトしていることが明らかとなった (Fig. 2-23)。このシフトにより、BDO-R と同様の位置にループが存在していた。Pdr と Red_{IIIA}、BDO-R と Red_{IIIB} は電子伝達のカウンターパートである ferredoxin のタイプが異なる。すなわち、Pdr と Red_{IIIA} は Proteo-type ferredoxin と電子伝達を行い、BDO-R と Red_{IIIB} は Rieske-type ferredoxin と電子伝達を行う。先に述べた様に、Proteo-type ferredoxin と Rieske-type ferredoxin は相互作用領域の嵩高さが異なる。このことから、矢じり型で嵩の小さい Rieske-type ferredoxin と相互作用するために、Red_{IIIB} のループのシフトが起こっていると考えられる。Red_{IIIA} や Pdr はこの領域に Pro 残基を持っており、これは Red_{IIIB} や BDO-R では保存されていないこと (Fig. 2-24)。このことから、Pro 残基を持つ Red_{IIIA} や Pdr はアミノ酸主鎖が曲がり、結果としてこの部分が外側にシフトしているのではないかと考えられる。

Table 2-2. Red_{II}Bの結晶学的パラメータ

		Red _{II} B
Beamline	NW12A	
Wavelength (Å)	1.0000	
Space group	<i>P</i> 4 ₃ 32	
Unit cell parameters (Å, °)	$a = b = c = 169.3$ $\alpha = \beta = \gamma = 90$	
Resolution range (Å)	33.20–3.54	
No. of reflections	228922	
No. of unique reflections	10577	
Completeness (%)	99.3 (99.9)	
average I/σ	34.0 (6.6)	
R_{sym} (%)	10.1 (70.1)	
Multiplicity	21.6 (22.8)	
Refinement		
R_{factor} (%)	38.1	
R_{free} (%)	41.8	
RMSD		
Bond lengths (Å)	0.010	
Bond angles (°)	1.72	

a)



b)

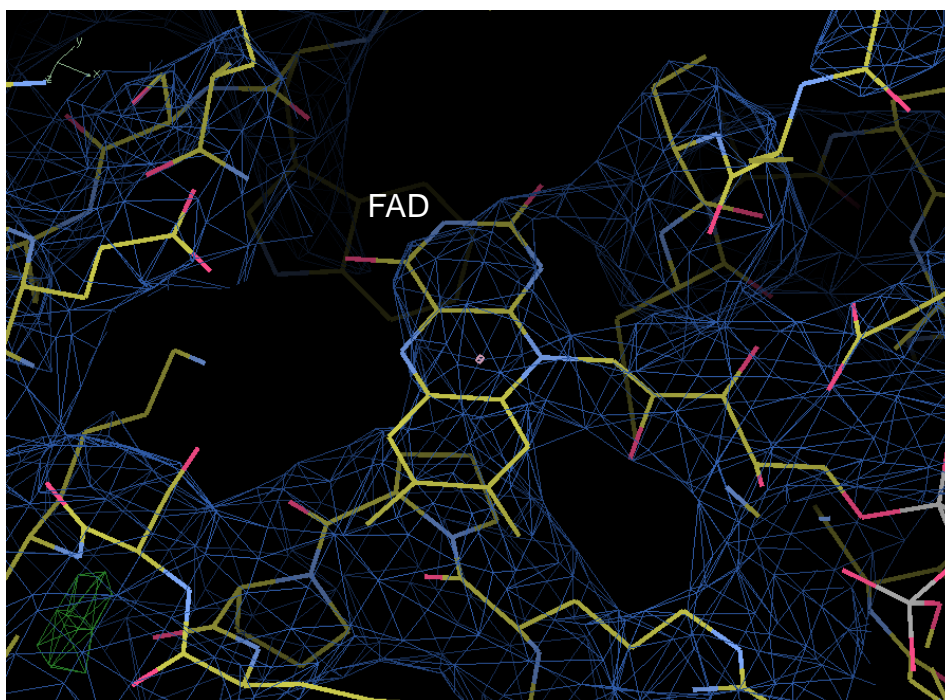


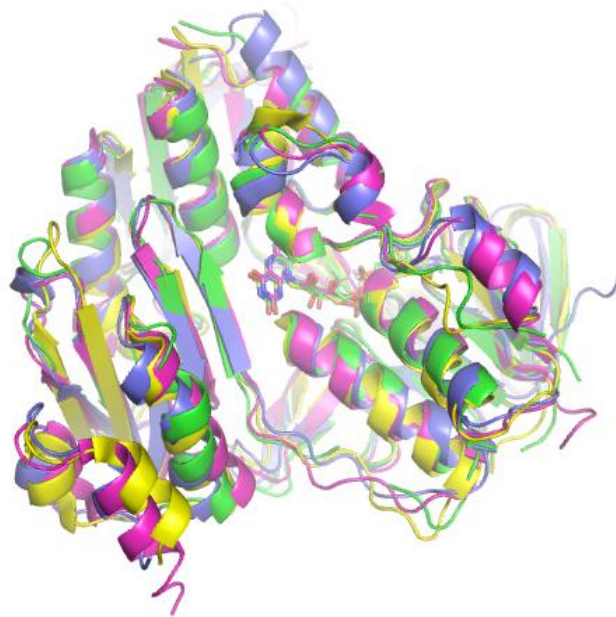
Figure 2-22. Red_{IIb}の結晶構造

タンパク質構造をリボン、FAD分子をスティックで示した

a): 全体構造

b): FADのイソアロキサジン環周辺の電子密度マップ。 $2F_o - F_c$ (青), $F_o - F_c$ (緑, 赤)

a)



b)

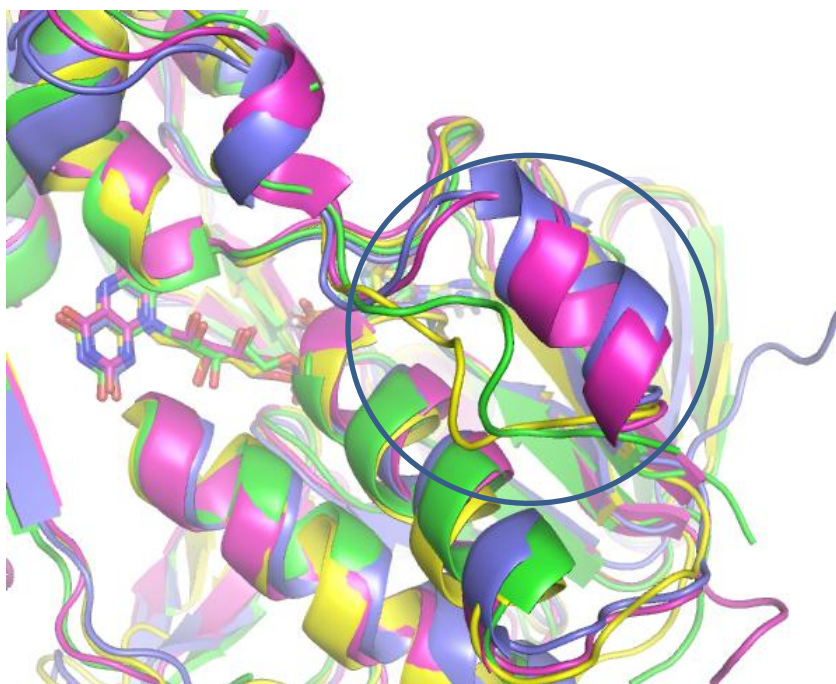


Figure 2-23. ONFRsの構造の重ね合わせ

タンパク質構造をリボン、FAD分子をスティックで示した

a): 全体構造

b): シフトの見られた部分 領域を○で囲んだ

緑: Red_{I_B}
黄色: BDO-R
青: Red_{IIA}
ピンク: Pdr

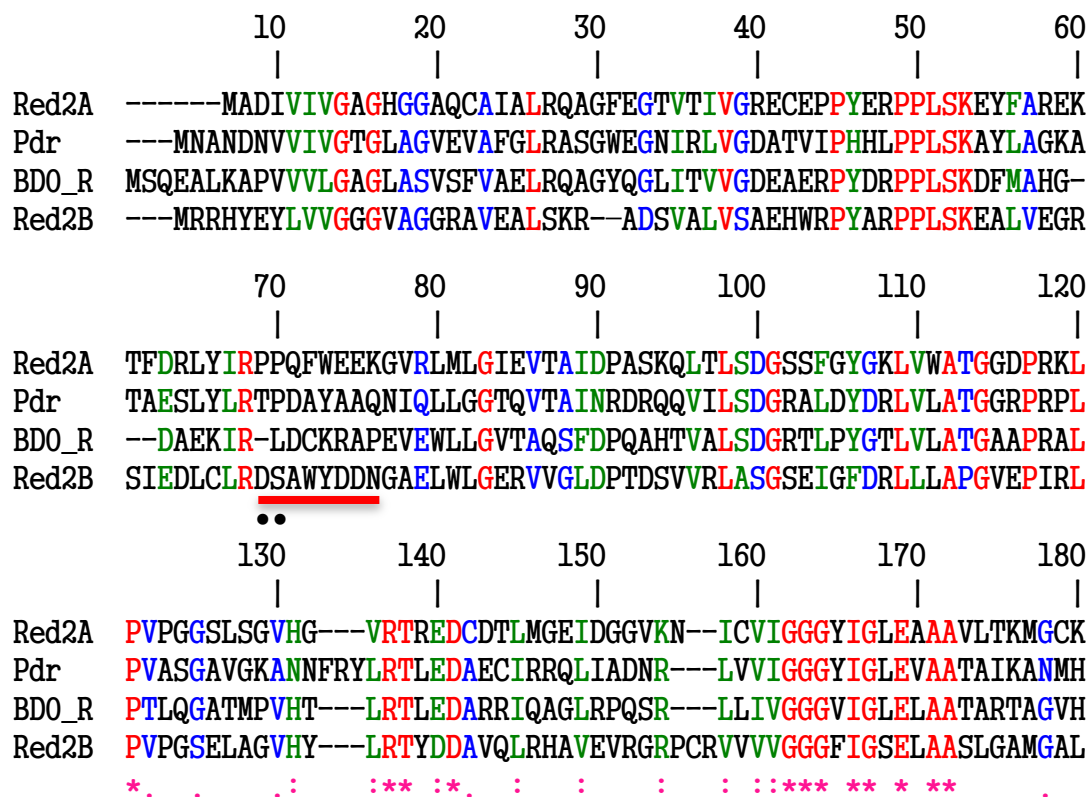


Figure 2-24. ONFRsの一次配列180残基までのalignment

Identicalなアミノ酸残基は赤, 高いsimilarityを示す残基は緑, 弱いsimilarityを示す残基は青で示した

シフトの見られた領域は赤線、Pro残基は●で示した

第三章

KA1 株由来クラス IIA CARDO における電子伝達選択性の 構造生物学的解明

3-1. 緒言

第二章では, Fd_{IIA} の結晶構造解析を行い, Fd_{IIA} が著しく高い酸化還元電位をとる要因を推定した. 電子伝達の可否にはそれぞれのコンポーネントの酸化還元電位の違いが大きく関わってくるが, もう 1 つの要因として, そもそも複合体を形成できるか否かがある.

そこで, 前任者により株由来 CARDO における $Oxy_{IIA}:Fd_{IIA}$ 複合体のドッキングシミュレーションが行われたが, それに用いた Fd_{IIA} の構造はモデリングに基づくものであった [香月, 2008]. 本研究において, Fd_{IIA} の結晶構造が得られた事から, 両者が結晶構造に基づくドッキングシミュレーションを行うことが出来るようになった. 得られるシミュレーション結果は, より実際の複合体構造に近いものであることが予想される. 本章では, KA1 株由来クラス IIA 型 CARDO における $Oxy_{IIA}:Fd_{IIA}$ ドッキングシミュレーションの結果と, クラス III 型の $Oxy_{III}:Fd_{III}$ の複合体結晶構造を比較する事で, 電子伝達選択性を決定する要因について考察した. また, KA1 株由来 $Fd_{IIA}:Red_{IIA}$ 複合体のドッキングシミュレーションを行い, ferredoxin と reductase の間での電子伝達互換性を生み出す要因を考察した. 本来, 比較対象として望ましいのは, $Red_{IIB}:Fd_{IIB}$ であるが, この複合体結晶は得られていないため, RO の中で唯一複合体の結晶構造が明らかとなっているクラス IIB 型の biphenyl dioxygenase における BDO-F:BDO-R 複合体の結晶構造を比較した.

3-2. 結果と考察

3-2-1. Oxy:Fd 複合体の電子伝達選択性の構造的要因

3-2-1-1. Oxy_{IIA}:Fd_{IIA} 複合体予測構造の解析

Oxy_{III}:Fd_{III} の結晶構造が解明され [Ashikawa et al., 2006], Oxy の結合部位が明らかとなっていることから, Oxy_{IIA} の対応する部位に Fd_{IIA} が結合しており, 計算された複合体予測構造の中からドッキングスコアのランクが高く, かつ短い電子伝達経路を持つものを採用した. Oxy_{IIA} にも, Oxy_{III} の Fd_{III} 結合部位は窪みがあるが, Oxy_{IIA} の推定 Fd_{IIA} 結合部位にも同様に窪みがあり, この領域に結合する可能性は高いと考えられる. Fig. 3-1 に Oxy_{IIA}:Fd_{IIA} 複合体予測構造と Oxy_{III}:Fd_{III} 複合体結晶構造及び Oxy_{IIB}:Fd_{IIB} 複合体予測構造 [Inoue et al., 2009]を示す. Oxy_{IIA}:Fd_{IIA} 予測構造におけるアミノ酸側鎖同士の水素結合する可能性のある組み合わせの数は 4 本 (Arg13NE_{Oxy}-Glu76O_{Fd}, Arg16NE_{Oxy}-Asp73O_{Fd}, Glu213OE2_{Oxy}-Arg92NH1_{Fd}, Arg121NH2_{Oxy}-ASP37OD1_{Fd}), であり, 相互作用領域の面積は 1226.9 Å²であった. 一方, Oxy_{III}:Fd_{III} では 5 本の水素結合 (Lys13NZ_{Oxy}-Glu64OE2_{Fd}, Arg11NH2_{Oxy}-Ser82OG_{Fd}, Glu353OE2_{Oxy}-His68NE2_{Fd}, Arg118_{Oxy}-Glu43_{Fd} (塩橋), Arg210NH1_{Oxy}-Glu55OE2_{Fd})であり, 相互作用領域の面積は 1056.0 Å²であった. Oxy_{IIA}:Fd_{IIA} の相互作用領域の面積は Oxy_{III}:Fd_{III} のそれよりも大きい, Fd_{IIA} の嵩高さを考慮すると, これは妥当な値であると考えられる. また, 水素結合の数もほぼ同じなため, Oxy_{IIA}:Fd_{IIA} の構造予測は正しい解を得られている可能性が高い. これまでに他の酸化酵素:ferredoxin 複合体の結晶構造が明らかになっているのは, P450_{scc}:Adx 複合体であるが, その結晶構造中では P450_{scc} と Adx の相互作用領域中 (1040 Å²)に 3 本の水素結合 (Lys339NZ_{P450_{scc}}-Asp72OD1_{Adx}, Lys343NZ_{P450_{scc}}-Asp76OD1_{Adx})が存在し, 相互作用領域の面積に対して水素結合は少ない.

Fig. 3-2 に Oxy_{IIA}:Fd_{IIA} 予測構造及び Oxy_{III}:Fd_{III} の結晶構造における電子伝達経路を示す. 予測構造において Fd_{IIA} の [2Fe-2S]クラスタと Oxy_{IIA} の [2Fe-2S]クラスタの距離は 16.5 Å で, Oxy_{III}:Fd_{III} 複合体における Fd_{III} の [2Fe-2S]クラスタと Oxy_{III} の [2Fe-2S]クラスタの距離 (15.0 Å)よりも少し長い, 実際の構造では, 複合体形成の際に結合表面の構造変化があると考えられるため, もう少し短くなると推測された.

3-2-1-2. 単体の静電表面の比較

これまでに得られている, Oxy_{IIA}, Oxy_{IIB}, Oxy_{III}, Fd_{IIA}, Fd_{IIB}, Fd_{III} の相互作用領域の静電ポテンシャルを Fig. 3-3 に示した. Oxy_{IIA}, Oxy_{IIB}, Fd_{IIA}, Fd_{IIB}, の相互作用領域は Oxy_{III}:Fd_{III} の結晶構造 [Ashikawa et al., 2006]から明らかとなっているものを基に推定した.

全てのクラスの Oxy に共通して, Oxy の相互作用領域 (黄色い丸で囲まれた部分)の中心は窪んでおり, そこに Fd が突き刺さるように結合していたが, 窪みに突き刺さった Fd を固定するように Oxy の突出している領域が存在していた (Oxy_{III} では Arg11, Lys13 の側鎖,

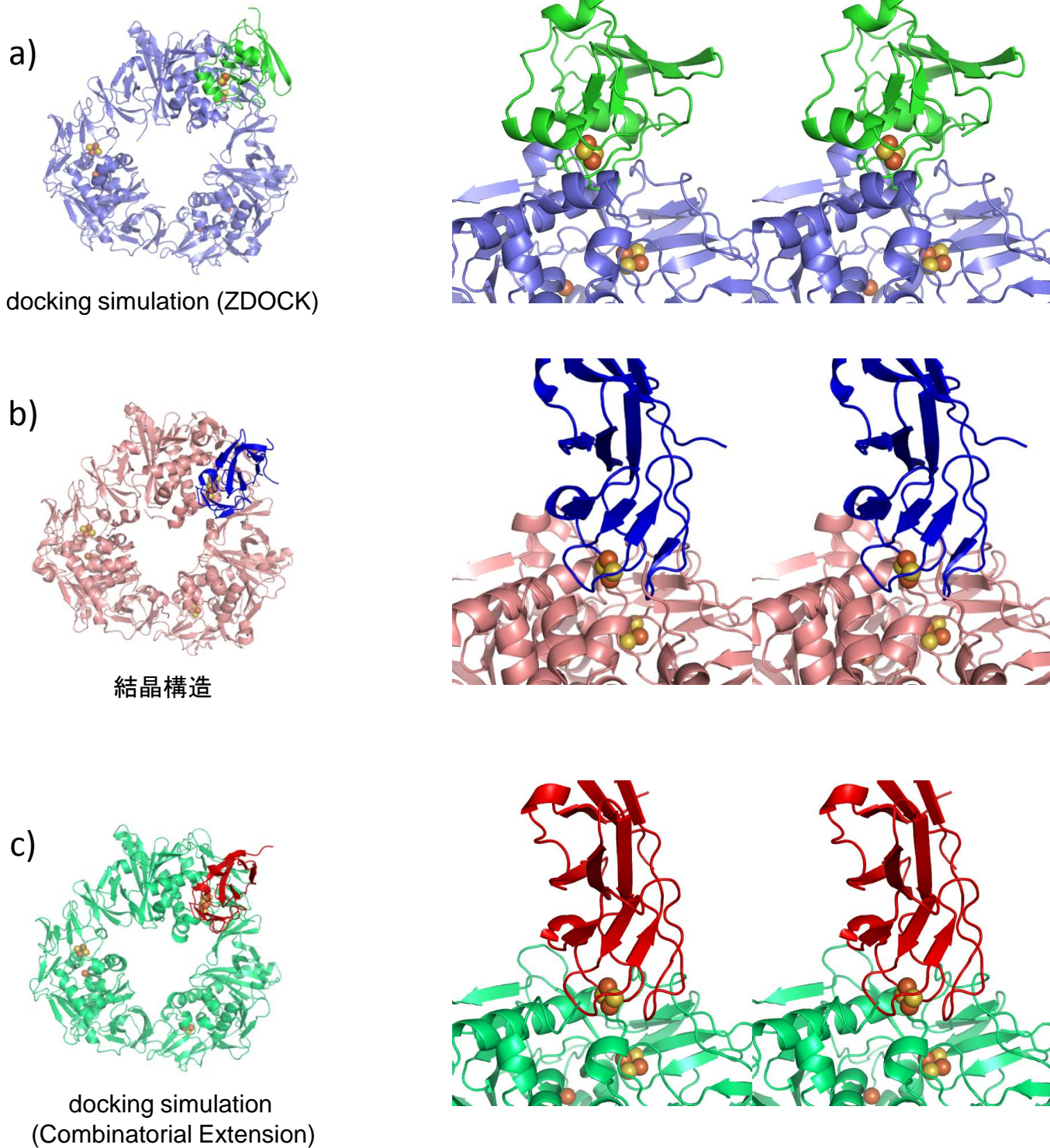


Figure 3-1. Oxy:Fd複合体の結合様式

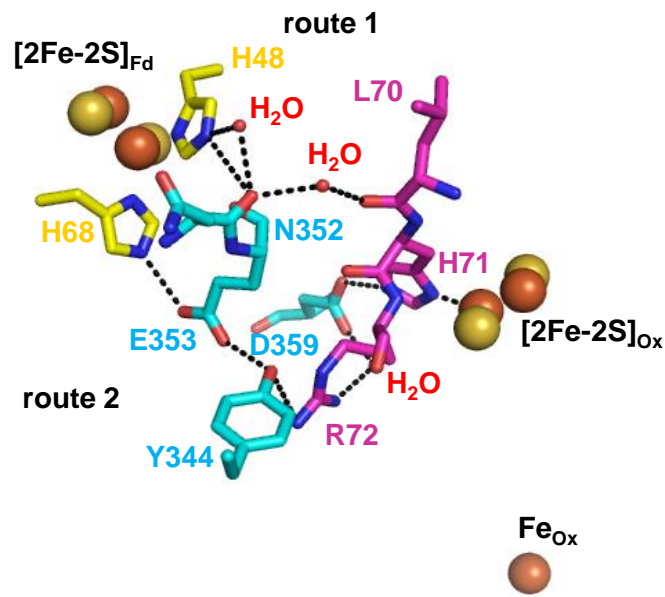
a) $Oxy_{IIA} \cdot Fd_{IIA}$. Oxy_{IIA} は水色は Oxy_{IIA} , 緑は Fd_{IIA} を表す.

b) $Oxy_{III} \cdot Fd_{III}$. ピンクは Oxy_{III} , 青は Fd_{III} を表す. [Ashikawa et al., 2006]

c) $Oxy_{IIB} \cdot Fd_{IIB}$. 緑は Oxy_{IIB} , 赤は Fd_{IIB} を表す [Inoue et al., 2009]

左は全体構造を示し, 右は相互作用領域をステレオ図で示した. 鉄原子は茶色, 硫黄原子は黄色の球で示した. 複合体構造を得た手法を全体構造の下に示した.

a)



b)

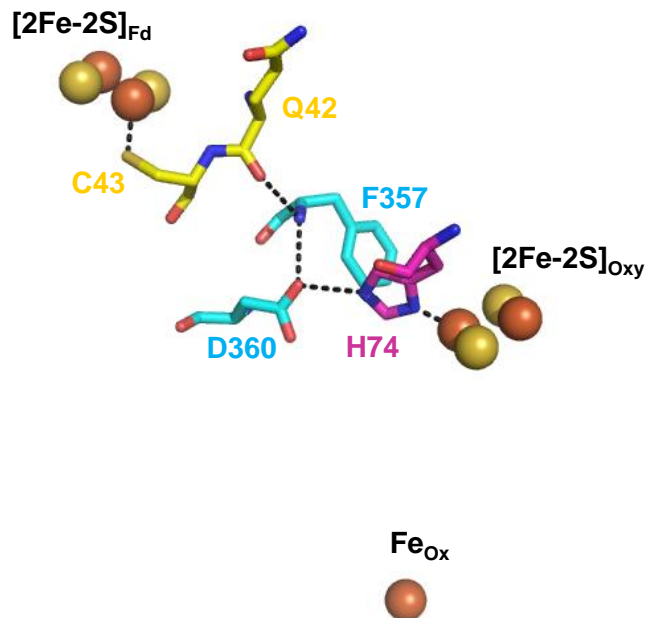


Figure 3-2. Oxy:Fdの電子伝達経路

- a) Oxy_{III}:Fd_{III}複合体の結晶構造における電子伝達経路. 黄色はFd_{III}コンポーネント, 水色はOxy_{III} A chain, 紫はOxy_{III} B chainを表す [Ashikawa et al., 2006].
- b) Oxy_{IIA}:Fd_{IIA}結晶ドッキング構造における電子伝達経路. 黄色はFd_{IIA}, 水色はOxy_{IIA} B chain, 紫はOxy_{IIA} C chainを表す.

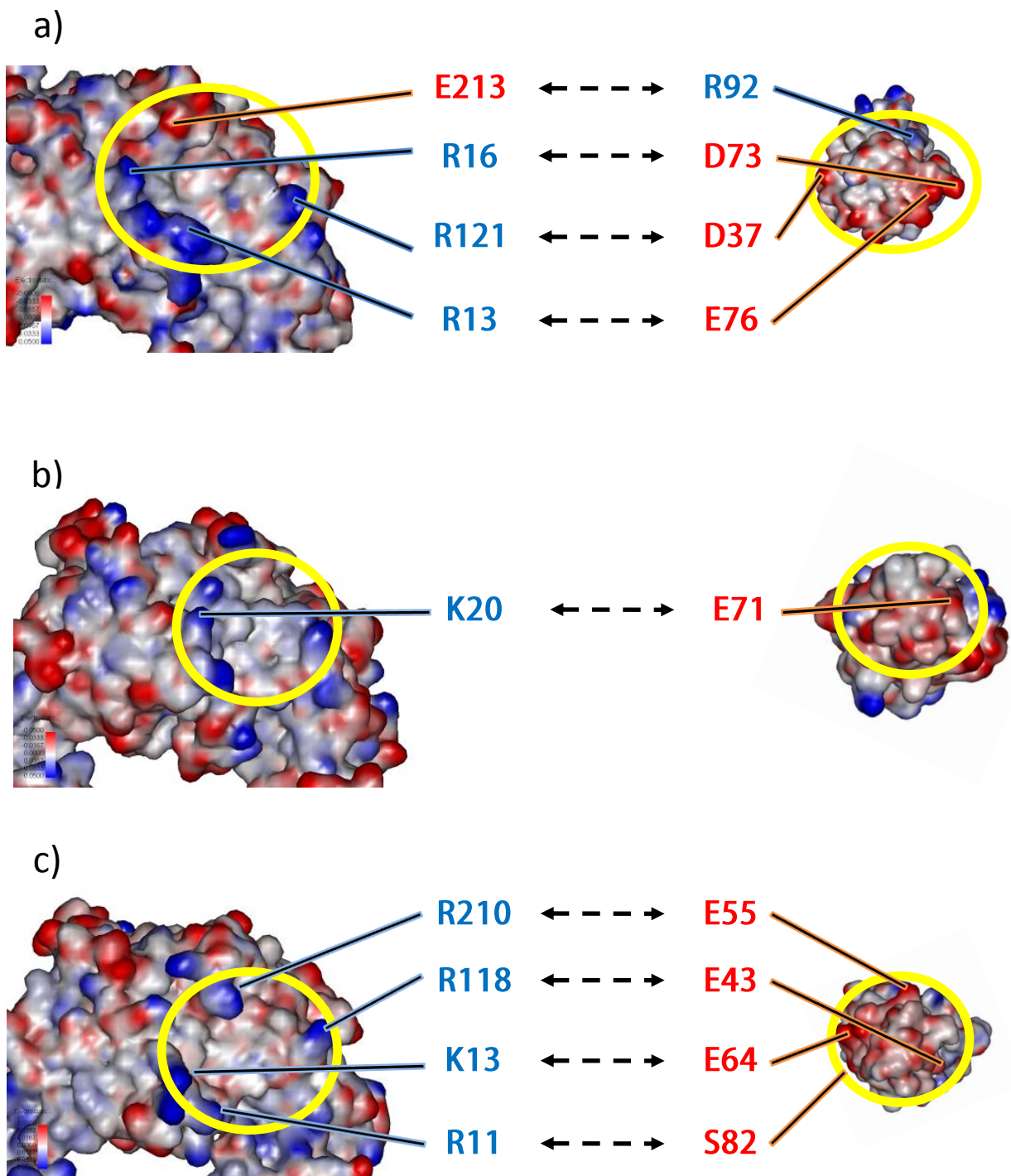


Figure 3-3. それぞれのOxy, Fdの相互作用領域の静電ポテンシャルの比較

相互作用領域を真上から見たアングルを示す。

a) Oxy_{IIA} (左), Fd_{IIA} (右),

b) Oxy_{IIB} (左), Fd_{IIB} (右),

c) Oxy_{III} (左), Fd_{III} (右).

相互作用領域 (黄色丸)は, Oxy_{III}:Fd_{III}複合体の結晶構造から推測した。Fdは1.3倍に拡大して示した。

Arg118 の側鎖, Arg210 の側鎖の 3 ヶ所. Oxy_{IIA} では Arg13 の側鎖, Arg121 の側鎖, Asp211, Glu213 の側鎖の 3 ヶ所, Oxy_{IIB} では Lys20 の側鎖, Lys124 の側鎖の 2 か所). この部分の間隔は Fd の相互作用領域の広さに相関があり Oxy_{IIA} が広い. 複合体構造では突起の間に Fd がうまくはまるようになっていた. この突起の部分は特に極性が高いが, 一方で中心部は疎水性が高く, 電荷は中性に近かった. しかし, 極性部分の相対的な位置関係やその強さはそれぞれで異なっていた. Oxy_{IIA} では Arg13, Arg14, Arg16 で構成される領域において広範囲に塩基性度の高い領域が存在し, また, 唯一酸性度の高い領域 (Glu213) が存在していた. Oxy_{III} と Oxy_{IIB} は, Oxy_{IIA} とは異なり, 広範囲の極性領域は存在しなかった. Oxy_{IIB} では, 僅かではあるが推定相互作用領域の中心部の塩基性度が高くなっていた.

Fd_{IIA} の相互作用領域には, Oxy_{IIA} の広範囲の塩基性度の高い領域と対を成すように Glu73, Glu76 で構成される広範囲の酸性度の高い領域が存在していた. また, Oxy_{IIA} の酸性度の高い領域とも対を成すように塩基性度の高い領域 (Arg92) が存在していた. Fd_{III} も同様に, Oxy_{III} の塩基性度の高い領域と対を成すように酸性度の高い領域が存在し, 複合体中においてそれぞれの表面電荷が互いに相補されている様子が観察された. 一方, Fd_{IIB} ではそれほど表面電荷が相補される様子はなかったが, 相互作用領域の中央部に酸性度の高い領域が存在しており, 先述のように Oxy_{IIB} の中心部の塩基性の高い領域と相補する可能性が考えられる. これらのことから, Oxy:Fd 複合体の形成には両分子における表面電荷の相補性が重要な因子である事が考えられる.

水を主体とする溶媒の中では, 疎水性相互作用が複合体形成の主要な駆動力となると考えられる. いずれの Oxy の相互作用領域の中心は静電ポテンシャルとしては中性に近く, 外側の部分がより大きな電荷を持つ. また, 疎水性相互作用は非特異的な相互作用であることが多い. このため, Oxy の相互作用領域の外側の電荷分布の違いが厳密な相互認識に大きく関わっていると考えられる. 特に Fd_{IIB} や Fd_{III} は Fd_{IIA} と比べて相互作用領域が狭いため, 全体における静電相互作用の占める割合が大きくなると考えられる. このため, クラスの異なる組み合わせでは, 表面電荷の相補の度合いが少なくなってしまう, 複合体形成が出来なくなると考えられる.

また, 結晶構造中では, Oxy_{IIA} の N 末端の 7 残基までと Oxy_{IIB} の N 末端の 15 残基までは disorder していた. このため, これらの N 末端は大きく揺らいでいる. また, Fig. 3-4 に示すように, 前任者により Oxy_{IIA} の N 末端の構造は Oxy_{III} のそれとは異なる構造をとることが明らかとされていた [香月, 2008]. N 末端は Oxy の相互作用領域に近接しており, 複合体形成時に Fd と相互作用をすると推測される. Fig. 3-5 に各クラスの Oxy の N 末端部分のアミノ酸配列のアライメントを示した. Fig. 3-5 から明らかのように, Oxy の N 末端はそれ以降の領域と比べて相同性が低い. また, 塩基性アミノ酸残基や酸性アミノ酸残基の数や分布も異なっている. このため, それぞれの Oxy で N 末端の形状とその荷電状態が大きく異なると推測される. このことから, N 末端が Oxy:Fd 複合体形成時にカウンターパートとの認識に重要な役割を担うと考えられる.

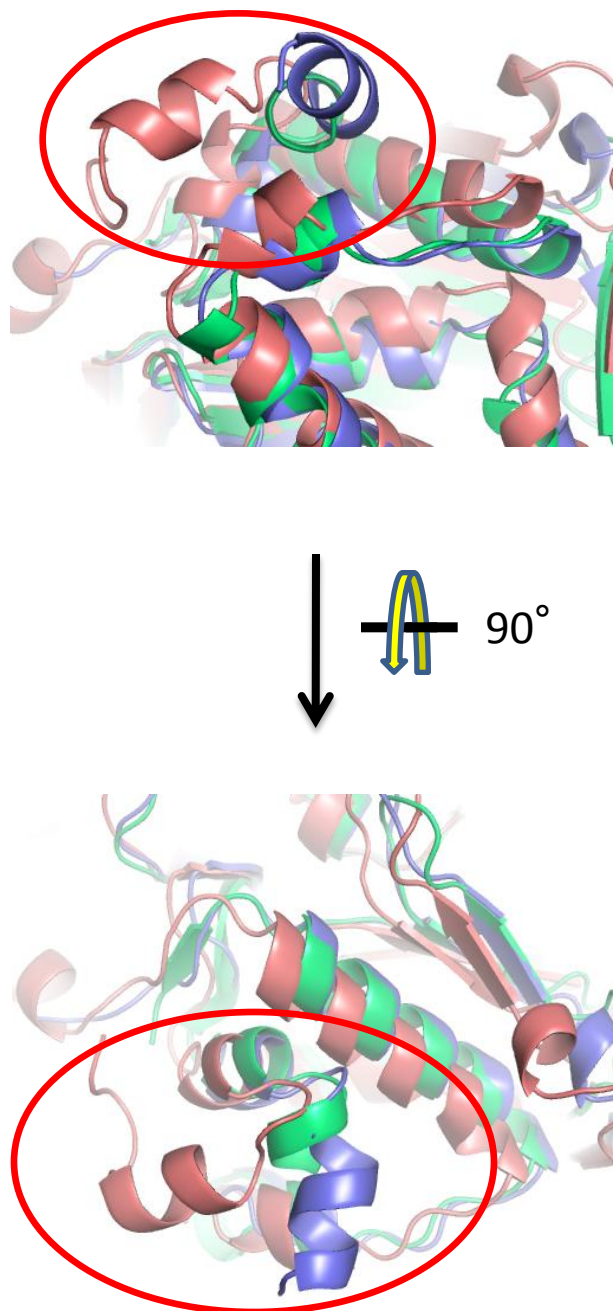


Figure 3-4. OxyのN末端の構造の違い

Oxy_{III}はピンク, Oxy_{IIA}は青, Oxy_{IIB}は緑で示した. N末端領域を丸で囲んだ.

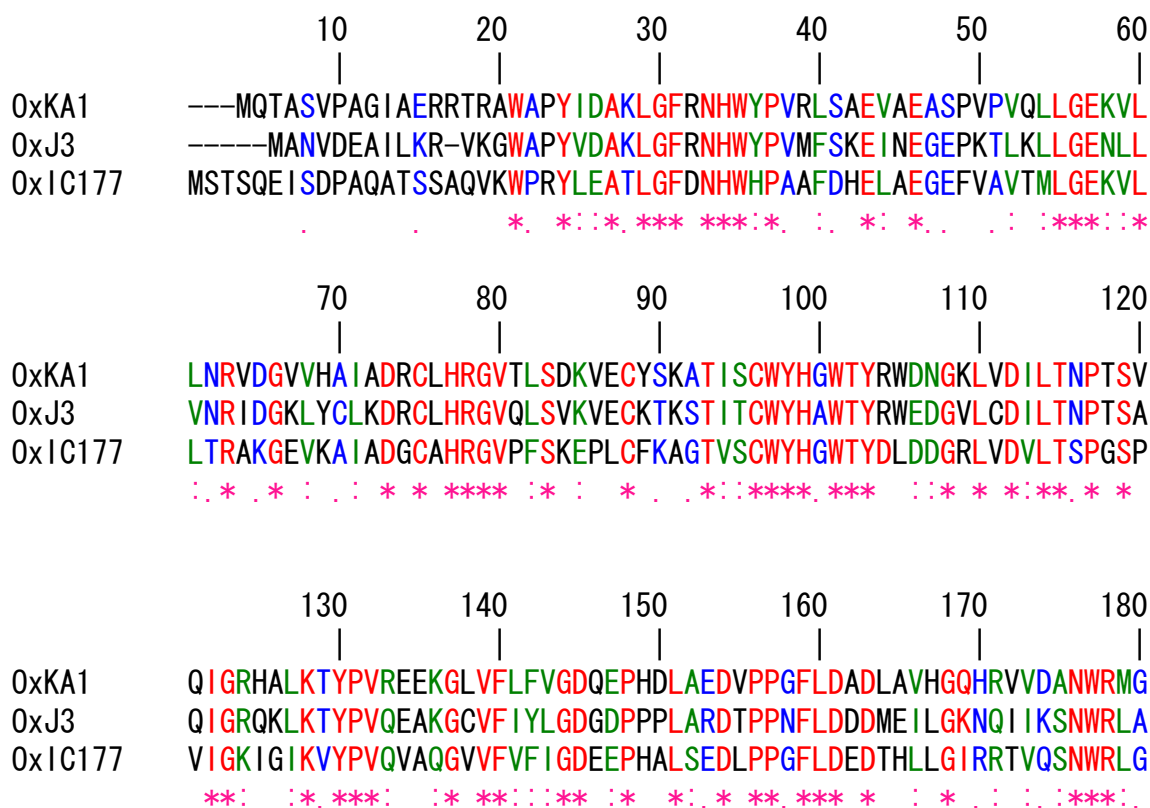


Figure 3-5. Oxy_{IIA} (OxKA1), Oxy_{III} (OxJ3), Oxy_{IIB} (OxIC177) のN末端から180残基までのアミノ酸配列のアライメント解析

Identicalなアミノ酸残基は赤, 高いsimilarityを示す残基は緑, 弱いsimilarityを示す残基は青で示した。

3-2-1-3. クラス III 型, IIB 型 CARDO との (推定)Oxy:Fd 相互作用様式の比較.

相互作用領域の面積は, Oxy_{III}:Fd_{III} が 1056.0 Å², Oxy_{IIB}:Fd_{IIB} が 660.3 Å², Oxy_{IIA}:Fd_{IIA} が 1226.9 Å² であった. Oxy_{IIB}:Fd_{IIB} の相互作用領域は小さいが, これはモデリングによるためであると考えられる.

Fig. 3-6 に示すように, 結晶構造が得られている Oxy_{III}:Fd_{III} と Oxy_{IIA}:Fd_{IIA} の予測構造を比較すると, 先に述べたように Oxy の N 末端の構造が異なっているため, N 末端の役割が異なっている. Oxy_{IIA}:Fd_{IIA} の構造では, Oxy_{IIA} の N 末端と Fd_{IIA} が相互作用をしているのに対し, Oxy_{III}:Fd_{III} 結晶構造では, N 末端が Fd_{III} から離れるような向きをしており, このため N 末端が Fd_{III} と相互作用を形成していなかった.

また, Fd_{IIA} は Fd_{III} 比べて 20°程度傾いて結合していた. これは Oxy の相互作用領域の構造の違いに起因すると考えられる. Fig. 3-6 に示すように, N 末端の突出の位置が他のものと比べて相互作用領域の中央側に来ているため, 他のものと同様の角度で結合しようとする と衝突が起きてしまうためだと考えられる.

このように, Oxy と Fd は互いに噛み合うように, 隙間を生まないように結合している. この時, 先に述べた N 末端の構造が各々で異なっているため, Oxy_{IIA}:Fd_{IIA} のように衝突を避けるように結合が起きているとすれば, クラス特異的な結合角度があり, 異なる組み合わせでは N 末端が主な立体的な障害となり, 複合体が形成されないと推測される. このように, 表面構造が一致するかどうかにより複合体形成の可否が決まると考えられる.

Oxy と Fd の電子伝達選択性のまとめとして, Fig. 3-7 にクラス特異的な複合体形成を可能にする要因を模式図として示した. これまで述べてきたように, 本来の組み合わせでは, 表面電荷の相補による結合の強化とともに鍵と鍵穴のようにタンパク表面の形状が一致する. クラスを組み合わせると, Fd_{IIA} のような嵩高い相互作用領域をもつものは, 他のクラスの Oxy とは形状が一致せず, 結合をすることが出来ないと考えられる. 一方, Fd_{IIB} や Fd_{III} といった嵩の小さいものは幅の広い Oxy_{IIA} の窪みや, 同程度の広さの窪みを持つ Oxy_{IIB} や Oxy_{III} に嵌ることが可能であるかもしれないが, クラスが異なる組み合わせでは表面電荷の相補がなく, 安定な複合体を形成することが出来ないと考えられる. このため, 異なる組み合わせでは電子伝達が起きず, 本来の組み合わせでのみ電子伝達が可能であるという, Oxy と Fd の間での厳密な相互認識が生まれると推測される.

3-2-2. Fd:Red 複合体の電子伝達選択性の構造的要因

3-2-2-1. クラス IIA 型 Fd:Red 複合体のドッキングシミュレーション

ZDOCK を用いて, 前任者が明らかにした Red_{IIA} [香月, 2008], 本研究において明らかとなった Fd_{IIA} の単体構造を用いてドッキングシミュレーションを行った. 既に ferredoxin:reductase の複合体結晶構造が明らかとなっている BDO-F:BDO-R [Senda et al., 2007]における BDO-R と Red_{IIA} のアミノ酸配列の相同性が高く (identity: 36.5%, similarity:

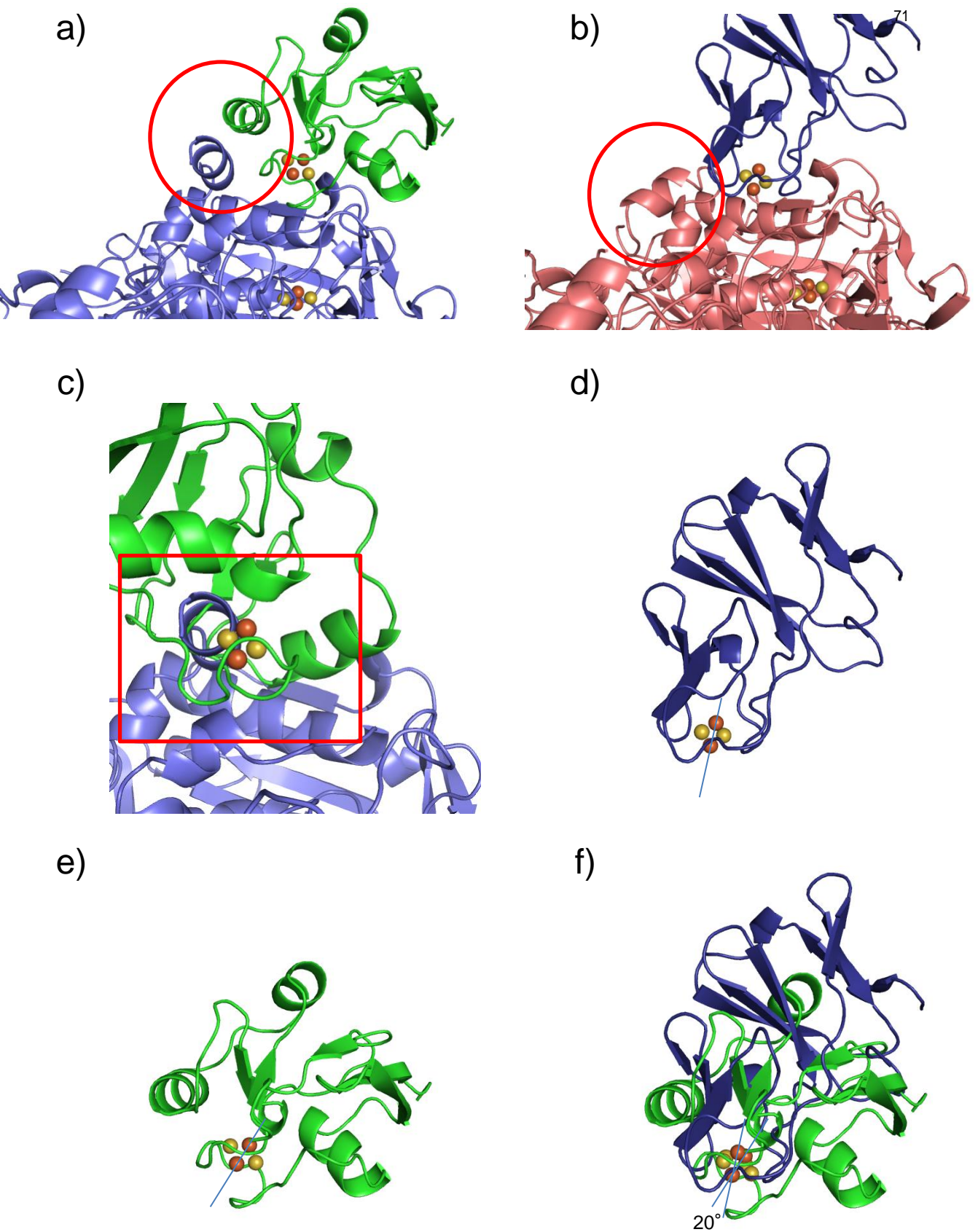
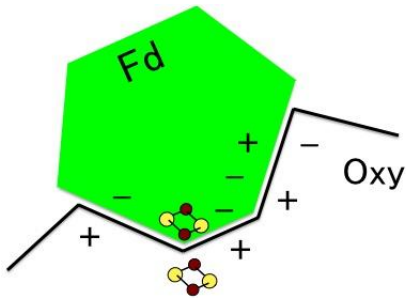


Figure 3-6. Fd_{IIA} と Fd_{III} の結合角度の比較とN末端の衝突

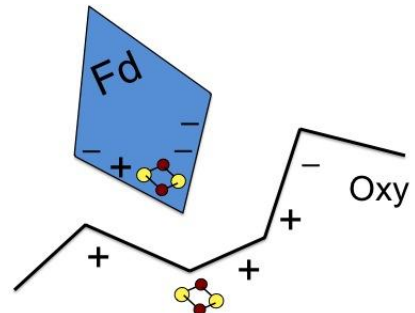
- a) Oxy_{IIA} : Fd_{IIA} 相互作用領域. Fd_{IIA} を緑, Oxy_{IIA} を水色で示した. Oxy_{IIA} のN末端と Fd_{IIA} が相互作用している領域を丸で囲んだ.
- b) Oxy_{III} : Fd_{III} 相互作用領域. Fd_{III} を青, Oxy_{III} をピンクで示した. Oxy_{III} のN末端部分を丸で囲んだ.
- c) Fd_{IIA} が Fd_{III} と同じ結合角度だった場合の構造. Fd_{IIA} を緑, Oxy_{IIA} を水色で示した. 衝突している領域を四角で囲んだ.
- d) Oxy_{IIA} : Fd_{IIA} 複合体における Fd_{IIA} . [2Fe-2S]クラスターの鉄分子を直線で結んだ.
- e) Oxy_{III} : Fd_{III} 複合体における Fd_{III} . [2Fe-2S]クラスターの鉄分子を直線で結んだ.
- f) Fd_{IIA} と Fd_{III} の重ね合わせ. 二つの直線から形成される角度はおおよそ 20° となった.

a)



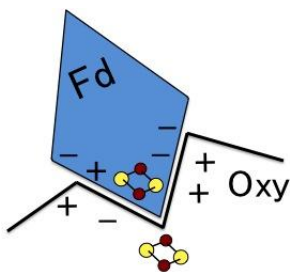
形状が一致し電荷が相補
電子伝達可能

b)



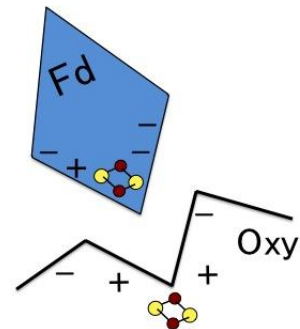
形状が一致しない
電子伝達不可

c)



形状が一致し電荷が相補
電子伝達可能

d)



形状は一致するが
電荷が相補しない
電子伝達不可

Figure 3-7. OxyとFdの電子伝達互換性に関わる要因の模式図

- Oxy_{IIA}とFd_{IIA}の組み合わせ。形状が一致し電荷が相補されるため電子伝達は可能である。
- Oxy_{IIB/III}とFd_{IIA}の組み合わせ。形状が一致しないために電子伝達は不可能である。
- Oxy_{III}とFd_{III}の組み合わせ。形状が一致し電荷が相補されるため電子伝達は可能である。
- Oxy_{IIA}とFd_{IIB/IIIB}の組み合わせ。Oxの窪みに嵌ることが出来る可能性はあるが表面電荷の相補がないため電子伝達は不可能である。

28.4%), RMSD も 1.61 Å と立体構造も似ている事から, Oxy_{IIA}:Fd_{IIA} の結合様式は BDO-F:BDO-R と類似していると考えられる. このことから得られたドッキングモデルのなかで, BDO-F:BDO-R 複合体と同様の結合様式をとり, かつ電子伝達経路が最も短いものを採用した. また, Red_{III} の立体構造は明らかとなっているが, Red_{IIA} とは保持する補因子や, ドメインの構成が異なるため比較は行わなかった.

3-2-2-2. Fd_{IIA}:Red_{IIA} と BDO-F:BDO-R, Pdr:Pdx の相互作用領域の比較

Fig. 3-8 に Fd_{IIA}:Red_{IIA} と BDO-F:BDO-R, Pdr:Pdx の結合の様子を示す. 相互作用領域の面積は Fd_{IIA}:Red_{IIA} が 1258.3 Å², BDO-F:BDO-R が 729.7 Å², 365 Å² であった. 他の ferredoxin:reductase 複合体の結晶構造が得られている, トウモロコシ由来 ferredoxin:reductase [Kurusu et al., 2001], adrenodoxin:adrenodoxin reductase [Müller et al., 2001], anabaena 由来 ferredoxin:reductase [Morales et al., 1998], rubredoxin:rubredoxin reductase [Hagulueken et al., 2007] の相互作用領域の面積は, それぞれ 933.1 Å², 1201.6 Å², 920.2 Å², 693.5 Å² であった. また, Red_{III} は Red_{IIA} や Red_{IIIB} とは保持する補因子の種類が異なり (Red_{III} は FAD と plant 型 [2Fe-2S] クラスタ, Red_{IIIB} は FAD のみ), ドメインの構成も異なるために, 構造が大きく異なると考えられる (Fig. 3-9). しかし, 推定相互作用領域と考えられる [2Fe-2S] クラスタ付近のタンパク表面の窪みの面積は 920.1 Å² であり, Red_{IIA} の相互作用領域よりも狭い. Fd_{IIA}:Red_{IIA} の電子伝達経路を Fig. 3-10 に示す. Fd_{IIA} の [2Fe-2S] クラスタと Red_{IIA} の FAD との距離は 10.8 Å であり, BDO-F と BDO-R, Pdx と Pdr ではそれぞれ 11.0 Å, 12.5 Å であり, 同様の値であった.

先に述べたように, Red_{IIA} の相互作用領域は BDO-R の相互作用領域よりも広い. これは, Fig. 3-11 に示すように Red_{IIA} の 61 番目から 70 番目にある α ヘリックスを含む領域が Red_{IIIB} や BDO-R のもの (それぞれ, 64 番目から 69 番目, 64 番目から 72 番目までの領域であるが, α ヘリックスは形成しておらず, Red_{IIIB} の場合は 70 番目以降の構造は見えていない) よりも後方にシフトしていることに起因すると考えられる. Fig. 2-24 に示したように, Red_{IIA} や Pdr ではシフトの始まる部分には, 一般的にタンパク主鎖構造を湾曲させる Pro 残基が存在していた. この Pro 残基によりループのシフトが起こっていると考えられる. Red_{IIA} ではこの領域が後方にシフトしていることにより, 相互作用領域が嵩高い Fd_{IIA} との複合体形成時に衝突を避けると考えられる (Fig. 3-12a, c). Red_{IIA} と BDO-F, BDO-R と Fd_{IIA} を組み合わせると, Red_{IIA} と BDO-F の場合は, Red_{IIA} のこのシフトにより隙間が生じているが (Fig. 3-12b), BDO-R と Fd_{IIA} の場合はこのシフトが無いために衝突していた (Fig. 3-12d).

Pdx:Pdr 複合体と Fd_{IIA}:Red_{IIA} を比較すると, reductase を重ね合わせた場合, Pdr に対して Fd_{IIA} は約 65° 回転した状態で結合していた (Fig. 3-13). Pdx:Pdr で見られたアミノ酸側鎖同士の水素結合は, Arg310_{Pdr}-D38_{Pdx}, Lys409_{Pdr}-E72_{Pdx} (Fig. 3-14b) であり, 後者は Fd_{IIA}:Red_{IIA} で見られた Lys402_{Red}-E69_{Fd} (Fig. 3-14a) と保存されていた. 一方で, Pdr の Arg310 は Red_{IIA} では保存されておらず, Fd_{IIA}:Red_{IIA} においてこの位置で極性アミノ酸残基が近傍に存在する事は

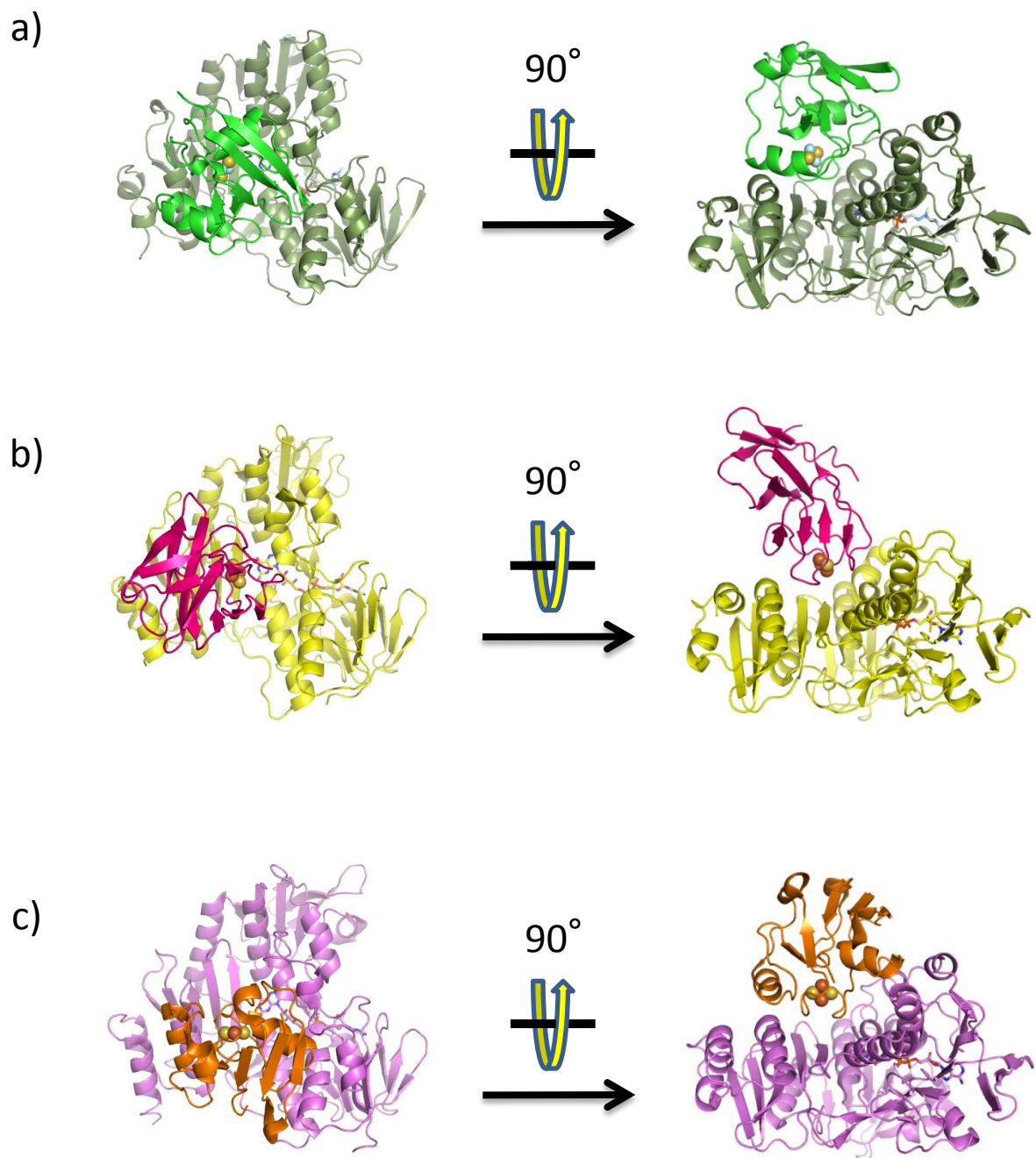


Figure 3-8. Fd_{IIA}:Red_{IIA}, BDO-F:BDO-RとPdx:Pdrの複合体結合様式

a) Fd_{IIA}:Red_{IIA}複合体予測構造. Fd_{IIA}を緑, Red_{IIA}を深緑で示す.

b) BDO-F:BDO-R複合体結晶構造. [Senda et al., 2007]. BDO-Fを赤, BDO-Rを黄色で示す.

c) Pdx:Pdr複合体結晶構造. [Sevrioukova et al., 200]. Pdxを橙色, Pdrを紫色で示す.

FADはスティック, 鉄原子は茶色, 硫黄原子は黄色の球で示した.

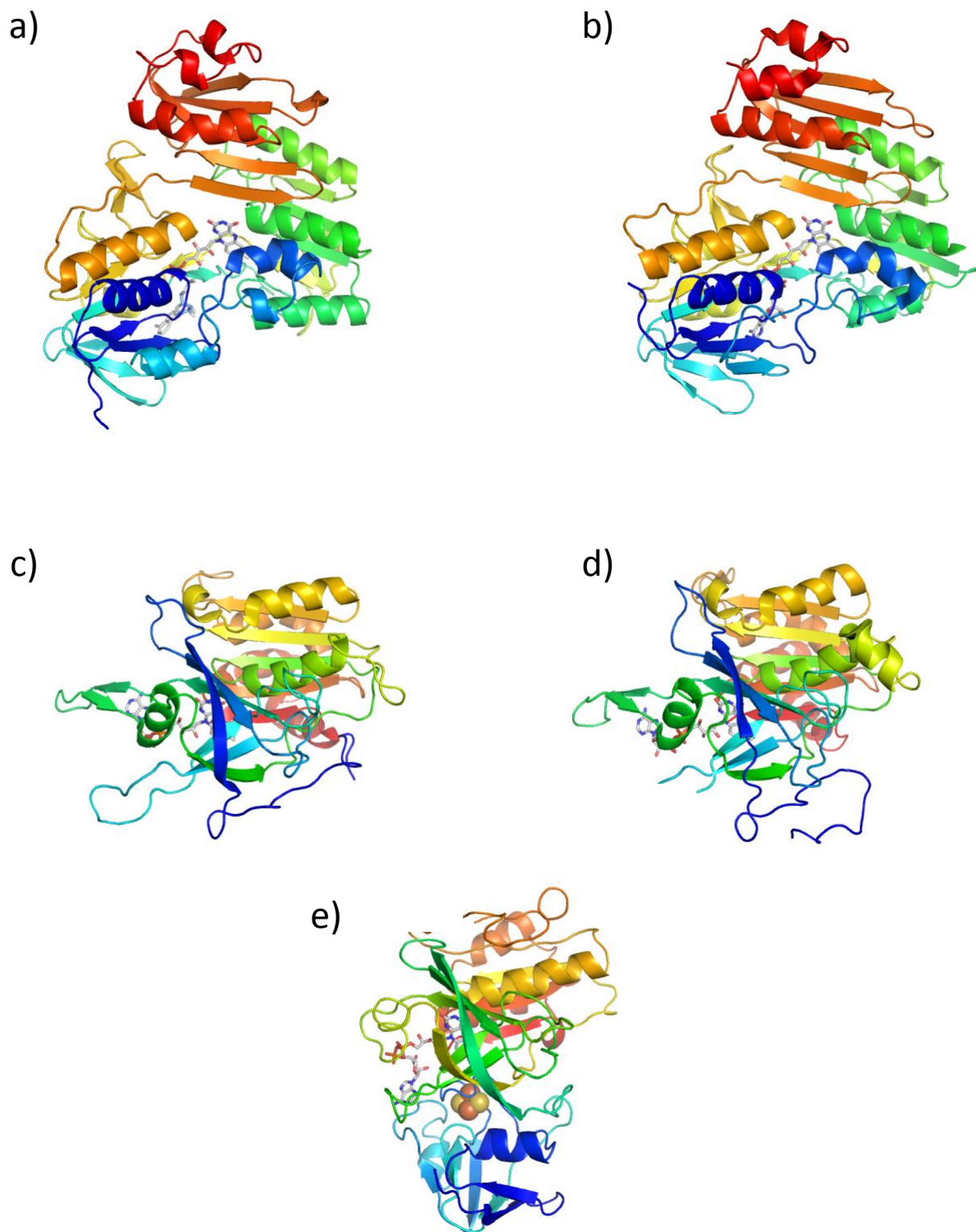


Figure 3-9. Ferredoxin reductaseの立体構造

補因子であるFADでそれぞれの構造を重ね合わせたときの構造を示す.

a)Red_{IIA} [Ashikawa et al., in preparation]

b)BDO-R [Senda et al., 2000].

c)トウモロコシ由来ferredoxin reductase [Kurisu et al., 2001].

d)adrenodoxin reductase [Muller et al., 2001].

e)Red_{III}.

FADはスティックで表示し, 鉄原子は茶色, 硫黄原子は黄色の球で示した.

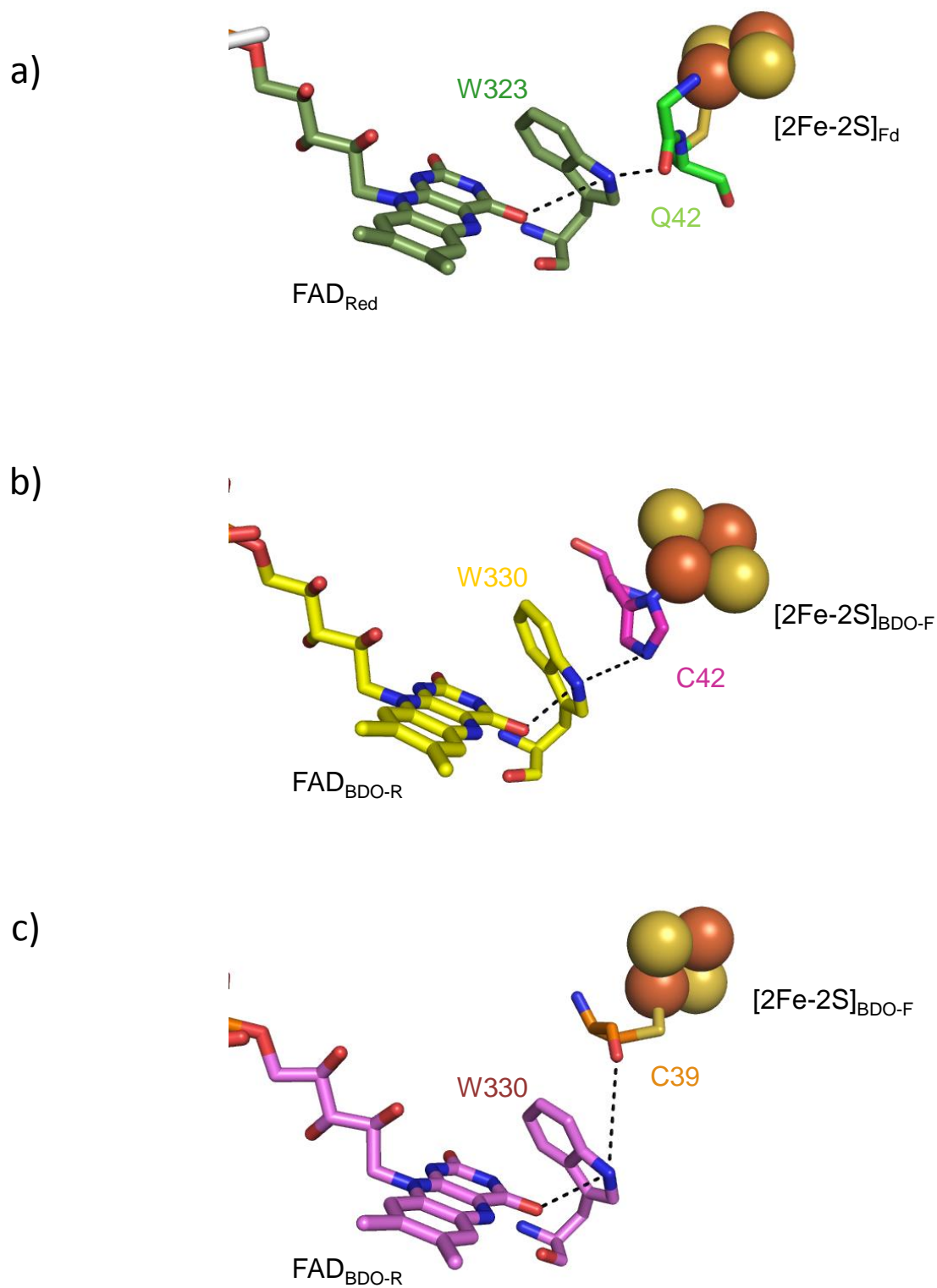


Figure 3-10. Oxy:Fdの電子伝達経路

- a) Fd_{III}:Red_{IIA}複合体予測構造における電子伝達経路. 緑:Fd_{III}, 深緑:Red_{IIA}.
 b) BDO-F:BDO-R複合体結晶構造における電子伝達経路. ピンク:BDO-F, 黄色:BDO-R
 c) Pdx:Pdr複合体結晶構造における電子伝達経路. オレンジ:Pdx, 紫:Pdr

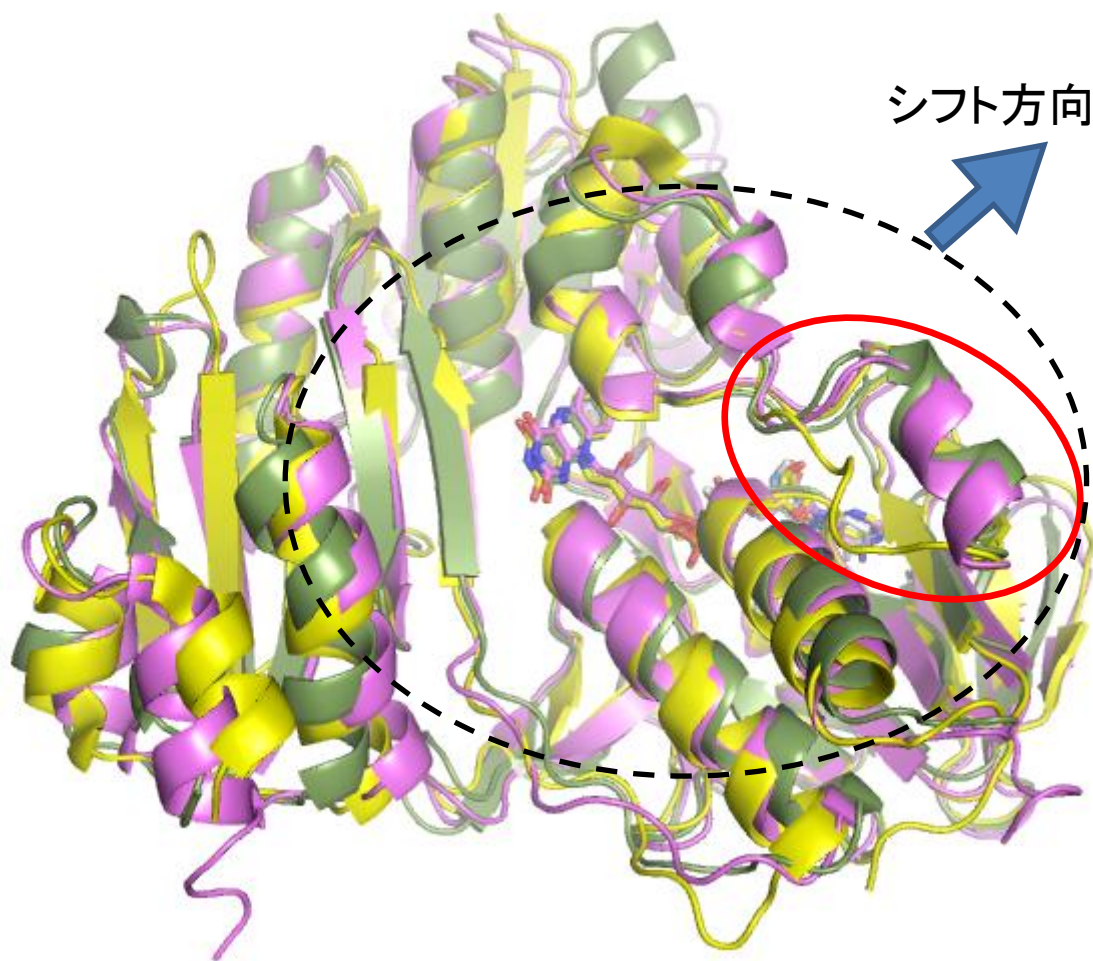


Figure 3-11. Red_{IIA}のヘリックスのシフト

Red_{IIA}を深緑, BDO-Rを黄色, Pdrを紫で示す。破線は相互作用領域を示し、シフトしている領域を赤丸で示した。

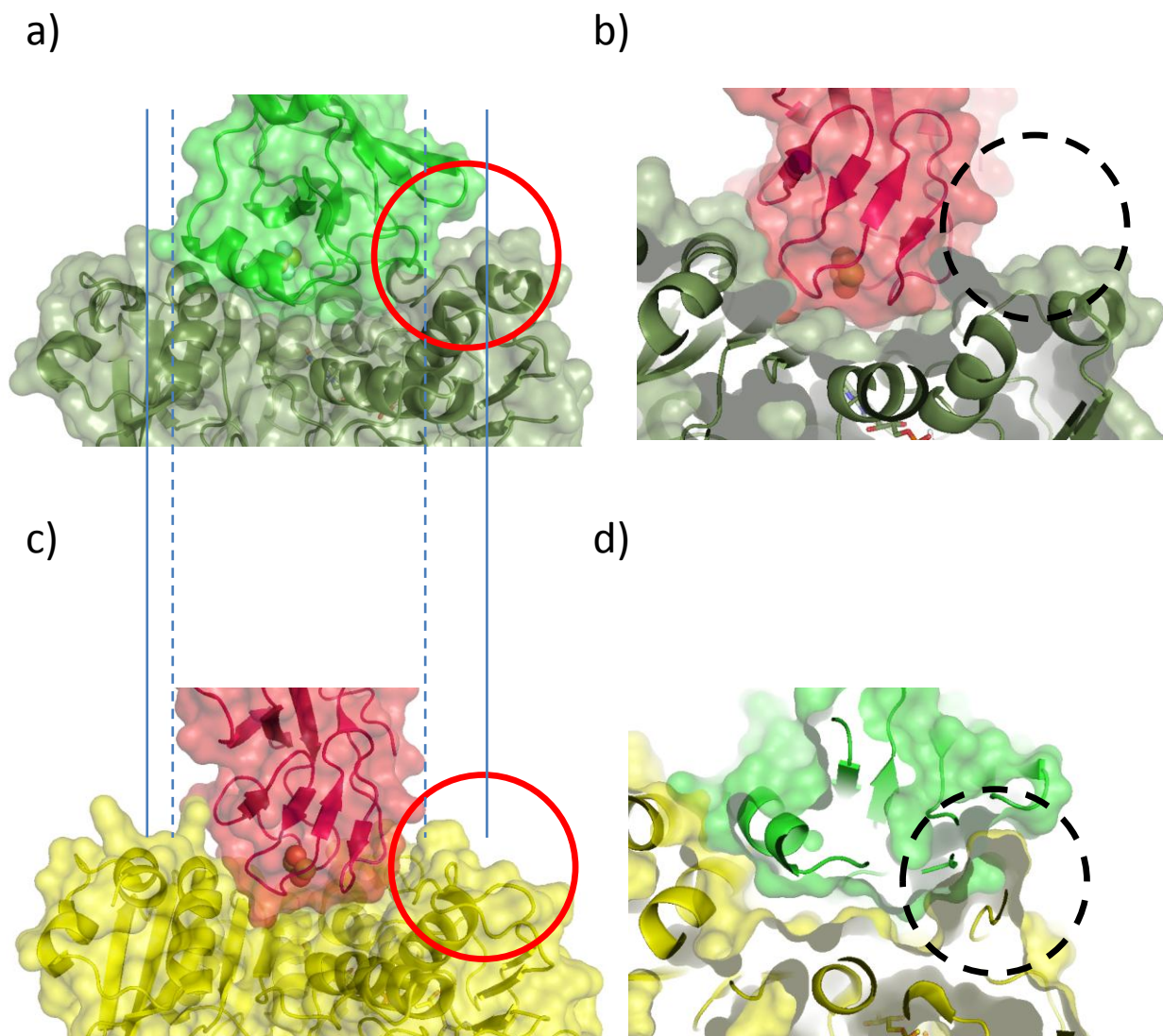


Figure 3-12. Fd_{IIA} : Red_{IIA} とBDO-R:BDO-R複合体の組み合わせを変えた場合の図

a) Fd_{IIA} , Red_{IIA} の本来の組み合わせ. Fd_{IIA} は緑, Red_{IIA} は深緑で示した.

b) BDO-F, Red_{IIA} の組み合わせ. BDO-Fは赤色, Red_{IIA} は深緑で示した. 隙間が生じている部分を破線で囲んだ.

c) BDO-F, BDO-Rの本来の組み合わせ. BDO-Fは赤色, BDO-Rは黄色で示した.

d) Fd_{IIA} , BDO-Rの組み合わせ. Fd_{IIA} は緑, BDO-Rは黄色で示した. 衝突している部分を破線で囲んだ.

a), c)において, 実線は Fd_{IIA} の相互作用領域の幅を示し, 破線はBDO-Fの相互作用領域の幅を示す. 赤丸で囲まれた領域がシフトしている領域を示す.

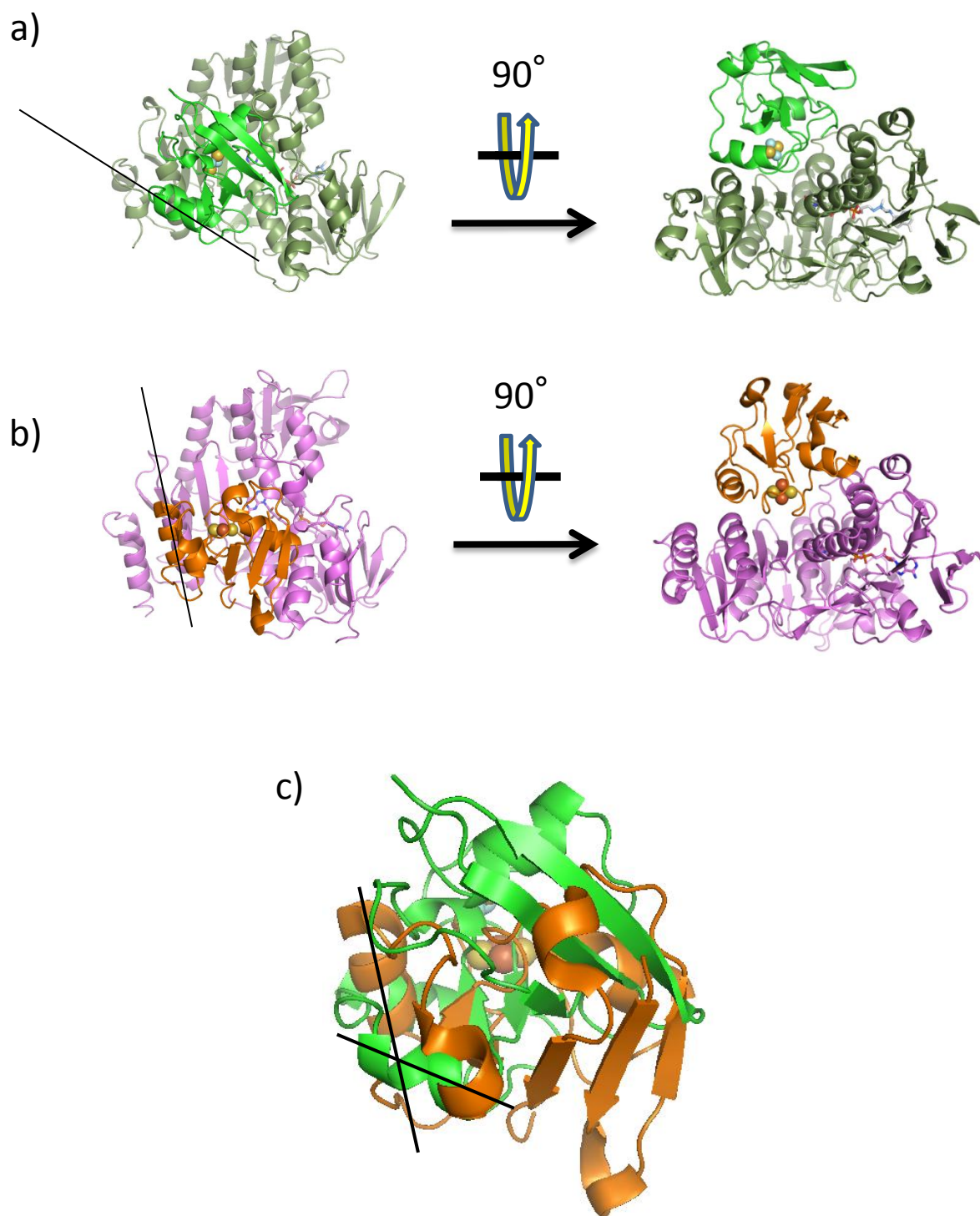


Figure 3-13. Fd_{IIA} : Red_{IIA} と Pdx : Pdr 複合体における Fd_{IIA} と Pdx の結合角度

- a) Fd_{IIA} : Red_{IIA} 複合体予測構造. Fd_{IIA} を緑, Red_{IIA} を深緑で示す. ヘリックス α_1 の軸の向きを直線で示した.
- b) Pdx : Pdr 複合体結晶構造. [Sevrioukova et al., 200]. Pdx を橙色, Pdr を紫色で示す. ヘリックス α_1 の軸の向きを直線で示した.
- c) Fd_{IIA} と Pdx の重ね合わせ. . 二つの直線から形成される角度はおおよそ 65° となった.

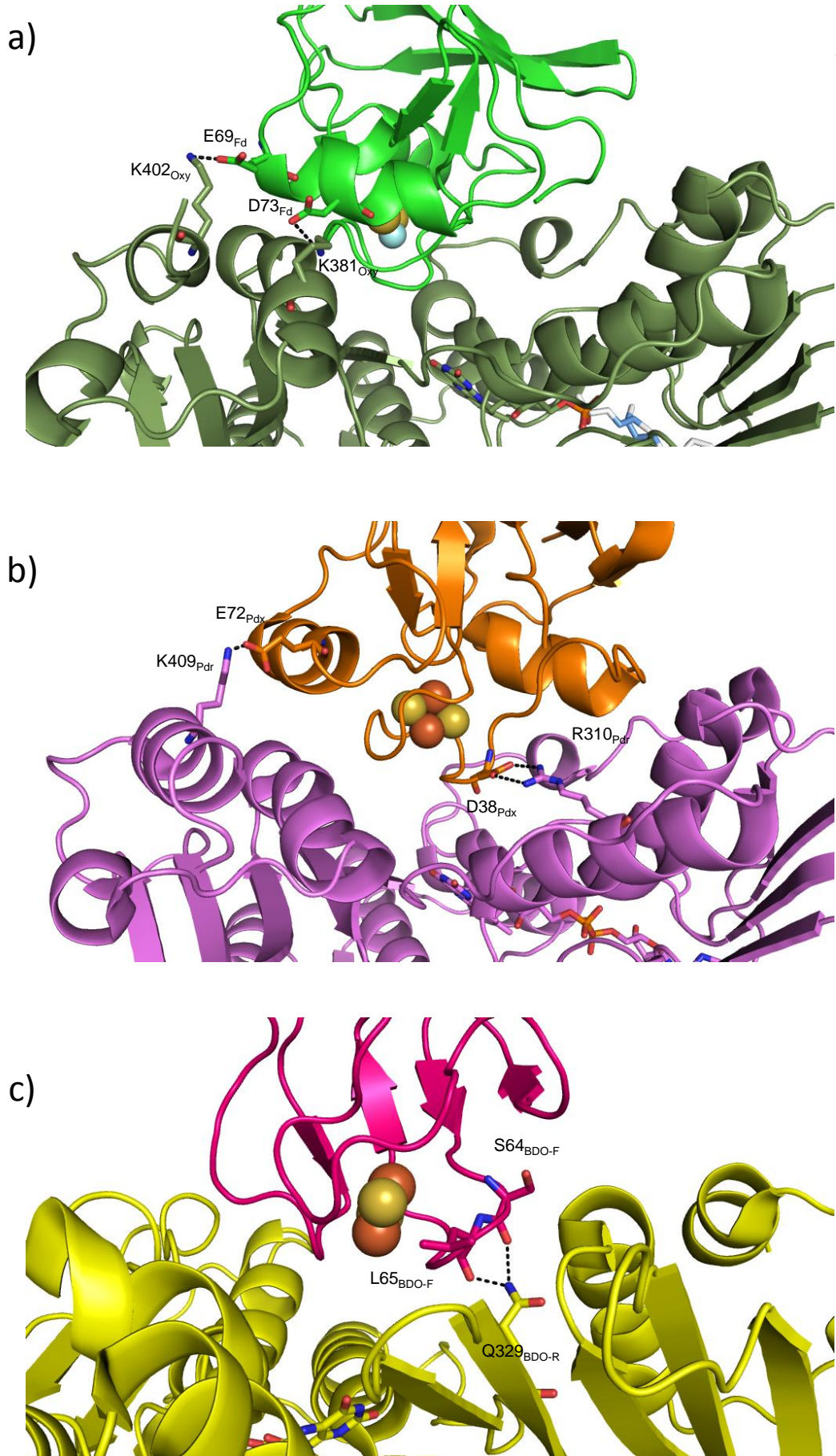


Figure 3-14. Fd_{IIA}:Red_{IIA}, Pdx:Pdr, BDO-F:BDO-R複合体における水素結合

a) Fd_{IIA}:Red_{IIA} 複合体予測構造. Fd_{IIA}を緑, Red_{IIA}を深緑で示す.

b). Pdx:Pdr複合体結晶構造. [Sevrioukova et al., 200]. Pdxを橙色, Pdrを紫色で示す.

c) BDO-F:BDO-R複合体結晶構造. [Senda et al., 2007]. BDO-Fを赤, BDO-Rを黄色で示す
水素結合は破線で示した. 水素結合を形成するアミノ酸残基はスティックで表示した.

無かった。しかし、回転が起こることで $\text{Lys381}_{\text{Red}}$ と D73_{Fd} の距離が 3.1 \AA となり水素結合を形成する可能性が示唆された。このように、Pdr の Arg310 に相当するアミノ酸が無い分の水素結合を補償するために回転が起こることが示唆された。先に述べた Red_{IIA} のヘリックスのシフトが起こっていた領域は、Pdr においてもシフトしており、 Fd_{IIA} と同様の嵩高さをもつ Pdr と相互作用するために Pdr でもシフトしていると考えられる。回転の有無に関わらず、 Red_{IIA} と Pdx、Pdr と Fd_{IIA} を重ね合わせた場合には Fd_{IIA} 、BDO-R 間や BDO-F、 Red_{IIA} 間で見られたようなコンポーネント間で大きな隙間が生じる、あるいは衝突を起こしているような様子は見られなかった (Fig. 3-15b, d)。

3-2-2-3. 単体構造の静電表面の比較.

Fig. 3-16 に Fd_{IIA} 、 Red_{IIA} 、BDO-F、BDO-R の相互作用領域の静電ポテンシャルを示す。BDO-R の相互作用領域の中心部の表面電荷は中性に近く、その周囲には塩基性度の高い部分が存在していた (Fig. 3-16 黄色い丸の部分)。これは Oxy の場合と同様である。また、BDO-F の相互作用領域の中心部もその周囲と比べて中性に近い表面電荷をしていたことから、相互作用領域の中心部では疎水性相互作用が主に働いていると考えられる。一方、相互作用領域の端にあたる部分では、Oxy:Fd 複合体の場合と比較して、BDO-R の塩基性度の高い部分と BDO-F の酸性度の高い部分が対をなしている様子はそれほど見られなかった。このことは複合体での BDO-F と BDO-R の間の水素結合の数にも現れており、その数は 2 本である ($\text{Leu650}_{\text{BDO-F}}$ と $\text{Gln329NE2}_{\text{BDO-R}}$ 、 $\text{Ser640}_{\text{BDO-F}}$ と $\text{Gln329NE2}_{\text{BDO-R}}$ 、Fig. 3-14c)。このことから、BDO-F:BDO-R 複合体の形成には静電相互作用はそれほど重要ではなく、疎水性相互作用が重要であると考えられる。 Red_{IIA} における推定相互作用領域も BDO-R と同様に、その電荷分布は、中心部は中性に近く、その周囲に塩基性度の高い領域が存在していた。 Fd_{IIA} は、興味深いことに Oxy_{IIA} との相互作用領域とは異なる部分で相互作用をしていた (Fig. 3-17)。この部分は Oxy_{IIA} との相互作用領域の時と比較して、中心部がより中性に近い静電ポテンシャルを示している領域であった。相互作用領域の端の部分も酸性度が低く、そのため、全体的に中性に近いような特徴を持っている。また、 Fd_{IIA} の特に酸性度の高い領域が Oxy_{IIA} の特に塩基性度の高い領域と対をなすことも無かった。

これらのことから ferredoxin と reductase の複合体形成には表面電荷の相補性、すなわち静電相互作用はそれほど重要ではなく、複合体形成には疎水性相互作用が主な駆動力となると考えられる。

静電相互作用が複合体形成に重要ではないということは、reductase の本来のカウンターパートではない、相互作用領域の電荷分布が異なる ferredoxin に対しても複合体を形成することが出来、電子伝達が可能であることを示唆している。実際、 Fd_{IIB} や Fd_{III} の相互作用領域の表面電荷は異なるにも関わらず、クラスを組み替えた場合に電子伝達が可能である。異なるクラスの reductase から電子の受領が可能なのは Fd_{IIB} と Fd_{III} であり、不可能なのは Fd_{IIA} である。前者は後者よりも相互作用領域の嵩が小さい。Red から見ると、広い相互作用

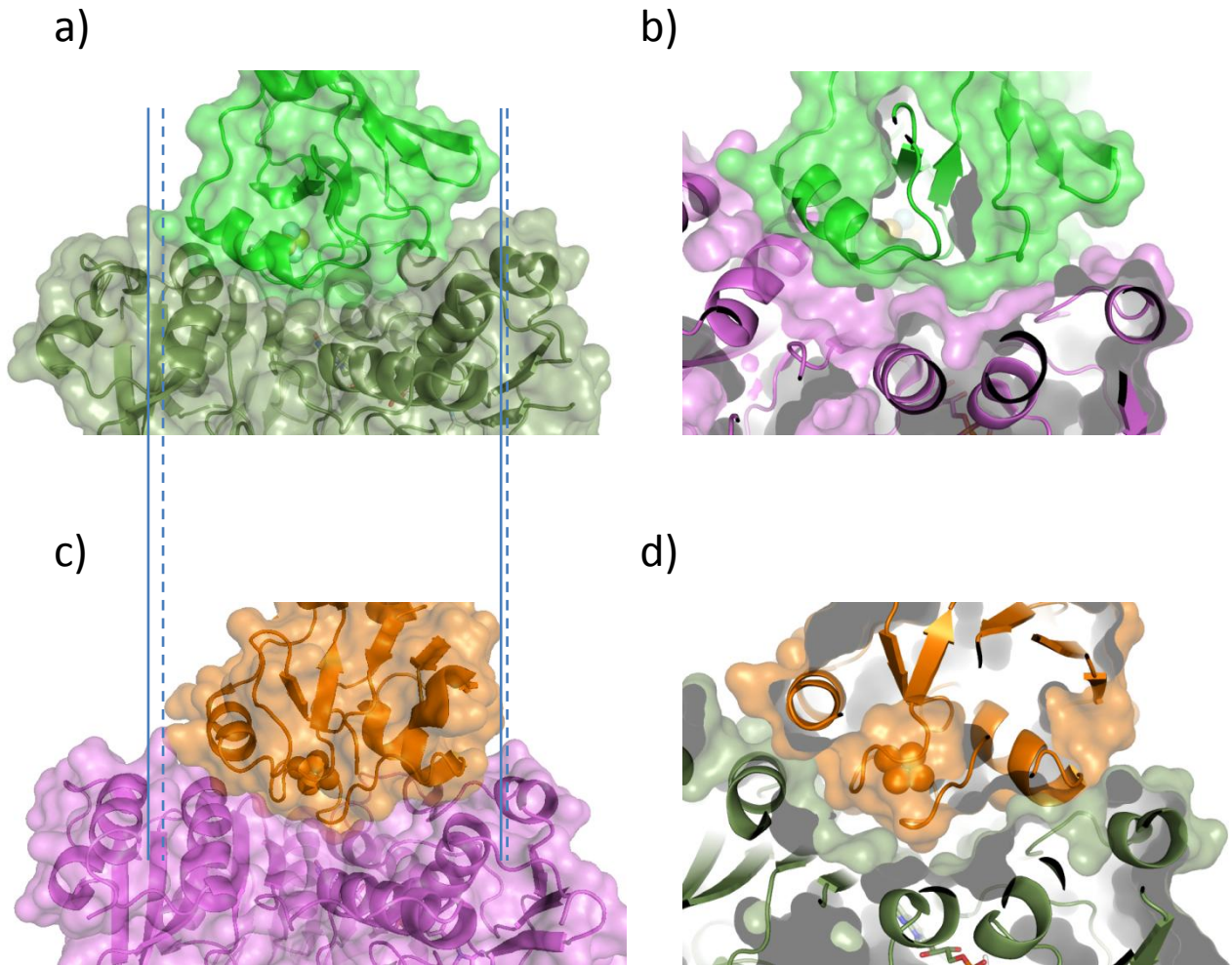


Figure 3-15. Fd_{IIA}:Red_{IIA}とPdx:Pdr複合体の組み合わせを変えた場合の図

a) Fd_{IIA}, Red_{IIA}の本来の組み合わせ. Fd_{IIA}は緑, Red_{IIA}は深緑で示した.

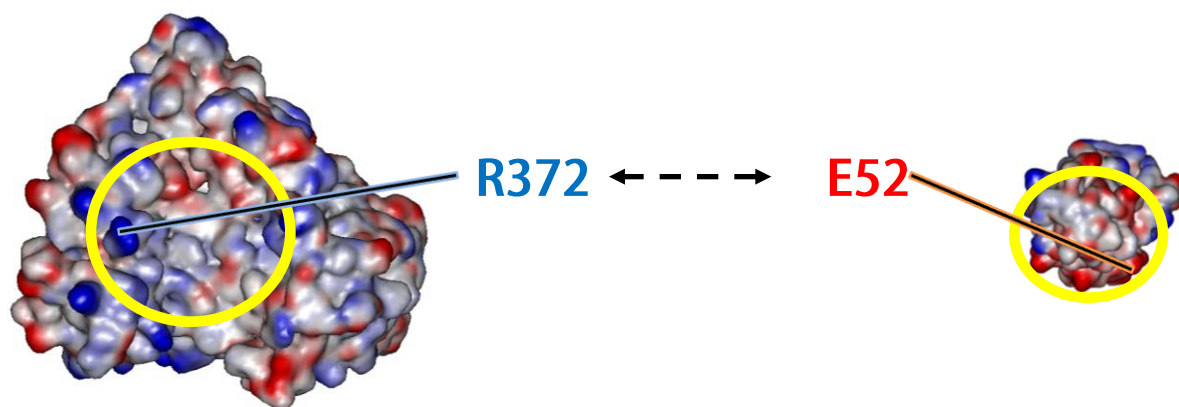
b) Red_{IIA}, Pdx組み合わせ. Pdxは橙色, Red_{IIA}は深緑で示した.

c) Pdr, Pdxの本来の組み合わせ. Pdxは橙色, Pdrは紫で示した.

d) Pdr, Fd_{IIA}の組み合わせ. Fd_{IIA}は緑, Pdrは紫で示した

a), c)において、実線はFd_{IIA}の相互作用領域の幅を示し、破線はPdxの相互作用領域の幅を示す

a)



b)

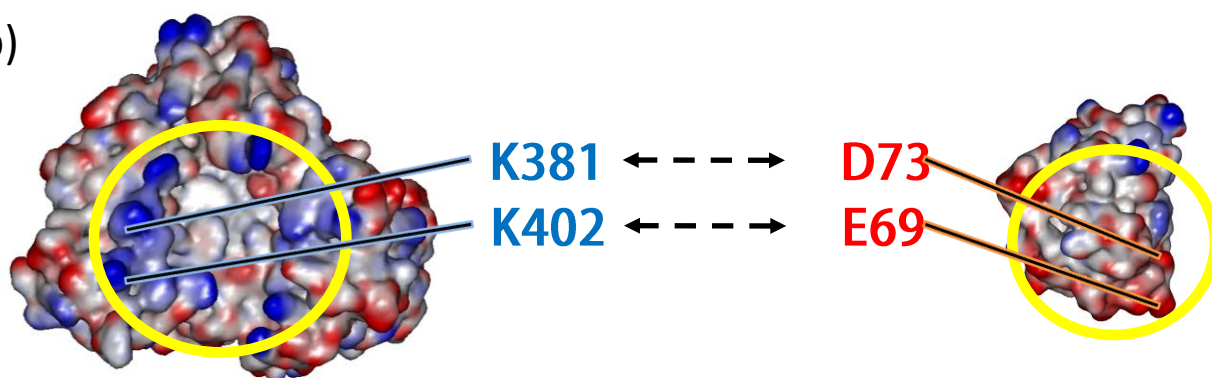


Figure 3-16. Fd_{IIA}, Red_{IIA}, BFO-F, BDO-Rの相互作用領域の静電ポテンシャルの比較

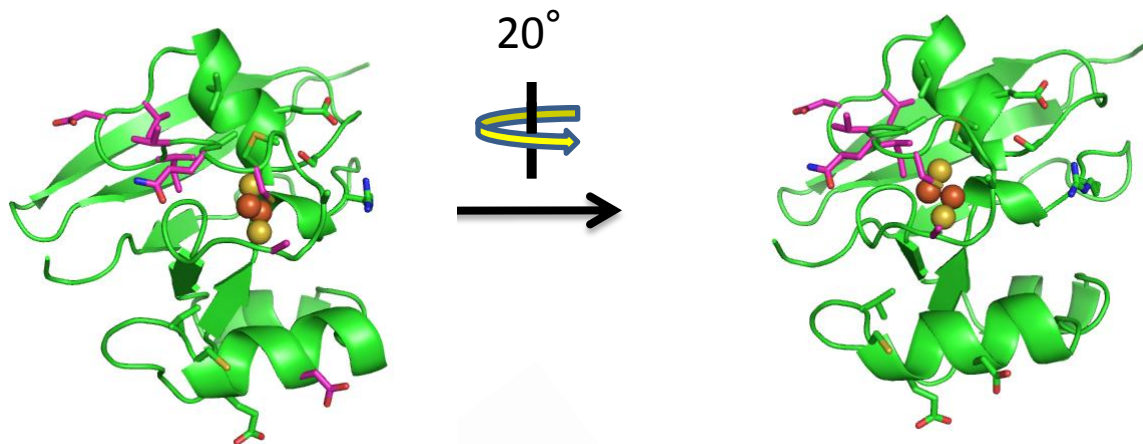
相互作用領域を真上から見た角度を示す。

a) BDO-R (左), BDO-F (右) [Senda et al., 2007].

b) Oxy_{IIA} (左), Fd_{IIA} (右).

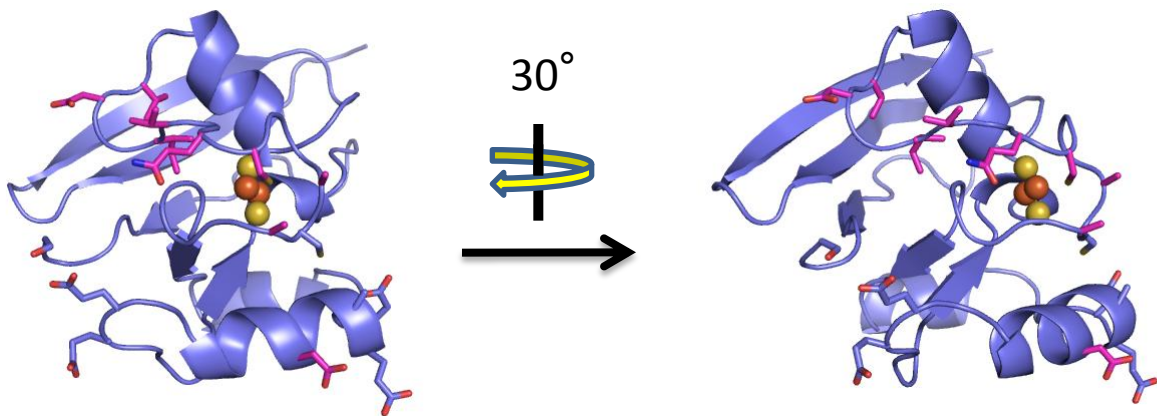
相互作用領域 (黄色丸)は, BDO-R:BDO-F複体の結晶構造から推測した. 黒い波線で谷折りをすると, 実際の結合様式と同じように相互作用領域が重なりあう. Ferredoxinは1.3倍に拡大して示した. アミノ酸残基の組み合わせ (破線矢印)は相互作用領域内で電荷が互いに相補しあう場所のアミノ酸残基を示す.

a)



相互作用領域の
静電表面

b)



相互作用領域の
静電表面

Figure 3-17. Fd_{IIIA} の相互作用領域の違い

a) Oxy_{IIA} との複合体を形成するときの相互作用領域. 下に相互作用領域の静電表面を示した.
 b) Red_{IIA} との複合体を形成するときの相互作用領域. 下に相互作用領域の静電表面を示した.
 相互作用を起こすアミノ酸残基として、カウンターパートから3.4 Å以内の距離に存在するものをスティックで表示した. 両者で共通している残基はピンクで示した. a), b)それぞれの左側の図は[2Fe-2S]クラスターを真上から見たアングルであり、右側の図は相互作用領域を真上から見たアングルを示す.

領域を持つ Red_{IIA} は全ての Fd に電子を渡す事が可能であり、狭い相互作用領域を持つ Red_{IIB} や Red_{III} は Fd_{IIA} だけでは電子を渡す事が出来ない。

相互作用領域の広さの違い、クラスを組み替えた場合の電子伝達の可否の結果から、 Fd と Red の電子伝達互換性に関して以下の事が推測される。 Fd と Red の電子伝達互換性のまとめとして、模式図を Fig. 3-18 に示す。クラスを組み替えた場合、狭い相互作用領域を持つ Red_{IIB} や Red_{III} に対して嵩高い Fd_{IIA} が近付くと、衝突により活性中心同士が、電子伝達が可能な距離まで近付くことが出来ないと考えられる。一方、広い相互作用領域を持つ Red_{IIA} に対して、嵩の小さい Fd_{IIB} や Fd_{III} は衝突が起こらずに、活性中心同士が電子伝達可能な距離まで近付けると推測される。しかし、衝突は起こらないが、 Red_{IIA} の α ヘリックスの後方へのシフトにより、 Fd を支えるような構造が無く相互作用領域の形状が一致しないために安定な複合体を形成することが出来ない。このため、電子伝達は起きるが、その効率は本来の組み合わせよりも低いと考えられる。

このように RO の電子伝達選択性は形状の一致と表面電荷の相補が重要であり、異なるクラスの組み合わせではこれらが満たされないために複合体を形成出来ず、電子が伝達されないと考えられる。一方、P450 において、oxygenase:ferredoxin 複合体の結晶構造が得られているのは P450_{scc}:Adx のみである [Struchkevich et al., 2011]。先に述べた様に P450_{scc}:Adx におけるアミノ酸側鎖同士の水素結合は2本であり、また Adx の双極子モーメントをアミノ酸置換の導入により変化させても電子伝達活性は変化しないことが明らかとなっている [Hannemann et al., 2009]。このことから、P450_{scc}:Adx は $\text{Oxy}_{\text{IIA}}:\text{Fd}_{\text{IIA}}$ と比べて表面電荷の相補の重要性が低いと考えられ、結合様式としては $\text{Fd}_{\text{IIA}}:\text{Red}_{\text{IIA}}$ のそれに近い。このため、CARDO における $\text{Oxy}:\text{Fd}$ の電子伝達選択性の構造的要因の基準を適用すると、P450 では由来が異なるものであっても複合体を形成すると考えられる。実際に、P450 では本来の電子伝達パートナーでないものからも電子を受け取る事が出来るものも存在する。例えば、*Rhodospseudomonas palustris* 由来の *p* 位置換安息香酸の酸化に関与する CYP199A2 は本来の電子伝達パートナーではない Pdx から、イェバエ由来の microsome に存在する殺虫剤などの xenobiotics の酸化に関与する CYP12A1 は Adx から電子を受け取り、基質の酸化反応を触媒することが出来る [Bell et al., 2010, Feyereisen, 1999]。また、P450_{cam} は Adx から酸素のヘム鉄への結合に必要な一つ目の電子を受け取ることは出来るが、水酸化反応のための二つ目の電子を受け取ることが出来ない [Tyson et al., 1972]。これは、Pdx は電子伝達を担うだけでなく、effector としての機能を持つためであるが [Lipscomb et al., 1972]、いずれにしても少なくとも一つの電子を受け取ることが出来るということは複合体を形成している事を示している。

3-2-3. CARDO コンポーネント間相互作用の親和力の測定

前述のように、CARDO コンポーネント間での電子伝達選択性は $\text{Oxy}:\text{Fd}$ 間では形状が一致していることと表面電荷が相補されることに、 $\text{Fd}:\text{Red}$ 間では形状が合うかどうかによって依存

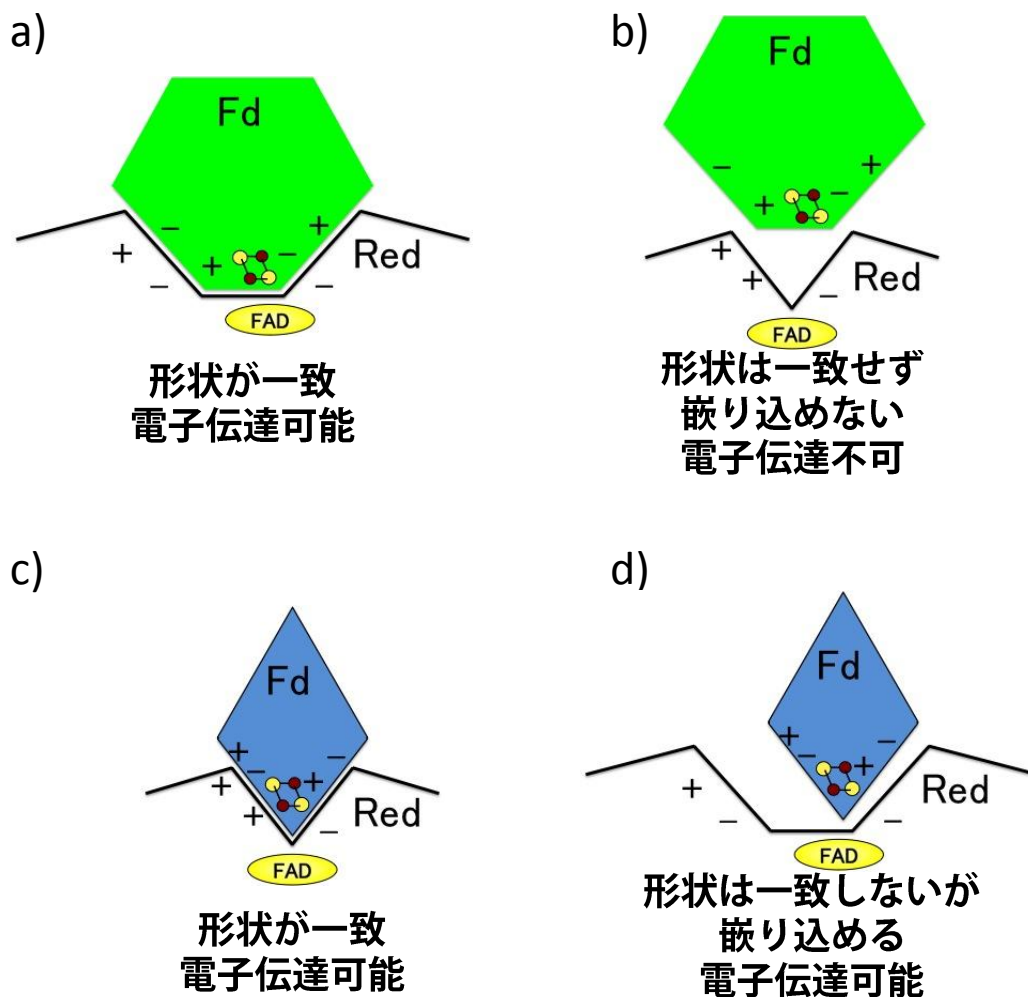


Figure 3-18. FdとRedの電子伝達互換性に関わる要因の模式図

- Fd_{IIA}とRed_{IIA}の本来の組み合わせ。電子伝達は可能である。表面電荷の相補性はあまり見られない。
- Fd_{IIA}とRed_{IIB/III}の組み合わせ。嵩高いFd_{IIA}は窪みの小さいRed_{IIB/III}と結合できず、電子伝達は不可能である。
- Fd_{IIB/III}とRed_{IIB/III}の本来の組み合わせ。電子伝達は可能である。
- Fd_{III}・Fd_{IIB}とRed_{IIA}の組み合わせ。嵩の小さいFd_{III}やFd_{IIB}は窪みの大きいRed_{IIA}と結合でき、電子伝達は可能である。

し、構造解析から、電子が渡らない組み合わせでは複合体形成が起こらないと予想した。しかし、これはあくまでも構造解析のみからの考察であり、実際に、電子が伝達されないと言う事が複合体を形成しないからであるという実験的証拠は得られていなかった。そこで、等温滴定型熱量計 (ITC : **I**sothermal **T**itration **C**alorimeter)を用いて CARDO コンポーネント間相互作用における親和力を測定することとした。

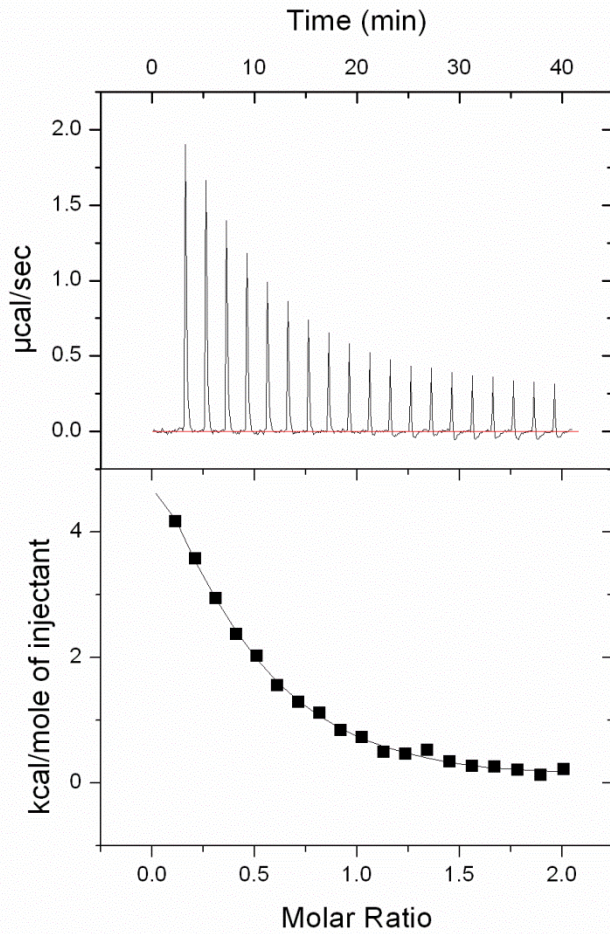
用いる緩衝液を 5 mM Tris (pH7.5)とした場合は、測定途中にタンパク質の非特異的な凝集が起こり、それに由来する熱量変化が観測されたため、タンパク質の安定性を向上する目的で 20 mM HEPES (pH7.5), 10% glycerol を緩衝液として用いた。なお、Tris は pH の温度依存性が高い。ITC は滴定に伴う温度変化を測定しており、この温度変化により緩衝液の pH が変化してしまうことが考えられ、pH が変化すると Tris 自身のプロトン化あるいは脱プロトン化の影響が出てしまう懸念があった。このため、より温度依存性の低い HEPES を緩衝剤として用いることとした。

3-2-3-1. Oxy-Fd の親和性

まず、Oxy-Fd 間での本来のカウンターパートの組み合わせでの測定を行った。結果を Fig.3-19 左 (Oxy_{IIA}-Fd_{IIA}), 3-20 左 (Oxy_{III}-Fd_{III}), 3-21 左 (Oxy_{IIB}-Fd_{IIB})に示す。その結果、Oxy_{IIA}-Fd_{IIA}, Oxy_{III}-Fd_{III} の組み合わせでは明確な熱量変化が観測されたが、Oxy_{IIB}-Fd_{IIB} の組み合わせでは明確な熱量変化が見られなかった。HEPES を用いた場合に熱量変化が観測されなかった点について、Oxy_{IIB} あるいは Fd_{IIB} の相互作用領域に HEPES が結合してしまったために複合体形成が阻害されてしまった可能性が考えられる。この事から、緩衝剤を HEPES から Tris に変更することとした。その理由は、Tris は両性イオンである HEPES とは異なり、第一級アミンであるため、仮に HEPES がどちらかのタンパク質と相互作用をしても Tris ではそれが抑えられると考えられる、及び、これまでの CARDO_{IIB} を用いた実験では Tris が使われており、CARDO_{IIB} の活性が充分みられていたからである。緩衝液の組成を 20 mM Tris (pH7.5), 10% glycerol, 0.2 M NaCl に変更した。Fig.3-19 右 (Oxy_{IIA}-Fd_{IIA}), 3-20 右 (Oxy_{III}-Fd_{III}), 3-21 右(Oxy_{IIB}-Fd_{IIB})に示す。Tris を用いた場合は Oxy_{IIB}-Fd_{IIB} の組み合わせにおいて、他のクラスの Oxy-Fd の組み合わせよりもかなり小さい熱量変化ではあったが、滴定が進むに伴い熱量変化の大きさが減少する結果が得られた。IIA 型, IIB 型, III 型の全てで吸熱反応が観測されており、コンポーネント間相互作用の駆動力は疎水性相互作用であることが明らかとなった。

上で述べた IIB 型における Tris バッファーを用いた測定において熱量変化がほとんど検出できなかった点については、吸熱反応と発熱反応の割合がほとんど等しいために全体としてほとんど熱量変化が見られなかったと考えられる。一般に、発熱反応は水素結合の形成や van der Waals 力による分子運動の自由度の減少であり、吸熱反応はその逆である。すなわち、吸熱反応が観測された IIA 型や III 型では、複合体形成により水分子が放出されたことによる吸熱が大きかったものと考えられる。一方で、熱量変化が小さかった IIB 型では

a)



b)

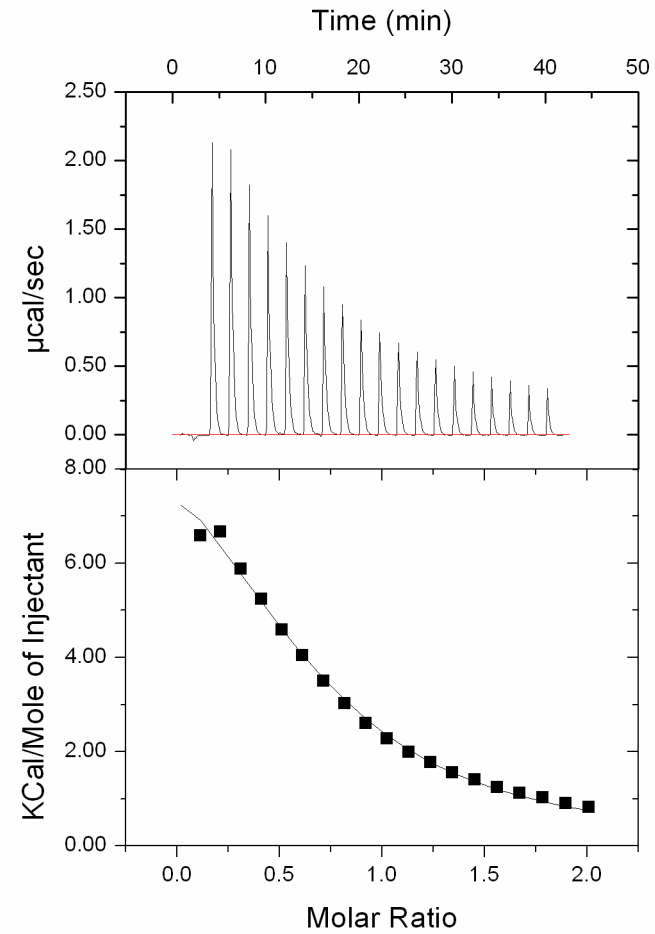


Fig. 3-19. Oxy_{IIA}-Fd_{IIA}のITC結果

a): 20 mM HEPES pH7.5、10% glycerol をbufferとして用いた場合の測定結果

b): 20 mM TRIS pH7.5、0.2 M NaCl、10% glycerol をbufferとして用いた場合の測定結果

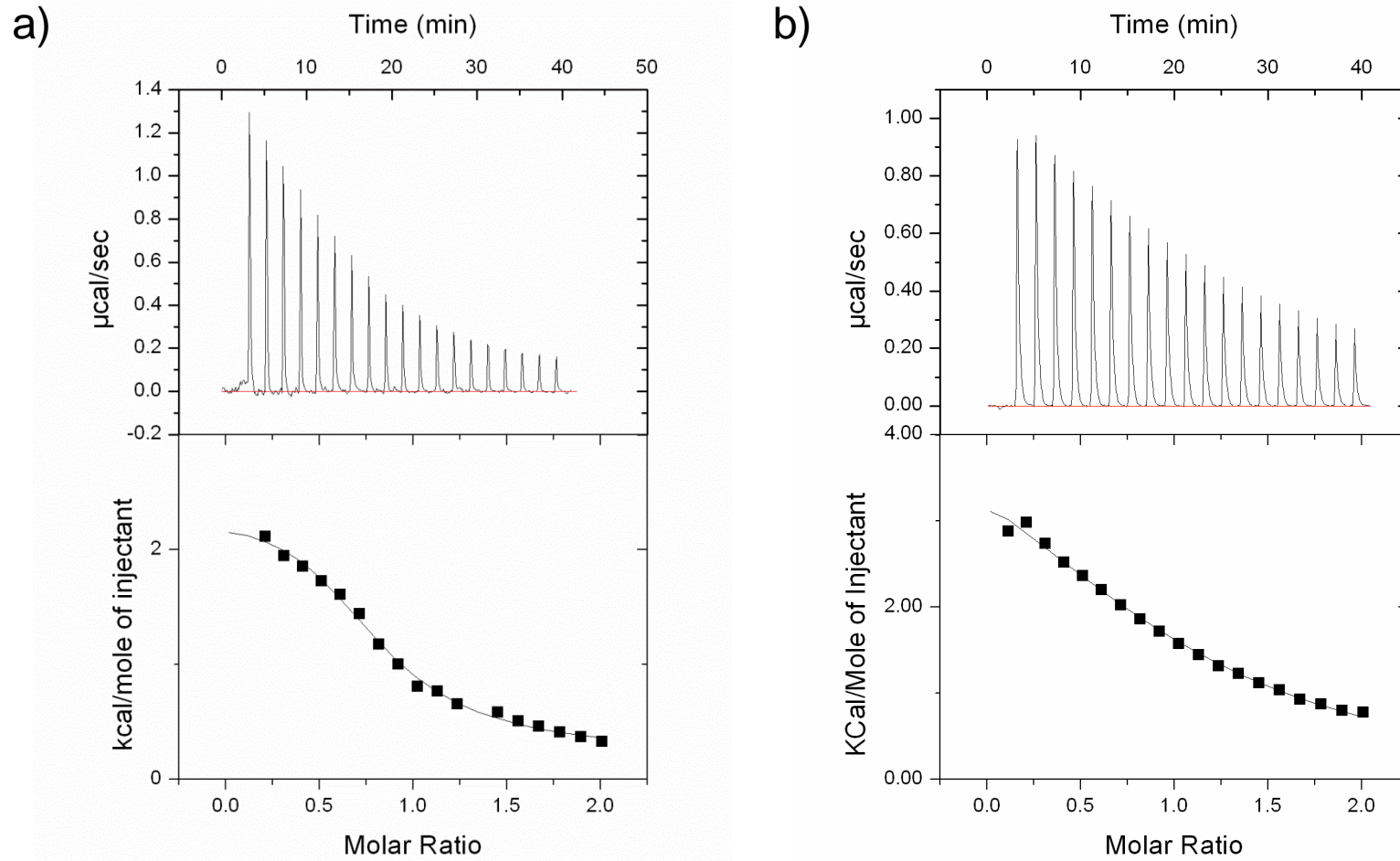
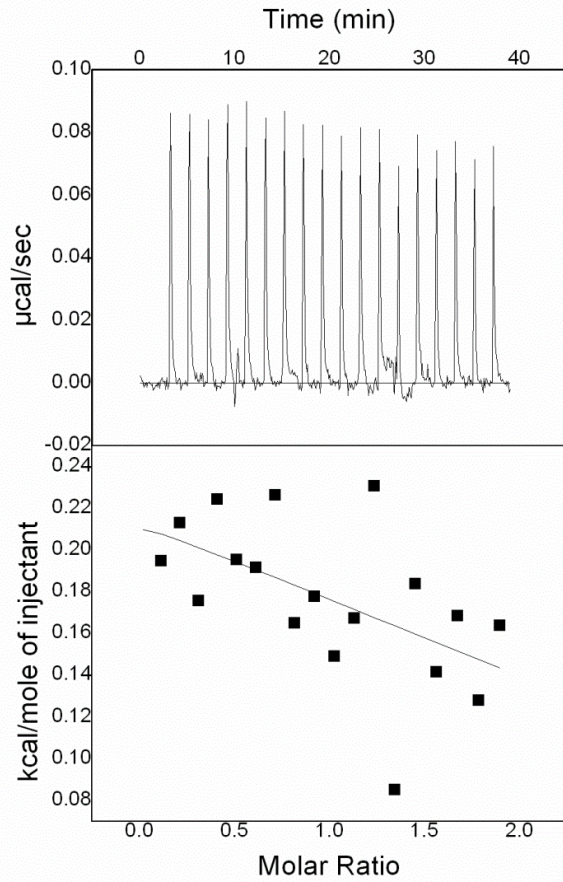


Fig. 3-20. Oxy_{III}-Fd_{III}のITC結果

a): 20 mM HEPES pH7.5、10% glycerol をbufferとして用いた場合の測定結果

b): 20 mM TRIS pH7.5、0.2 M NaCl、10% glycerol をbufferとして用いた場合の測定結果

a)



b)

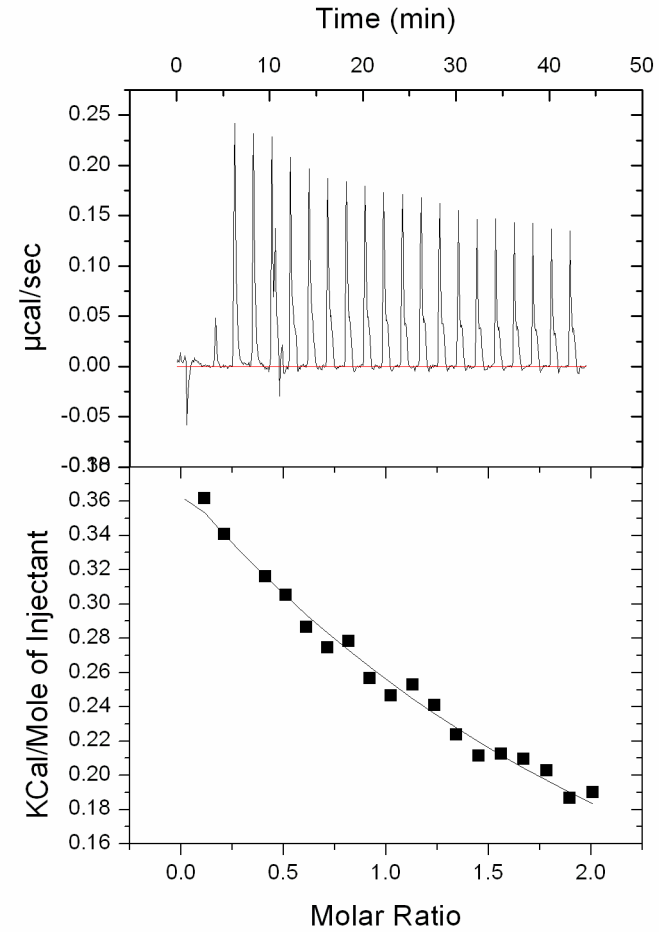


Fig. 3-21. $\text{Oxy}_{\text{IIB}}\text{-Fd}_{\text{IIB}}$ のITC結果

a): 20 mM HEPES pH7.5、10% glycerol をbufferとして用いた場合の測定結果

b): 20 mM TRIS pH7.5、0.2 M NaCl、10% glycerol をbufferとして用いた場合の測定結果

水分子の放出に加え、水素結合の形成などが起こったため、発熱量と吸熱量がほぼ等しくなったのではないかと考えられる。このことから、IIB型では極性アミノ酸同士での水素結合の形成などが、他のクラスのものと比較して、複合体形成により重要な役割を果たす可能性が考えられる。IIB型では相互作用領域の中心が僅かに帯電していた結果が得られたが、この領域においても水素結合などの形成が起きている可能性が考えられる。これら実験から算出した熱力学パラメータを Table 3-1 にまとめた。Oxy は trimer であり、Oxy の trimer 一分子に対して Fd は三分子結合することが出来る。このことから、Oxy が Fd に結合する時に三つの解離定数が得られる可能性が考えられた。すなわち、Oxy に Fd が結合していない時、一分子の Fd が結合している時、二分子の Fd が結合している時のそれぞれで解離定数が異なる可能性が考えられた。解離定数が二つ以上存在する場合、サーモグラムはシグモイドが重なったような形を示すが、Oxy-Fd の組み合わせではどの組み合わせでもそのような傾向は示さず、Oxy に対する Fd の結合する数に関わらず結合定数は変わらない、あるいは結合定数は変化するが、変化が小さすぎて現在の実験系では求めることが出来ない可能性が示唆された。このため、Oxy に結合する Fd の数が異なっても解離定数は変わらないという条件で解離定数などの熱力学定数を算出した。IIA型、IIB型、III型の組み合わせでの解離定数はそれぞれ、74.1 μM 、465 μM 、224 μM とかなり弱い親和力を持っていることが明らかとなった。結合比に関しては、IIB型では求めることが出来なかったものの、IIA型やIII型ではそれぞれ、0.7、1.0 という値になった。

一方、異なるクラスの組み合わせでは、全て滴定に伴う明確な熱量変化が観測されなかった (Fig. 3-22)。このことから、異なるクラスの組み合わせで電子が伝達されないということは、複合体を形成しなかったからであることが明らかとなった。

3-2-3-2. Fd-Red の親和性

次に、Fd-Red の同じクラスの組み合わせでの測定結果を Fig.3-23 に示す。全てのクラスにおいて、Oxy-Fd の時と同様に吸熱反応が観測された。このことから、Fd-Red も Oxy-Fd と同様に疎水性相互作用を駆動力として複合体を形成することが明らかとなった。熱力学パラメータを Table 3-2 に示す。IIA型、IIB型、III型の組み合わせでの解離定数はそれぞれ、53.6 μM 、125 μM 、296 μM と弱い親和性を示すことが明らかとなった。また、IIA型、IIB型、III型の組み合わせでの結合比はそれぞれ 0.968、1.05、0.678 であった。次に、異なるクラスの組み合わせでの結果を Fig. 3-24 に示す。Fd_{IIA} は特異的に他のクラスの Red から電子を受け取ることが出来ないが、Oxy-Fd の時と同様に、滴定に伴う熱量変化が観測されなかったために複合体を形成していないことが明らかとなった。一方、Fd_{III} や Fd_{IIB} は他のクラスの Red から電子を受け取ることが出来るため、コンポーネント間相互作用を起しているが、ITC で実際に結合を起していることが証明されたのは Fd_{IIB}-Red_{IIA} の組み合わせのみであった。熱力学定数を Table 3-3 に示した。解離定数は 516 μM であり、同じクラスでの組み合わせよりも親和性が低いという結果となった。

Table 3-1. 同じクラスの組み合わせのOxy-Fdでの相互作用の熱力学パラメータ

	Oxy _{III} - Fd _{III}	Oxy _{IIA} - Fd _{IIA}	Oxy _{IIB} - Fd _{IIB}
$K_d / (10^6 \text{ mol L}^{-1})$	224 ± 42.9	74.1 ± 36.9	465 ± 150
$\Delta H / (10^3 \text{ cal mol}^{-1})$	4.47 ± 0.262	10.8 ± 1.07	0.857 ± 0.379
$\Delta S / (\text{cal mol}^{-1} \text{ deg}^{-1})$	31.4 ± 1.10	53.6 ± 2.61	18.3 ± 0.967
n	1.10 ± 0.0163	0.70 ± 0.0432	N.D.

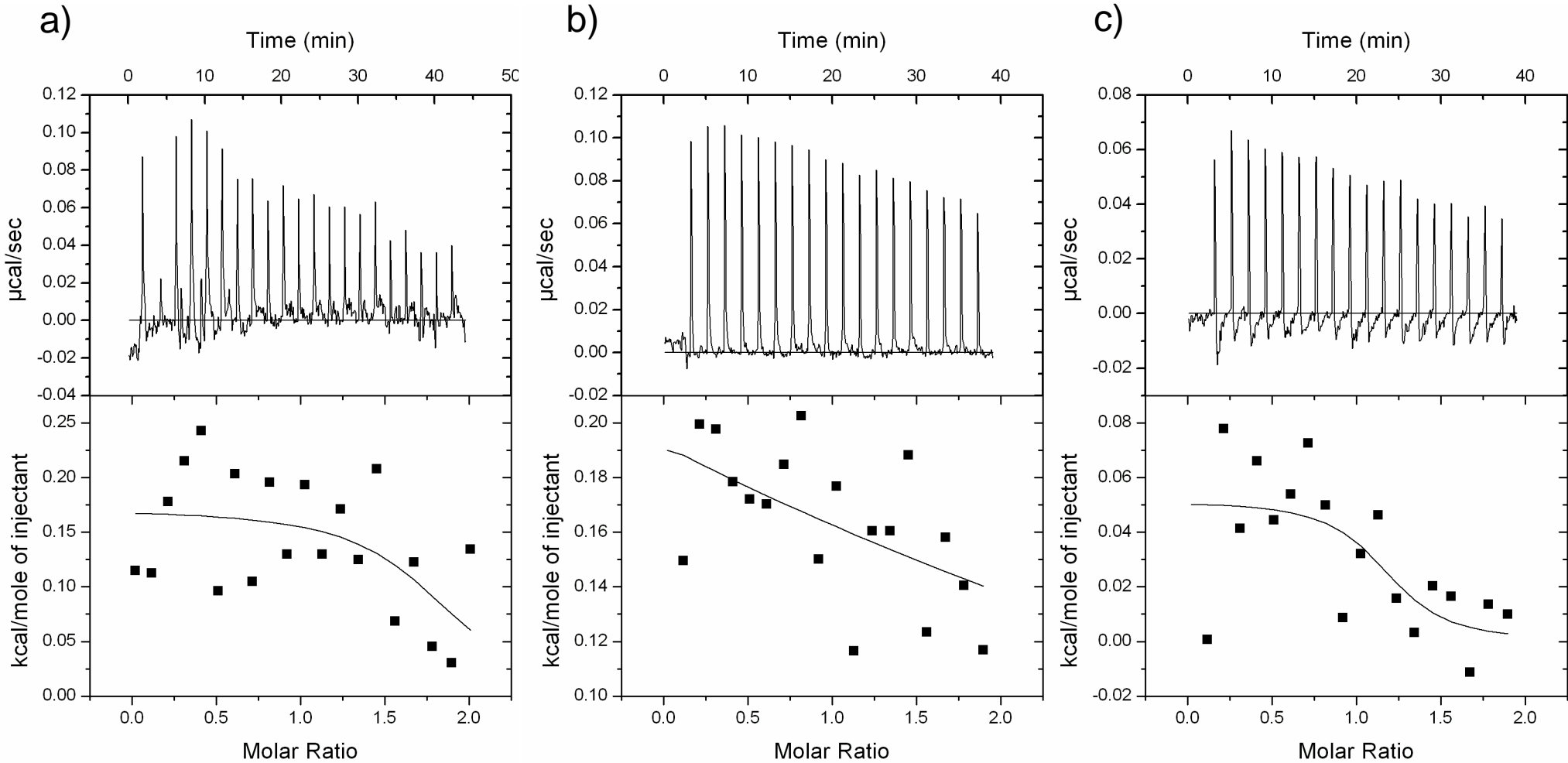


Fig. 3-22. 異なるクラスの組み合わせでのOxy-FdのITC結果①

20 mM TRIS pH7.5、0.2 M NaCl、10% glycerolをbufferとして用い、30°Cでの測定結果を示す

- a): Oxy_{IIA}-Fd_{IIB}
- b): Oxy_{IIA}-Fd_{III}
- c): Oxy_{IIB}-Fd_{IIA}

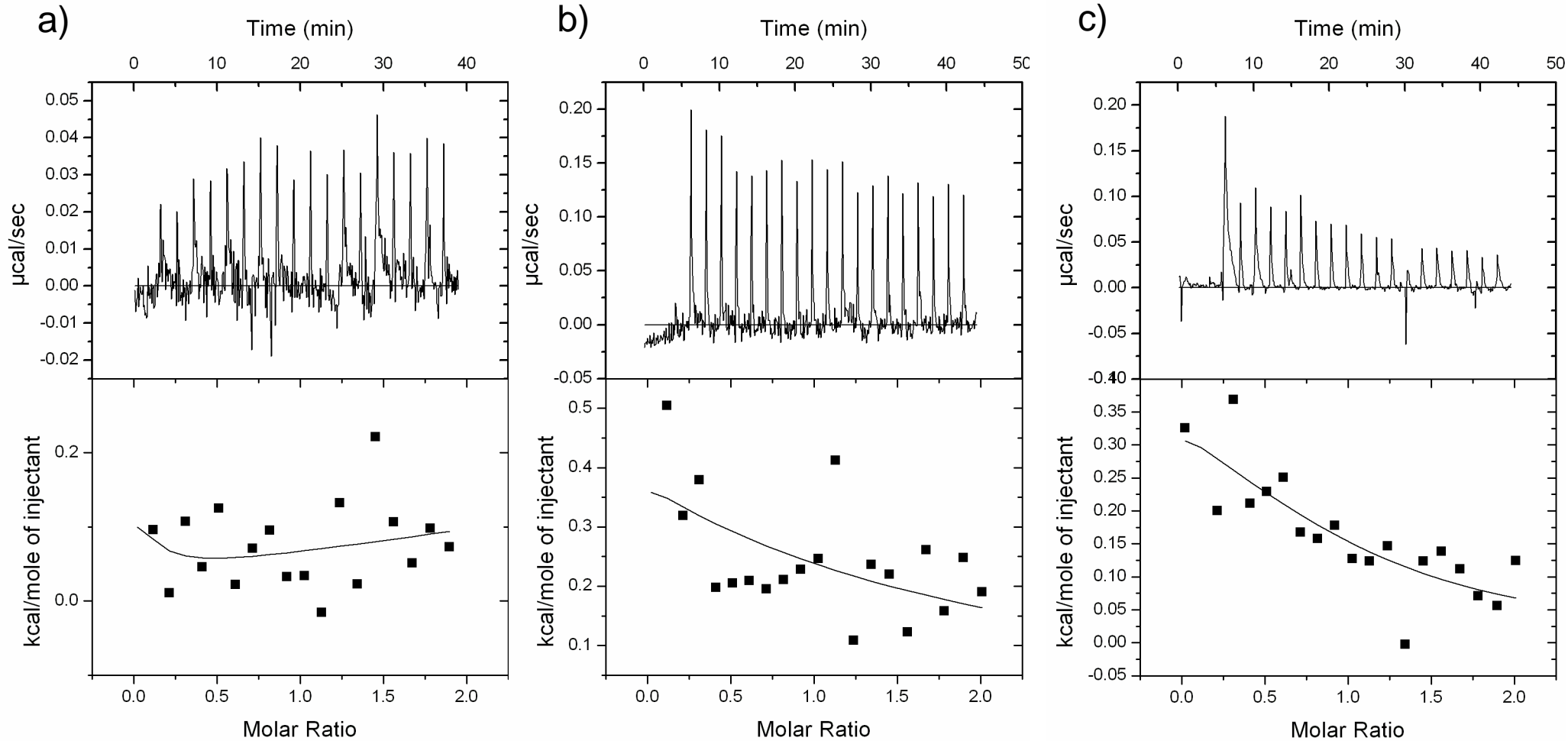


Fig. 3-22. 異なるクラスの組み合わせでのOxy-FdのITC結果②

20 mM TRIS pH7.5、0.2 M NaCl、10% glycerolをbufferとして用い、30°Cでの測定結果を示す

a): Oxy_{III}-F_d_{III}

b): Oxy_{III}-F_d_{IIA}

c): Oxy_{III}-F_d_{II-B}

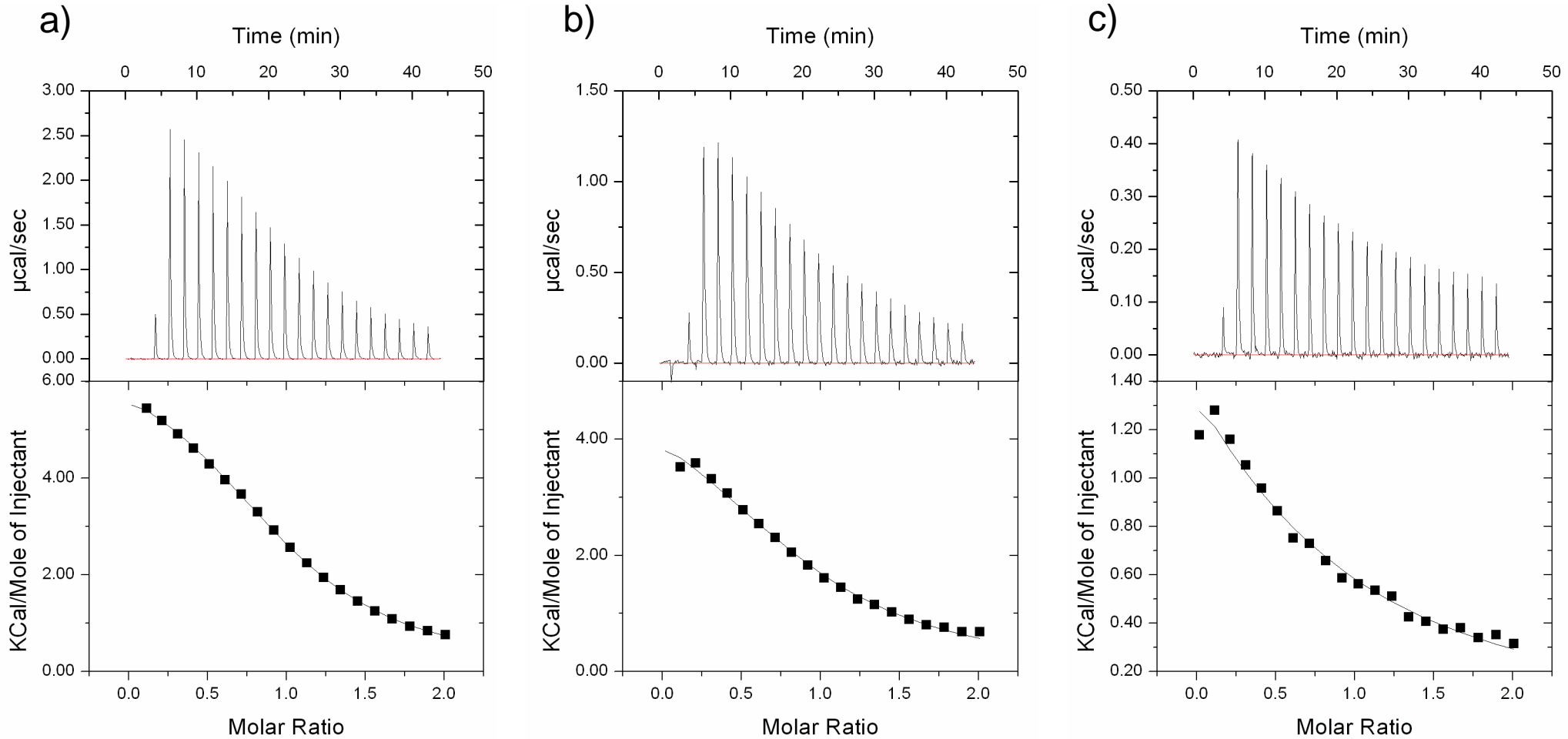


Fig. 3-23. 同じクラスの組み合わせでのFd-RedのITC結果

20 mM TRIS pH7.5, 0.2 M NaCl, 10% glycerolをbufferとして用い、30°Cでの測定結果を示す

a): IIA型の組み合わせ

b): IIB型の組み合わせ

c): III型の組み合わせ

Table 3-2. 同じクラスの組み合わせのFd-Redでの相互作用の熱力学パラメータ

	Fd _{III} - Red _{III}	Fd _{IIA} - Red _{IIA}	Fd _{IIB} - Red _{IIB}
$K_d / (10^6 \text{ mol L}^{-1})$	296 ± 135	53.6 ± 19.3	125 ± 23.6
$\Delta H / (10^3 \text{ cal mol}^{-1})$	3.17 ± 1.26	5.64 ± 1.70	4.87 ± 0.717
$\Delta S / (\text{cal mol}^{-1} \text{ deg}^{-1})$	26.4 ± 3.55	38.0 ± 4.96	33.9 ± 0.2.57
n	0.678 ± 0.0958	0.968 ± 0.0283	1.05 ± 0.148

**Table 3-3. Fd_{IIB}-Red_{IIA}の相互作用の熱力学
パラメータ**

	Fd _{IIB} - Red _{IIA}
$K_d / (10^6 \text{ mol L}^{-1})$	516 ± 240
$\Delta H / (10^3 \text{ cal mol}^{-1})$	2.92 ± 0.603
$\Delta S / (\text{cal mol}^{-1} \text{ deg}^{-1})$	24.5 ± 2.04
n	N. D.

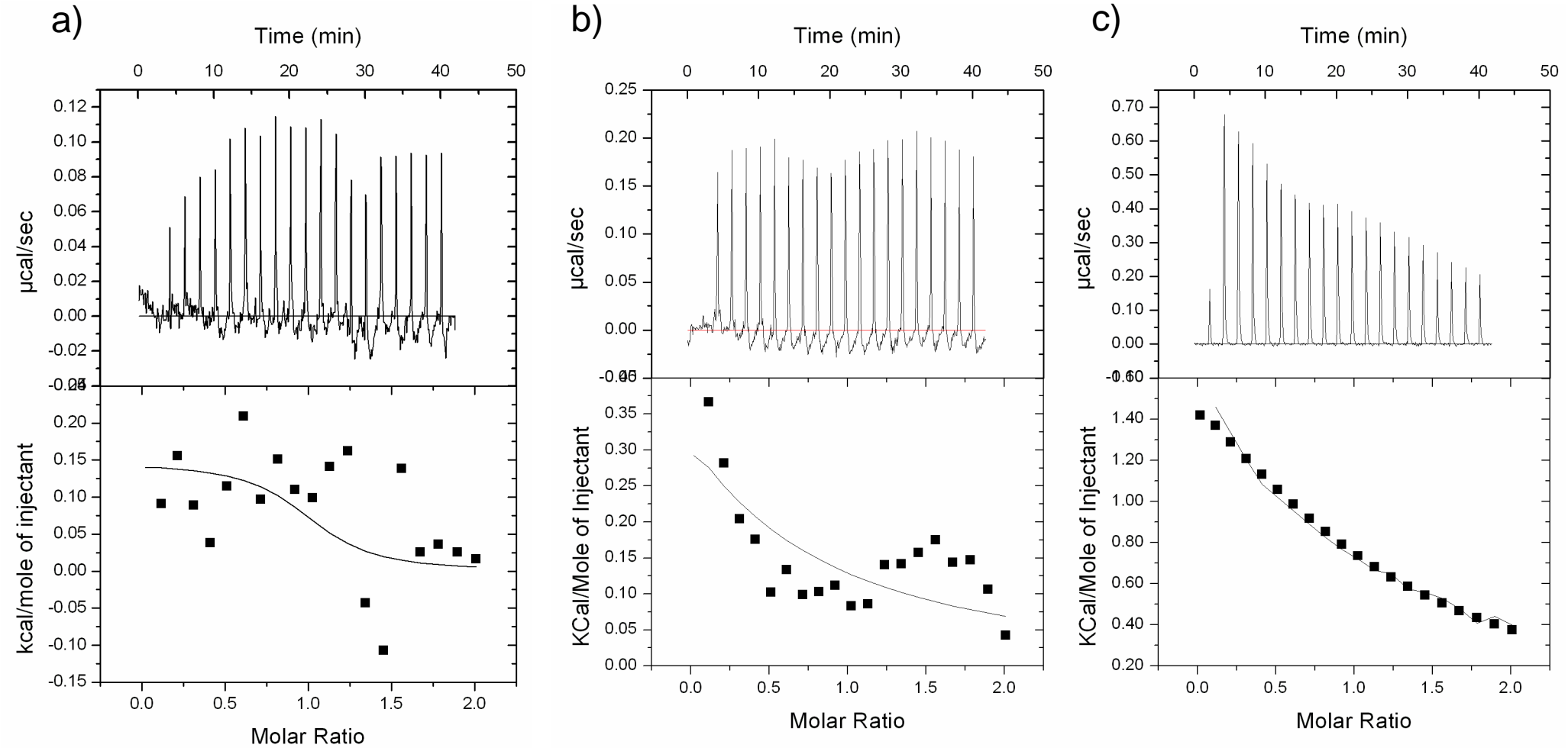


Fig. 3-24. 異なるクラスの組み合わせでのFd-RedのITC結果①

20 mM TRIS pH7.5、0.2 M NaCl、10% glycerolをbufferとして用い、30°Cでの測定結果を示す

- a): Fd_{IIA}-Red_{IIB}
- b): Fd_{IIA}-Red_{III}
- c): Fd_{IIB}-Red_{IIA}

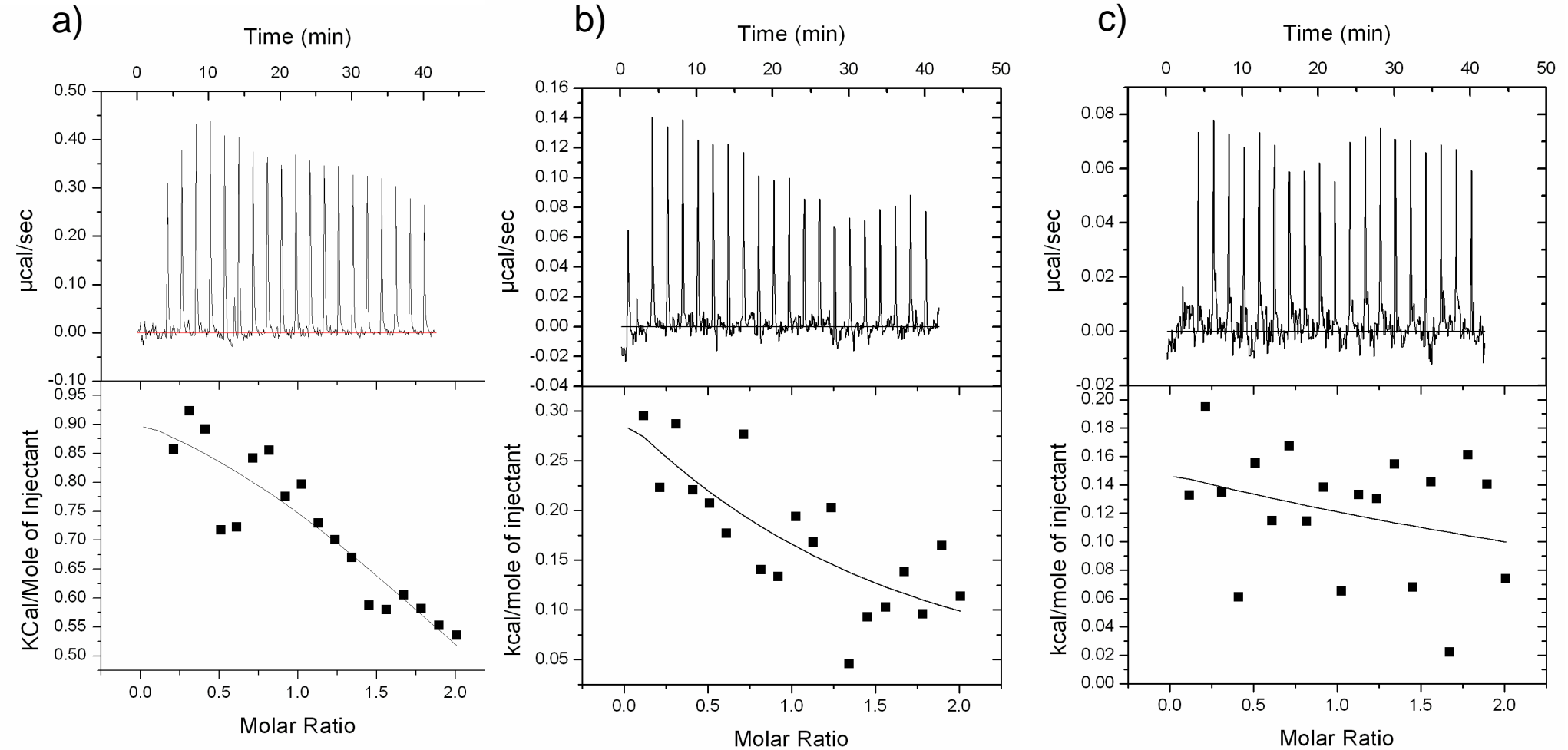


Fig. 3-24. 異なるクラスの組み合わせでのFd-RedのITC結果②

20 mM TRIS pH7.5、0.2 M NaCl、10% glycerolをbufferとして用い、30°Cでの測定結果を示す

- a): $\text{Fd}_{\text{IIB}}\text{-Red}_{\text{III}}$
- b): $\text{Fd}_{\text{III}}\text{-Red}_{\text{IIA}}$
- c): $\text{Fd}_{\text{III}}\text{-Red}_{\text{IIB}}$

その他の組み合わせでは熱量変化が十分に観測されず、ITC では複合体を形成しているか否かは判断できなかった。これは、解離定数が大きすぎるために ITC での検出が出来なかったためである可能性が高い。唯一解離定数が求められた Fd_{IIIB} - Red_{IIA} の組み合わせは、Fd が本来の電子伝達パートナーと同様のタイプの Red との組み合わせであったために相互作用が見られた可能性がある。しかし、 Fd_{IIIB} と Fd_{III} は一次配列の identity が 31%, similarity が 66% であり、その三次構造に大きな違いは見られない。それにも関わらず異なる挙動を示すという事は大変興味深く、この異なる挙動の要因となるアミノ酸残基を特定することが RO のみならず、電子伝達タンパク質間での相互認識機構を明らかにする上で重要となると考えられる。

3-2-3-3. 他の電子伝達複合体との解離定数の比較

P450cam-Pdx, P450scc-Adx では解離定数はそれぞれ $2.9 \mu\text{M}$ [Sligar et al., 1974], $1.1 \mu\text{M}$ [Ghisellini et al., 2005] であり、*Methylococcus capsulatus* 由来 methane monooxygenase における酸化酵素-reductase では解離定数が二つ存在するが、一つ目は $0.4 \mu\text{M}$ 、二つ目が $0.7 \mu\text{M}$ であり [Gassner et al., 1999], Oxy-Fd の解離定数はこれらと比べて約 70 から 1000 倍程度大きいことが明らかとなった。

これまでに明らかとされている他の ferredoxin と ferredoxin reductase の組み合わせでは、spinach 由来 ferredoxin-ferredoxin reductase の解離定数は $6.5 \mu\text{M}$ [Jalesarov et al., 1994], Pdx-Pdr では $5 \mu\text{M}$, Adx-Adr では $8.3 \mu\text{M}$, BDO-F-BDO-R の解離定数は $294 \mu\text{M}$ であり [Senda et al., 2007], Fd-Red の解離定数は spinach 由来 ferredoxin-ferredoxin reductase や Pdx-Pdr, Adx-Adr のそれより大きく、BDO-F-BDO-R のそれとほぼ同様の値を示すことが明らかとなった。先述の通り、Pdx:Pdr の結晶構造では、BphA3:BphA4 の結晶構造や Fd_{IIA} : Red_{IIA} の複合体予測構造よりも多くの水分子を介した水素結合やアミノ酸主鎖が関与した水素結合が存在する。この事から、Pdx:Pdr では疎水性相互作用に加え、水素結合が複合体形成に寄与するため、RO のものよりも高い親和性を持つと考えられる。この為、RO の ferredoxin-ferredoxin reductase の解離定数は Pdx-Pdr や Adx-Adr よりも 10 倍程度大きい値になると考えられる。

3-2-4. クラス IIA CARDO コンポーネントアミノ酸置換体の親和性の解析

当研究室において、 Oxy_{IIA} - Fd_{IIA} 予測構造の相互作用領域における組合せにおける、それぞれのアミノ酸の Ala 置換タンパク質を作製し、CAR 変換活性や電子伝達活性の比較を行う事で、これらのアミノ酸の複合体形成への寄与の検討が行われている [島倉, 未発表データ]。アミノ酸置換の対象としては、 Oxy_{IIA} : Fd_{IIA} 複合体構造予測により、相互作用領域内にて各タンパク質の電荷が相補される部分に存在するアミノ酸残基 (Oxy_{IIA} : Arg13, Arg16, Arg121, Glu213, Fd_{IIA} : Asp37, Asp73, Glu76, Arg92) であり (Fig. 3-3), それぞれ Ala に置換した。アミノ酸置換体は CD スペクトルや吸光スペクトルが野生型と変わらないということを確認しており、アミノ酸置換の導入による大きな構造の変化はないと考えられている。

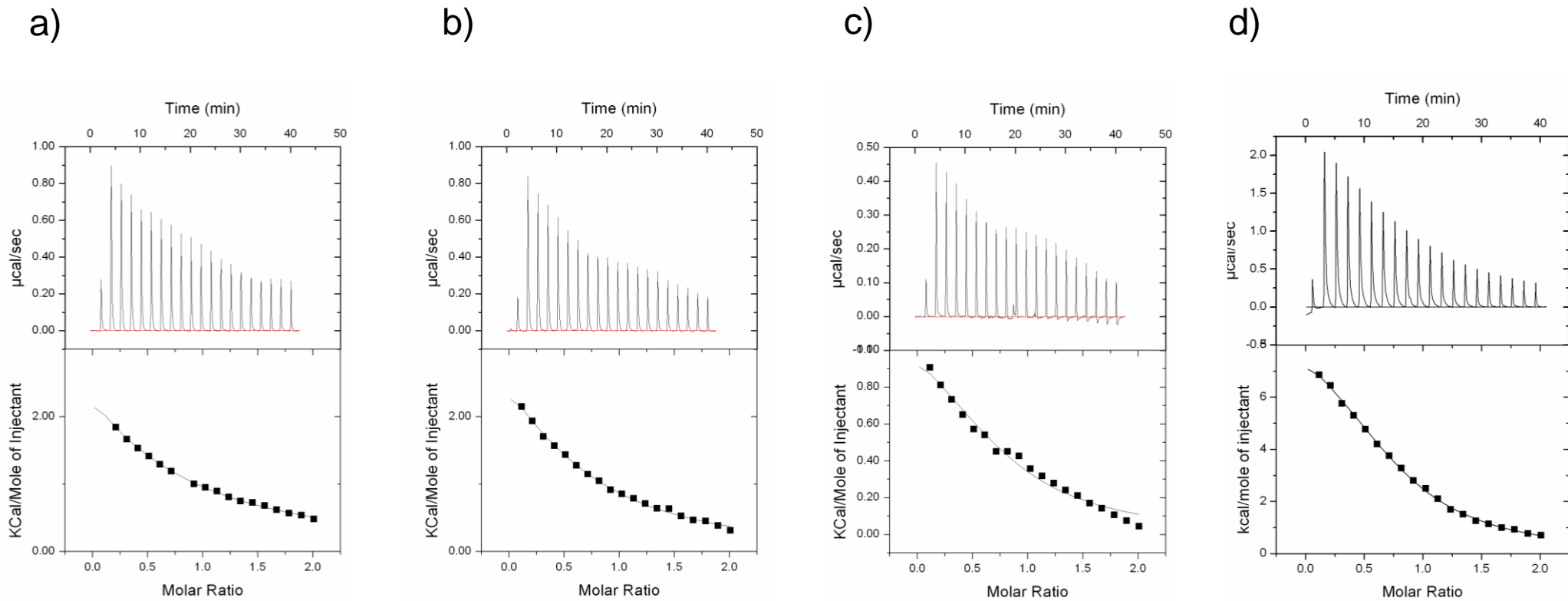


Fig. 3-25. Oxy_{IIA} アミノ酸置換体と Fd_{IIA} のITC結果

20 mM TRIS pH7.5、0.2 M NaCl、10% glycerolをbufferとして用い、 30°C での測定結果を示す

- a): $\text{Oxy}_{\text{R13A}}\text{-Fd}_{\text{IIA}}$
- b): $\text{Oxy}_{\text{R16A}}\text{-Fd}_{\text{IIA}}$
- c): $\text{Oxy}_{\text{R121A}}\text{-Fd}_{\text{IIA}}$
- c): $\text{Oxy}_{\text{E213A}}\text{-Fd}_{\text{IIA}}$

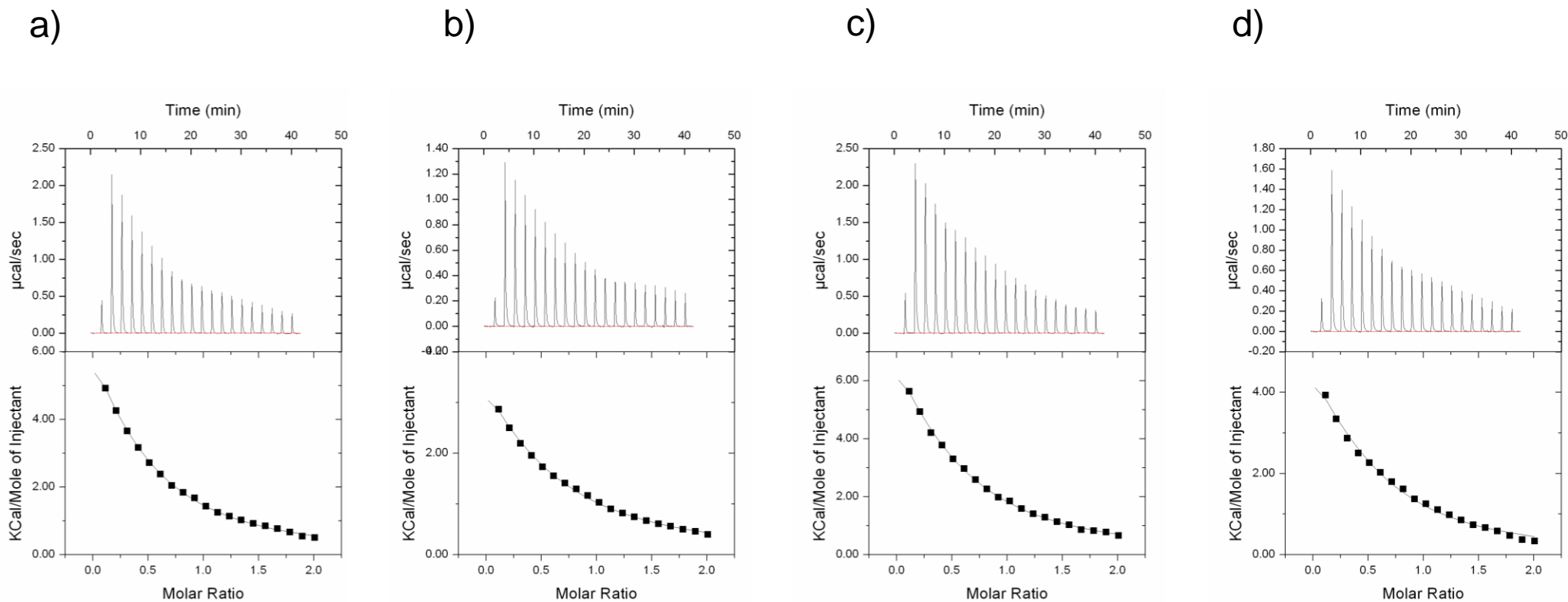


Fig. 3-26. Oxy_{IIA}とFd_{IIA}アミノ酸置換体のITC結果

20 mM TRIS pH7.5、0.2 M NaCl、10% glycerolをbufferとして用い、30°Cでの測定結果を示す

- a): Oxy_{IIA}-Fd_{D37A}
- b): Oxy_{IIA}-Fd_{D73A}
- c): Oxy_{IIA}-Fd_{E76A}
- d): Oxy_{IIA}-Fd_{R92A}

Table 3-4, 3-5 に示すようにこれらアミノ酸置換体の CAR 変換活性は Oxy_{R13A}, Oxy_{R16A}, Oxy_{R121A}, Oxy_{E213A}, Fd_{D37A}, Fd_{D73A}, Fd_{E76A}, Fd_{R92A} でそれぞれ 73.8%, 88.3%, 12.0%, 99.0%, 91.9%, 102%, 102%, 84.0% であり, 電子伝達活性はそれぞれ 87.9%, 92.7%, 30.0%, 78.2%, 77.4%, 132%, 100%, 86.7% であった. これらの活性は CARDO コンポーネント 3 種が存在する条件下で得られたものであるため, Oxy あるいは Fd 置換体の野生型カウンターパートと相互作用のみの親和性の評価をするため ITC 測定を行うこととした. 結果を Fig. 3-25, 3-26 熱力学パラメータを Table 3-4, 3-5 に示す. まず, Oxy アミノ酸置換体では, Oxy_{R121A} は CAR 変換活性や電子伝達活性が劇的に低下していたが, ITC 測定においても, 滴定に伴う熱量変化は野生型と比べて小さくなった. このことから, Oxy_{IIA} の Arg121 は複合体形成に重要な役割を担っていることが明らかとなった. この残基は相互作用領域の端に存在し, また, 突出している部分でもある (Fig. 3-3). この突出した部分は, Fd_{IIA} を支えるように固定するような役割を担っていると考えられ, Ala 置換により支えが無くなることで安定した複合体を形成できなくなった可能性がある. また Arg121 は三種の CARDO で保存されている (Fig. 3-27). Oxy_{III}:Fd_{III} 複合体結晶構造では Arg118 が塩橋を形成していることが明らかとなり, 更に, Arg118 は電子伝達の前後でその側鎖をフリップさせることにより, 電子伝達後の Oxy_{III}:Fd_{III} 複合体の解離を促す働きを持つ可能性が示唆されている (Fig. 3-28) [相川, 2010]. この働きは全てのクラスの CARDO で共通している可能性があり, Oxy_{IIA} の Arg121 は複合体の形成と解離を制御する主なアミノ酸残基であると考えられる. Oxy_{R13A}, Oxy_{R16A} について, R13A, R16A は両者が近傍に位置する残基であるが, それぞれの機能は多少異なる可能性が示唆された. Oxy_{R13A}, Oxy_{R16A} の CAR 変換活性は野生型と比べてそれぞれ 73.8%, 88.3%, 電子伝達活性は 87.9%, 92.7% であり, ITC により求められて解離定数はそれぞれ 576 μ M, 136 μ M であった. Oxy_{R13A} の方が Oxy_{R16A} よりも活性が多少低く, かつ解離定数も大きい, これは Oxy_{IIA} の Arg13 が Fd_{IIA} と水素結合あるいは塩橋を形成するからであると考えられる. なぜなら, エンタルピー変化が野生型よりも大きくなっているからである. 先述したように, 水素結合の形成は負のエンタルピー変化に寄与する. Oxy_{R13A} では, 本来 Arg13 が形成していた水素結合が無くなった分, 全体としてエンタルピー変化がより正に変化していると考えられる. 一方, Oxy_{R16A} では野生型と同程度のエンタルピー変化を示したため, Oxy_{IIA} の Arg16 は水素結合を形成していない可能性が示唆された. Oxy_{E213A} は野生型と比べて CAR 変換活性が 99%, 電子伝達活性は 78.2%, 熱力学パラメータは野生型とほとんど同じ値を示した. このことから, Oxy_{IIA} の Glu213 は Fd_{IIA} と水素結合を形成しない可能性が示唆された. Fd_{IIA} のアミノ酸置換体では, Fd_{R92A} は野生型と比較して CAR 変換活性が 84.0%, 電子伝達活性が 86.7%, 熱力学パラメータはほぼ変わらないという結果が得られた. 複合体予測構造において Fd_{IIA} の Arg92 は Oxy_{IIA} の Glu213 とペアになっている残基であり, Oxy_{E213A} においてもその活性が野生型とほぼ変わらないということと同様の傾向を示した. Fd_{D37A}, Fd_{D73A}, Fd_{E76A} は熱力学パラメータの結果はほぼ同様の結果を示しており, 解離定数がそれぞれ 193 μ M, 276 μ M, 168 μ M であり, CAR 変換活性は 91.9%, 102%, 102%, 電子

Table 3-4. Oxy_{IIA} アミノ酸置換体と野生型Fd_{IIA}の相互作用の熱力学パラメータ

	Oxy _{R13A} - Fd	Oxy _{R16A} - Fd	Oxy _{R121A} - Fd	Oxy _{E213A} - Fd
$K_d / (10^6 \text{ mol L}^{-1})$	576 ± 24.6	136 ± 41.2	101 ± 8.97	94.9 ± 14.3
$\Delta H / (10^3 \text{ cal mol}^{-1})$	21.4 ± 1.12	4.65 ± 0.891	1.36 ± 0.117	8.04 ± 1.24
$\Delta S / (\text{cal mol}^{-1} \text{ deg}^{-1})$	85.4 ± 3.71	32.4 ± 2.49	22.8 ± 0.36	44.9 ± 4.34
n	0.215 ± 0.0120	0.591 ± 0.0307	1.04 ± 0.250	0.700 ± 0.0770
CAR変換活性 (%)	73.8 ± 1.16	88.3 ± 2.02	12.0 ± 3.25	99.0 ± 3.65
電子伝達活性 (%)	87.9 ± 6.58	92.7 ± 0.595	30.0 ± 6.72	78.2 ± 4.60

Table 3-5. 野生型Oxy_{IIA}とFd_{IIA}アミノ酸置換体の相互作用の熱力学パラメータ

	Oxy-Fd _{D37A}	Oxy-Fd _{D73A}	Oxy-Fd _{E76A}	Oxy-Fd _{R92A}
$K_d / (10^6 \text{ mol L}^{-1})$	193 ± 23.5	276 ± 23.5	168 ± 44.1	146 ± 38.6
$\Delta H / (10^3 \text{ cal mol}^{-1})$	16.5 ± 1.16	19.1 ± 12.2	17.3 ± 1.57	9.41 ± 0.306
$\Delta S / (\text{cal mol}^{-1} \text{ deg}^{-1})$	71.4 ± 3.66	79.2 ± 40.1	74.3 ± 5.68	46.2 ± 3.03
n	0.329 ± 0.0354	0.372 ± 0.196	0.416 ± 0.0217	0.470 ± 0.0186
CAR変換活性 (%)	91.9 ± 5.40	102 ± 1.26	102 ± 0.786	84.0 ± 10.2
電子伝達活性 (%)	77.4 ± 8.67	132 ± 20.2	100 ± 21.7	86.7 ± 18.8
	Fd _{D37A}	Fd _{D73A}	Fd _{E76A}	Fd _{R92A}
Redとの電子伝達活性 (%)	99.5 ± 21.2	132 ± 10.6	130 ± 12.8	78.5 ± 13.6

伝達活性は 77.4%, 132%, 100% であった。複合体予測構造において Fd の Asp37 は Oxy の Arg121 とペアを組む残基であり, Oxy_{R121A} がその活性を大きく減少したのに対し, Fd_{D37A} はそれほど活性を減少させなかった。しかし, 先に述べた様な, 水素結合を形成しないことに起因すると考えられるエンタルピー変化の上昇がみられている。このことから, Fd_{IIA} の表面構造よりも Oxy_{IIA} のそれの方が複合体形成に重要であると考えられる。すなわち, 水素結合を形成すると言うよりも, Arg121 の比較的大きな側鎖により, Fd_{IIA} を爪留のように支えるような役割を担っていると考えられる。

Fd_{D73A}, Fd_{E76A} は CAR 変換活性と電子伝達活性は野生型とほぼ同じかあるいは野生型よりも高い結果を示した。これは, Fd_{IIA} の Asp37 が, Fd_{IIA} の Red_{IIA} との相互作用領域に含まれ, 置換により Red_{IIA} との電子伝達がより早くなったためであると考えられる。実際, Red_{IIA} と Fd_{D37A}, Fd_{E76A} の電子伝達速度は野生型のそれよりもほぼ同じか高い結果であった。しかし, ITC の結果では, エンタルピー変化が上昇していたことから, 水素結合を形成されなくなったことが示唆される。Fd_{IIA} の Glu76 は Oxy_{IIA} の Arg13 と, Fd_{IIA} の Asp73 は Oxy_{IIA} の Arg16 とペアとなっている事が示唆されていたが, Fd_{E76A} と Oxy_{R13A} の ITC の結果は同様であり, 生化学実験においてもペアとなっている事が示唆されるが, Fd_{D73A} と Oxy_{R16A} の結果では, Oxy_{R16A} は水素結合を維持しているのに対し, Fd_{E73A} は水素結合が形成されなくなった事が示唆される。この組み合わせは水素結合を形成する組み合わせではない可能性が考えられた。しかし, Oxy_{IIA} は Arg14 を持っており, これが Arg13 の近傍に位置するため, 実際は Fd_{IIA} の Glu73 は Oxy_{IIA} の Arg14 と水素結合を形成している可能性が考えられた。

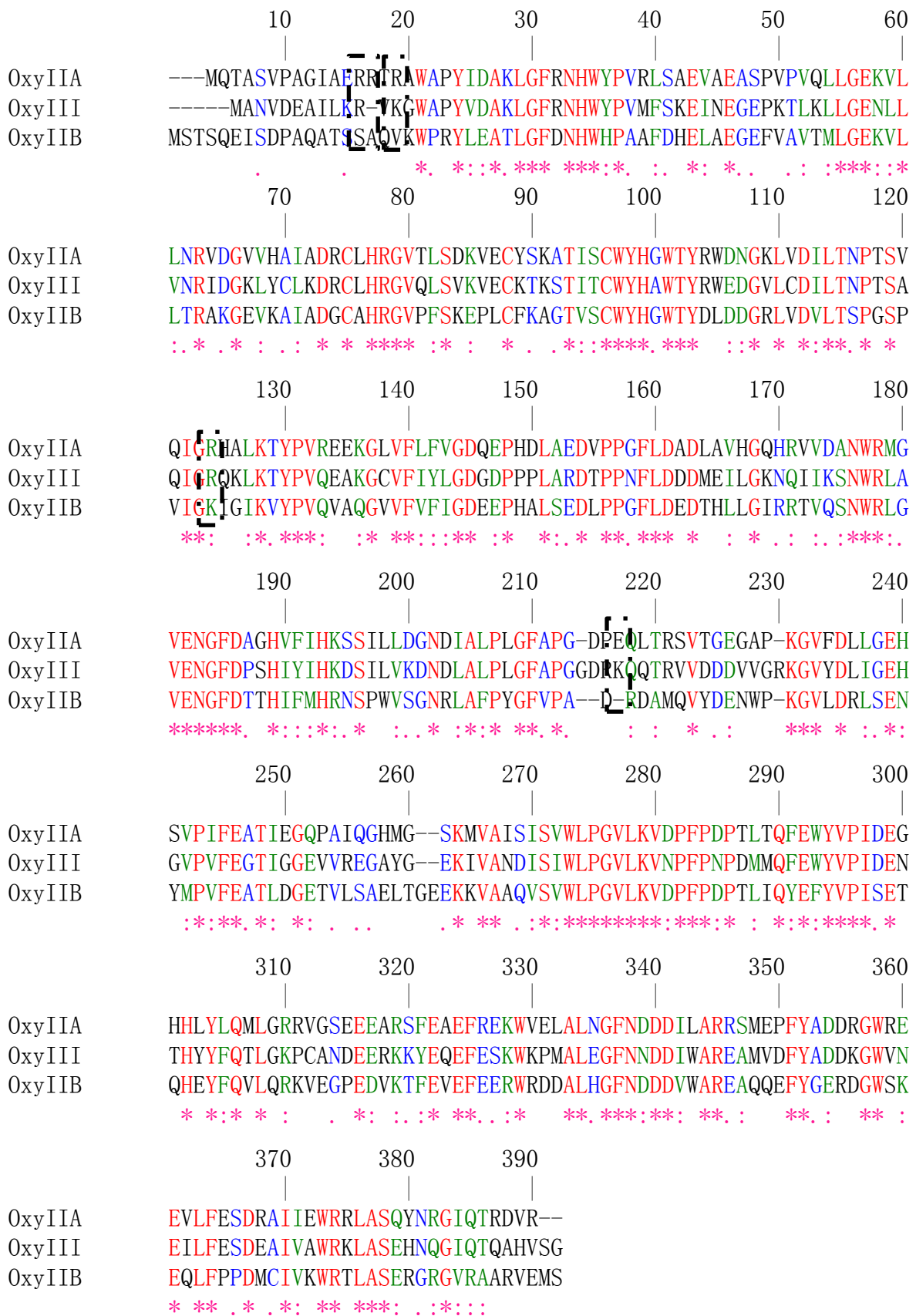


Fig. 3-27. Oxyの一次配列のalignment

Identicalなアミノ酸残基は赤, 高いsimilarityを示す残基は緑, 弱いsimilarityを示す残基は青で示した。OxyIIAの極性相互作用を起こしていると考えられる残基を破線四角で示した..

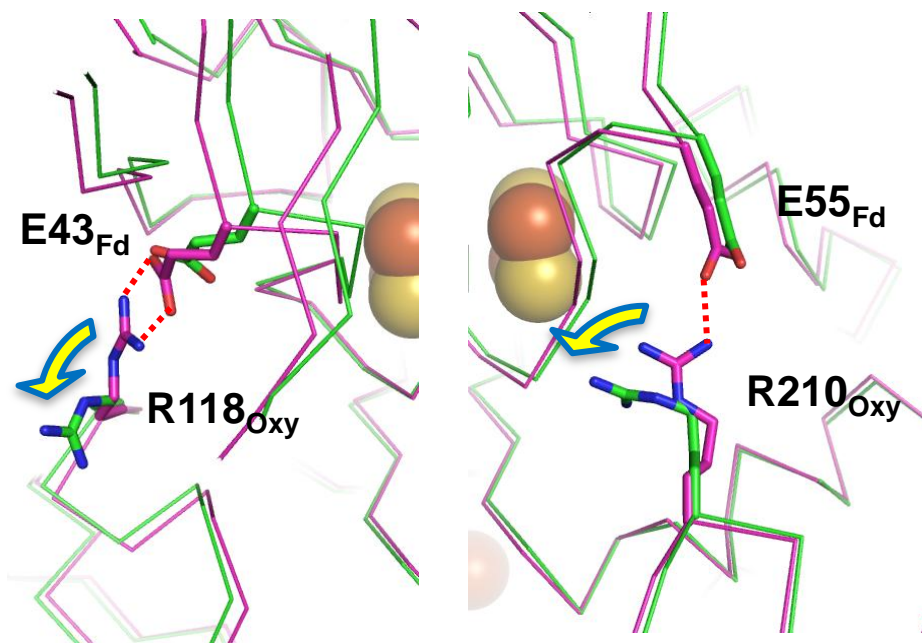


Figure 3-28. Oxy_{III}:Fd_{III}複合体における酸化還元依存的なアミノ酸のフリップ

緑: 酸化型Oxy_{III}:酸化型Fd_{III}複合体

ピンク: 還元型Oxy_{III}:酸化型Fd_{III}複合体

フリップが生じているアミノ酸残基をスティックで示した. 水素結合を破線で示した

第四章 総括と展望

本研究は、電子伝達系に多様性があるという興味深い特徴を持つ CARDO の電子伝達機構を構造生物学的に解明することを目的として行った。CARDO は三つのコンポーネントを持つが、異なる細菌に由来する電子伝達系の異なる三種が存在することから、当研究室で解析を進めている CARDO コンポーネントは九つある。本研究開始当初までに、その内の七つの構造が明らかとなっていたが、Fd_{IIA} と Red_{IIB} の結晶構造は明らかとなっていなかった。特に、CARDO の電子伝達系の中で、Fd と Red はタイプの異なるものがそれぞれ 2 種類存在するが、Red はその内の両方の構造が明らかとなっていたのに対し、Fd は片方の構造しか明らかとなっていなかった。このため、CARDO の電子伝達機構を理解する為には Proteo 型である Fd_{IIA} の構造が不可欠であった。

第二章では、上記背景を受けて Fd_{IIA}、Red_{IIB} の結晶構造を明らかにした。また Fd_{IIA} の酸化還元電位の測定も行った。その結果、Fd_{IIA} の酸化還元電位は 4Cys[2Fe-2S] ferredoxin ではこれまでに報告例のない、著しく高い酸化還元電位を示し、Fd_{IIA} は 4Cys[2Fe-2S] ferredoxin では世界で初めての HiPIP の報告例であることが明らかとなった。結晶構造解析から、[2Fe-2S] クラスタ近傍に存在する水分子が高い酸化還元電位の要因であることが示唆された。Fd_{IIA} の酸化還元電位の pH 依存性も見出し、Fd_{IIA} は他の Proteo 型 Fd とは異なる挙動を示すことを明らかとした。また、得た結晶構造を他のクラスのものと比較することで電子伝達選択性に関わるであろう構造的要因を見出した。すなわち、Fd_{IIA} は他のクラスのもの比べて相互作用領域が広いこと、Red_{IIB} は Red_{IIA} と比べて狭い相互作用領域を持つことを明らかにした。

第三章では、Oxy_{IIA}:Fd_{IIA} 複合体、Fd_{IIA}:Red_{IIA} 複合体のドッキングシミュレーションを行った。Oxy_{IIA}:Fd_{IIA} のシミュレーション結果を Oxy_{III}:Fd_{III} 複合体結晶構造と比較することで、結合様式の違いを明らかにした。また、Oxy と Fd の表面電荷の違いを全てのクラスの Oxy と Fd で示し、複合体の形成には、鍵と鍵穴のような形状の一致と、表面電荷の相補性が重要であることを示した。このことから、Oxy と Fd の間の厳密な認識に関わる要因が明らかとなった。シミュレーションによる Fd_{IIA}:Red_{IIA} 複合体の解析では、BDO-F:BDO-R の結晶構造と比較する事により、複合体の形成の可否には表面電荷の相補性はそれほど重要ではなく、形状が一致するかどうか为主要因と成りうるということを提唱した。

しかし、シミュレーションを用いた比較は、複合体形成時の構造変化など、本来の構造を反映していない可能性がある。このため、コンポーネント間結合親和性の測定を行い、電子伝達が起こらないという事は、“複合体を形成しないからなのか”あるいは“複合体は形成するが、電子伝達が起こらないのか”どうかを明らかにするために、ITC を用いて相互作用に伴う熱力学定数の決定を行った。この結果から、異なるクラスの組み合わせでは、複合体が形成されないために電子が伝達されないという事が明らかとなった。

CARDO 以外に電子伝達系に多様性をもつ RO はなく、従って、これまでに RO の電子伝達メカニズムを構造生物学的にクラス間で比較したものはない。また、CARDO のコンポーネント間の電子伝達選択性は特異なものではなく、RO では同様の傾向を示す。このため、本研究の成果は CARDO の電子伝達メカニズムを構造生物学的に明らかにしただけでなく、RO に属する酵素の電子伝達メカニズムに対しても重要な示唆を与えるものと考えられる。

本研究により、CARDO の電子伝達メカニズムをクラス間で比較したことで、世界で初めて RO の電子伝達選択性の構造基盤を提唱した。また、RO と同様の電子伝達系を有する P450 との比較を行うことで RO と P450 のコンポーネント間相互作用様式の差異を見出し、電子伝達タンパク質の複合体形成に一般的なメカニズムの解明の足がかりを得られたと考えられる。

ROにおいて、電子伝達選択性などの研究が酸化酵素の基質認識などの研究と比べてあまりなされていなかったのは、酵素の反応機構が多くの研究者の注目を浴びた他に、CARDOのように電子伝達系に多様性が見られないからであると考えられる。RO研究において多くの研究者の注目を浴びたものは電子伝達機構と基質変換であるが、本研究によりROに一般的な電子伝達複合体の構造基盤を提唱したことで、電子伝達機構、すなわち電子伝達複合体の形成機構は説明できるようになったと考えられる。P450は、異なる由来のものでも電子伝達が可能であるため、近年、電子伝達系の互換性に関する報告も増えている。このため、電子伝達に関する知見が増えれば、本研究において提唱された機構を基に、より一般化された電子伝達機構について一層の理解が深まると考えられる。

また、ROは環境汚染物質分解だけでなく、物質生産としての応用研究も成されている。酸化反応には電子伝達が必須であるため、本研究で提唱した機構により、より電子伝達が可能になれば、ROはより有用なツールとなるのではないかと考えられる。

実験の材料および方法

M-1. 菌株およびプラスミド

本章で使用した菌株及びプラスミドを Table M-1 に示した. 遺伝子操作の宿主としては *E. coli* DH5 α 株[Sambrook et al., 1989]を用い, *E. coli* BL21(DE3), B834 株 (TaKaRa)は pET-26b(+)(TaKaRa)の発現用宿主とした.

M-2. 培地

大腸菌用の培地として LB 培地 [Sambrook et al., 1989], 2 \times YT 培地 [Sambrook et al., 1989] および SB 培地 [Nam et al., 2002]を用いた. 組成は以下の通りである.

選択培地には必要に応じて終濃度 50 μ g/mL となるように抗生物質 (Km: kanamycin)を添加し, 寒天培地作製時には寒天を終濃度 1.6% (w/v)になるように添加した.

培地の組成を以下に示す.

LB medium		2 x YT medium	
Bacto-tryptone	5 g	Bacto-tryptone	12.5 g
Bacto-yeast extract	10 g	Bacto-yeast extract	3.8 g
NaCl	5 g	NaCl	15 g
	per 1 L		per 1 L

SB medium			
A 培地		B 培地	
Bacto-tryptone	12 g	K ₂ HPO ₄	12.5 g
Bacto-yeast extract	24 g	KH ₂ PO ₄	3.8 g
Glycerol	5 mL		
	per 900 mL		per 100 mL

A 培地と B 培地をそれぞれオートクレーブ後, 混合して使用する

M-3. Polymerase chain reaction (PCR)

試薬

- ・反応溶液は以下に示すように混合した.

PCR 反応の組成		
Template DNA	1 µg/µL	1 µL
Primer (reverse)	10 pmol/µL	1 µL
Primer (forward)	10 pmol/µL	1 µL
10×Ex Taq™ Buffer		5 µL
dNTPs	2 mM	5 µL
TaKaRa Ex Taq™	5 units/µL	0.25 µL
滅菌水を加え, total 50 µL とした		

Primer は以下のものを利用した.

Forward

5'- ACTTCA CATATG CACCACCACCACCAC TCGGAGACCATCCGGCTC -3'
NdeI 6 x *His*

Reverse

5'- ACATGT AAGCTT TCAGAGCTGACTGGCGGGCAG -3'
HindIII

操作

PCR 反応の Thermal Cycler には Gene Amp PCR system 2400 (PE Biosystems Japan)を用いた.

PCR 反応条件		
1 cycle	95 °C	90 sec
30 cycles	98 °C	10 sec
	66 °C	30 sec
	72 °C	1 min
1 cycle	4 °C	∞

M-4. コンビテントセルの作成

細胞工学実験プロトコール[東京大学医科学研究所制癌研究部編,1993]に従って行った.

試薬

- ϕ_a plate
- ϕ_a medium
- Tfb I buffer
- Tfb II buffer

試薬の組成を以下に示す.

ϕ_a plate		ϕ_b medium	
Bacto trypton	1 g	Bacto trypton	1 g
Yeast extract	4 g	Yeast extract	4 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
Agar	3.2 g	Agar	3.2 g
per 200 mL		per 200 mL	

Tfb I buffer		Tfb II buffer	
KOAc	0.295 g	MOPS	0.209 g
RbCl	1.21 g	CaCl ₂	1.103 g
CaCl ₂	0.147 g	RbCl ₂	0.121 g
MnCl ₂	0.99 g	Glycerol	1 mL
Glycerol	15 mL	per 100 mL	
per 100 mL			
酢酸で pH5.8 に調製し濾過滅菌する		KOH で pH6.5 に調製し濾過滅菌する	

操作

- 1) ϕ_a plate に線引きしておいた *E. coli* JM109 株, BL21 (DE3)株のシングルコロニーを ϕ_b medium に植菌する.
- 2) 37°C, 300 strokes / min の条件で 2-2.5 時間培養し, OD₅₆₀ が約 0.3 になったらへそ付き三角フラスコに入れた ϕ_b medium 100 mL に 5 mL 全てを植菌する.
- 3) 37°C, 120 rpm の条件で OD₆₀₀ が約 0.48 になったら 5 分氷上に静置する.
- 4) 冷やしておいた 50 mL チューブに移し, 3,000 rpm, 5 分, 4°C で遠心する.
- 5) 上清を捨て, 4°C に冷やしておいた Tfb I 20 mL に懸濁し, 3,000 rpm, 5 分, 4°C で遠心する.
- 6) 100 μ L に分注し, 使用時まで-80°C で保存する.

M-5. *E. coli* の形質転換法

Hanahan の方法 [Hanahan,1983]に基づき, 細胞工学実験プロトコールに従って行った.

操作

- 1) -80 °Cで保存していたコンピテントセルを氷上で融解させる.
- 2) 100 μ L のコンピテントセルに対し, プラスミド調製後のプラスミド溶液の場合は 1-2 μ L, ligation 反応後の溶液の場合は全量加え, 氷上で 20 分間静置する.
- 3) 42 °C, 45 秒間の heat shock を与えた後, 氷上で 2 分間静置する.
- 4) LB medium 1 mL を加え, 37 °Cで 1 時間 incubate する.
- 5) 抗生物質を加えた LB plate に塗布し, 37 °Cで 12 時間以上静置培養する.

M-6. *E. coli* からのプラスミドの回収

アルカリ SDS 法 [Birnboim and Doly, 1979]に改良を加え, 以下の手順により行った.

試薬

- 12.5 M LiCl
- TE buffer
- TE 飽和フェノール
- フェノール-クロロホルム
- 10 mg/mL RNase A 溶液 (東洋紡)
- TEG
- NaOH-SDS
- 5 M KOAc

試薬の組成を以下に示す.

TE 飽和フェノール		フェノール・クロロホルム
phenol	500 g	TE 飽和フェノールにクロロホルムを等量加えたもの
8-quinolinol	0.5 g	
TE buffer	適量	
*68 °C の湯浴で融解させたフェノールに 8-quinolinol を加え, フェノールと等量の TE buffer を加えて約 1 時間攪拌する. TE buffer を取り除き, 新しい TE buffer を加えて同様の操作を行う. 下層を TE 飽和フェノールとする.		

TEG		NaOH-SDS		5 M KOAc	
Glucose	50 mM	NaOH	0.2 M	Potassium acetate	29.4 g
Tris-HCl	25 mM	SDS	1% (wt/vol)	acetate	11.5 mM
EDTA · Na	10 mM	* 要時調製			

操作

- 1) 適当な抗生物質を加えた 2×YT 培地 5 mL に single colony を植菌し, 37°C, 300 rpm, 8 時間培養する.
- 2) 菌液 2 mL を 2 mL マイクロチューブへ移し, 10,000 rpm, 1 分, 4°C で遠心する.
- 3) TEG を 100 µL 加え, vortex して懸濁し 5 分間室温で静置する.
- 4) NaOH-SDS を 200 µL 加え invert で攪拌した後, 氷中で 5 分間静置する.
- 5) 5 M KOAc を 150 µL 加え invert で攪拌した後, 氷中で 5 分間静置する.
- 6) フェノール/クロロホルムを 450 µL 加え, すぐに vortex にかける.
- 7) 15,000 rpm, 12 分, 室温で遠心し, 上清約 450 µL を新しい平底マイクロチューブに移す.
- 8) 2-Propanol を 450 µL 加え, すぐに vortex にかけた後 15,000 rpm, 5 分, 室温で遠心する.
- 9) 上清を捨て, 70% EtOH を 400 µL 加え, チューブの周りをリンスした後 15,000 rpm, 2.5 分, 室温で遠心する.
- 10) 沈殿を TE buffer 100 µL に溶解させ, 12.5 M LiCl を 25 µL 加え, vortex にかけて氷中に 15 分以上静置する. その後, 15,000 rpm, 15 分, 4°C で遠心する.
- 11) TE buffer 300 µL を入れておいたマイクロチューブに上清を 130 µL 加え, さらに 100% EtOH を 1 mL 加え, すぐに vortex にかけて 5 分室温に静置する. その後, 15,000 rpm, 5 分, 室温で遠心する.
- 12) 上清を捨て, 70% EtOH を 400 µL 加え, ペレットをリンスした後, 15,000 rpm, 2.5 分, 室温で遠心する.
- 13) TE buffer で 1000 倍希釈した RNase A 溶液を加え, 37°C で 1 時間処理する. 使用時まで -20°C で保存する.

M-7. DNA 操作

本研究で使用した制限酵素及びその他の酵素類は, タカラバイオ, 東洋紡, ニッポンジーン, ロシュ・ダイアグノスティックス社のいずれかのものを購入し, 説明書の指示に従って用いた. 特に明記しない DNA 関連の操作は, 細胞工学実験プロトコル, クローニングとシーケンス [杉浦昌弘 編, 1989], もしくは Molecular cloning: A Laboratory Manual [sambrook et al., 2001]に従って行った.

M-8. ベクターの脱リン酸化

Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP; Roche diagnosis)を用いて行った.

試薬

- CIAP
- 10 × CIAP buffer
- TE 飽和フェノール
- フェノール-クロロホルム

操作

- 1) 制限酵素処理したサンプルを用意する.
- 2) フェノール-クロロホルム処理と EtOH 沈殿を行った後, dH₂O を 43 μL 加えてペレットを懸濁させる.
- 3) 10 x CIAP buffer を 5 μL 加え, vortex する.
- 4) 68°C で 10 分 incubate した後氷中に約 2 分静置し, 急冷する.
- 5) CIAP を 1 μL 加え, 軽にかき混ぜた後 55°C で 30 分 incubate する.
- 6) さらに CIAP を 1 μL 加えて 55°C で 30 分 incubate する.
- 7) TE buffer を 100-200 μL 加える.
- 8) 等量のフェノール-クロロホルムを加え, 1,5000 rpm, 3 分, 室温で遠心する.
- 9) もう一度 8) と同様のフェノール-クロロホルム処理を行う.
- 10) EtOH 沈殿を行い, 適量の TE buffer に溶解させる.

M-9. Agarose gel からの DNA の回収

DNA のアガロース電気泳動には TAE buffer と 0.9 %, 2.0 %アガロース ME (ナカライテスク)を用い, ミューピッド小型電気泳動槽 (ADVANCE Co., Ltd.)内で 100 V で行った. アガロースゲルからの DNA の回収には E. Z. N. A.[®] Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek)を使用した.

試薬

- Wash buffer
- Gel Solubilization buffer
- TAE buffer

試薬の組成を以下に示す.

TAE buffer	
Tris-acetate (pH8.0)	40 mM

EDTA・Na

0.05 M

操作

* 遠心は全て室温で行った.

- 1) DNA を電気泳動によって分離し, 目的の DNA 断片を含むゲルを切り出す.
- 2) 切り出したゲルを 2 mL 容マイクロチューブに取り, 10 mg のゲルに対して 30 μ L の Gel Solubilization buffer を加える.
- 3) 50°C で 15 分以上 incubate し, ゲルを溶解させる. この際 5 分ごとに invert を行う.
- 4) スピントリッジを 2 mL ポリプロピレンチューブに乗せてゲル溶解液を 700 μ L ずつ乗せる.
- 5) 12,000 rpm で 1 分遠心し, チューブに落ちた液体を捨てる.
- 6) スピントリッジを再び 2 mL ポリプロピレンチューブに乗せて Gel Solubilization buffer を加え, 1 分 incubate する.
- 7) 12,000 rpm で 1 分遠心し, チューブに落ちた液体を捨てる.
- 8) カラムを再び 2 mL 容ポリプロピレンチューブに乗せて 700 μ L の Wash buffer を加えて室温で 5 分 incubate する.
- 9) 12,000 rpm で 1 分遠心し, チューブに落ちた液体を捨てる.
- 10) さらに遠心して Wash buffer を完全に除く.
- 11) 1.5 mL 用のリカバリーチューブにカラムを乗せ, 70°C に熱しておいた TE buffer を 50 μ L 加えて 1 分 incubate する.
- 12) 12,000 rpm で 2 分遠心する.

M-10. Ligation 反応

DNA の連結には Ligation High (東洋紡)を使用した.

操作

- 1) 必要に応じた制限酵素処理・回収後のベクター溶液と ligation する DNA fragment 溶液を混合する. これらの溶液は, 予め TE buffer に溶解させておいた.
- 2) 混合液の半量の Ligation High を加え, 16°C で 30 分以上反応させる. 反応液は大腸菌の形質転換に用いる.

M-11. 塩基配列決定法

ABI PRISM[®]310 Genetic Analyzer を用い, 目的遺伝子のシーケンスの確認を行った. 操作手順は添付の操作ガイド (2000 年 8 月版 Rev. 4.2)に従った.

試薬

- Big Dye Primer Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems Japan)
- 10×EDTA buffer (PE Biosystems Japan)
- Performance Optimized Polymer 6 (POP6) (PE Biosystems Japan)
- Template Suppression Reagent (TSR) (PE Biosystems Japan)

操作

- 1) 反応溶液を以下のように混合する.

シーケンス反応溶液の組成		
DNA template		200 ng
Primer (M13)	3.3 pmol/μL	1 μL
Premix buffer		4 μL
Sequence buffer		2 μL
滅菌水を加え, total 20 μL とした		

- 2) 以下に示す温度プログラムでシーケンス反応を行う.

シーケンス反応		
1 cycle	96 °C	5 min
25 cycles	96 °C	10 sec
	50 °C	5 sec
	60 °C	4 min
1 cycle	4 °C	∞

- 3) シーケンス反応終了後の溶液に 2 μL の酢酸ナトリウム溶液を加える.
- 4) 50 μL の 99.5%EtOH で EtOH 沈殿を行い 15,000 rpm, 5 分, 室温で遠心する.
- 5) 70%EtOH でリンスし, デシケーターにより残りの EtOH を蒸発させる.
- 6) 沈殿を 15 μL の TSR に溶解させ, 95°C で熱変性させた後, 氷上で急冷する.

M-12. 大腸菌による酵素の発現条件の検討

操作

- 1) 形質転換操作後に寒天培地上に現れた single colony を 5 mL LB medium (50 μg /mL Km) に植菌し, 300 rpm, 1 時間, 37 °C で振盪培養する.

- 2) 1) の培養液と 80%グリセロールを等量混合し、グリセロールストックを作製する。グリセロールストックは使用時まで-80°C で保存する。
- 3) グリセロールストック 5 μ L を LB medium (50 μ g /mL Km) 5 mL に植菌し、それぞれ 25°C, 30°C, 37°C で培養する。
- 7) OD₆₀₀=0.4~0.5 になった時点で、各温度での培養液につき、終濃度が 0 μ M, 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1.0 μ M となるように、Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加する。
- 8) 15 時間培養後、15,000 rpm, 1 分, 4 °C の遠心により集菌する。
- 9) 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) で菌体を二回洗浄後 100 μ L の同 buffer に懸濁させる。
- 10) 懸濁液の温度が 4 °C 以上にならないように氷冷しながら、Sonifier 250D (Branson) により菌体を破砕する。
- 11) 15,000 rpm, 30 分, 4 °C で遠心を行い、上清を新しいチューブに移す。

以上の操作により得られたサンプルを SDS-PAGE に供し、発現量の比較を行った。

M-13. タンパク質の定量

タンパク質の定量は、プロテインアッセイキット (Bio-Rad Lab.) を用いたスタンダードアッセイ法 [Bradford,1976] により行い、標準タンパク質として bovine serum albumin (BSA) を使用した。吸光度測定には BECKMAN DU-800 を使用して行った。

操作

- 1) 標準試料として BSA を 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL になるように調製する。
- 2) サンプルを適量の滅菌水で希釈した溶液を調製する。
- 3) Dye reagent を滅菌水で 5 倍に希釈する。
- 4) 希釈した Dye reagent 1 mL に対し, 1), 2) で調製した標準試料, 及びサンプルを 20 μ L 加えて, 2~3 秒間 vortex する。
- 5) 室温で 5 分間放置した後, 波長 595 nm の吸光度を測定し, 標準タンパク質を用いた検量線との比較を行い, サンプル中のタンパク質の定量を行う。

M-14 Tricine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Tricine SDS-PAGE)

試薬

- 30% (wt / vol) Acrylamide/Bis (19:1) (Bio-Rad Lab.)
- 4 \times Tris-HCl / SDS (pH 6.8) :濃縮ゲルバッファー
- 4 \times Tris-HCl / SDS (pH 8.8) :分離ゲルバッファー
- N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)
- 10% (wt / vol) Ammonium persulfate (APS)

- 分子量マーカー Low-Range Rainbow Molecular Weight Markers(GE Healthcare)
- 染色液 SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen).
- SDS / electrophoresis buffer

試薬の組成を以下に示す.

2 x SDS sample buffer		4 x Tris-HCl / SDS (pH 6.8)	
4 x Tris-HCl/SDS (pH 6.8)	25 mL	Tris	6.05 g
Glycerol	20 mL	SDS	0.4 g
SDS	4 g		per 40 mL
2-mercaptoethanol	2 mL	HCl で pH6.8 に調整する	
Bromophenol blue	1 mg		
	per 100 mL		
		4 x Tris-HCl / SDS (pH 6.8)	
		Tris	91 g
		SDS	2 g
			per 300 mL
		HCl で pH8.8 に調整する	

SDS / electrophoresis buffer			
Anode buffer		Cathode buffer	
Tris-HCl(pH8.9)	24.2 g	Tris	12.1 g
		Tricine	17.9 g
		SDS	1 g
蒸留水に溶解させ, 1 L に fill up する			

操作

- 1) 30 % (wt / vol) Acrylamide/Bis 水溶液 2.5 mL, の分離ゲルバッファー 1.66 mL, Glycerol 0.55 mL 滅菌水 0.29 mL を混ぜ合わせ分離ゲル液を調製する. これを 20 分間脱気する.
- 2) Bio-Rad のミニプロテインセル II-D セットを組み立てる.
- 3) 10% APS 溶液 25 μ L と TEMED 2.5 μ L を加え穏やかに攪拌し, 分離ゲル溶液をミニプロテインセル II-D セット流し込み固化させる. このとき, 上部に滅菌水を重層する.

30-60 分間室温でゲルを固め、その後、水を捨て上部を滅菌水でリンスする。

- 4) 濃縮ゲル溶液を調製する。の 30% (wt / vol) Acrylamide/Bis 水溶液 0.34 mL, の濃縮ゲルバッファー0.62 mL, 滅菌水 1.54 mL を混ぜ合わせ, 20 分ほど脱気する。
- 5) 分離ゲルと同様に 10% APS 溶 12.5 μ L と TEMED 5 μ L を加え, 穏やかに攪拌する。ゲル溶液を分離ゲルの上に流し込み, コームを差し込む。
- 6) アプライするサンプルに等量の 2 x SDS サンプルバッファーを加え, 100°C で 5 分間 boiling することによりタンパク質を変性させる。
- 7) ウェルにサンプルをアプライし, 電気泳動を行う。サンプルが濃縮ゲル中に存在するときは 120 V, 分離ゲルに移り次第 200 V に設定を変え色素マーカが分離ゲルの下端まできたら泳動を終了する。
- 8) 濃縮ゲルを切り取ってから, ゲルを染色液に浸し, 常温で 30 分振盪して染色する。
- 9) ゲルを滅菌水に浸して振盪により脱色を行う。適宜滅菌水を交換して振盪し, その後蒸留水でリンスする。
- 10) 滅菌水で濡らしたセロファンとゲルの間に気泡が入らないように注意しながらセロファンの上にゲルをのせ, ゲルの上にもう一枚滅菌水で濡らしたセロファンをのせる。
- 11) ゲルエアドライヤー (Bio-Rad Lab.)の中にセロファンに挟んだゲルを入れて 3 時間ほど乾燥させる。

M-15. 大腸菌による酵素の大量発現誘導

操作

- 1) LB medium (50 μ g/mL Km) 5 mL にグリセロールストック 5 μ L を植え継ぐ。
- 2) 300 rpm, 15 時間, 37 °C で振盪培養を行う。これを前々培養液とした。
- 3) SB medium (50 μ g/mL Km) 1.5L に 4) の前培養液 を全量 (Oxy_{IIB} の場合は 3 本分) 植え継ぐ。
- 6) OD₆₀₀=0.4~0.5 となるまで 300 rpm, 適当な温度・時間, 振盪培養を行う。
- 7) IPTG を添加する。
- 8) 120 rpm, 15 時間, 適当な温度で振盪培養を行う。

各タンパク質の発現条件				
タンパク質	誘導前までの培養温度 (°C)	誘導までの培養時間 (h)	IPTG 濃度 (M)	培養温度 (°C)
Oxy _{IIA}	37	2.5	0.2	5
Fd _{IIA}	37	2.75	0.5	25
Red _{IIA}	37	2.5	0.5	25

Oxy _{IIB}	30	3 h	0.5	30
Fd _{IIB}	37	2.5 h	0.5	25
Red _{IIB}	37	2.5 h	0.5	25
Oxy _{III}	37	2.5 h	0.5	25
Fd _{III}	37	2.5 h	0.5	30
Red _{III}	37	3 h	0.5	25

M-16. 大量発現系での粗酵素抽出液の調製

操作

- 1) 2-2-15 の操作で得られた培養液を 5,000 g, 10 分, 4 °C の遠心により集菌する.
- 2) Affinity chromatography A buffer(後述)で菌体を二回洗浄後(5,000 rpm, 10 分, 4 °C) 15% B buffer を含む Affinity chromatography A buffer に菌体を懸濁させる.
- 3) 懸濁液の温度が 4°C 以上にならないように氷冷しながら, Sonifier 250D (Branson)により菌体を超音波破碎する.
- 4) 破碎した菌体の懸濁液を 20,000 g, 60 分, 4 °C で遠心し, 上清を取り, フィルター濾過を行う. この上清を粗酵素抽出液とした.

M-17. 酵素の精製

全ての精製操作は ÄKTA FPLC (GE Healthcare)を用いて 4 °Cで行った. 精製は metal chelation クロマトグラフィ(HiTrap affinity column, GE Healthcare), イオン交換クロマトグラフィ (HiPrep DEAE column, GE Healthcare), ゲル濾過クロマトグラフィ (Superdex-200, Superdex-75 column, GE Healthcare)に供することで行った. Fd のゲル濾過クロマトグラフィには Superdex-75 を、Oxy 及び Red のゲル濾過クロマトグラフィには Superdex200 を用いた.

M-17-1. Metal chelation クロマトグラフィ(HiTrap affinity column)

試薬

- Affinity chromatography A buffer
- Affinity chromatography B buffer
- 0.1 M NiSO₄

試薬の組成を以下に示す.

Affinity chromatography buffer

A buffer		B buffer	
Tris-HCl (pH7.5 at 4 °C)	20 mM	Tris-HCl (pH7.5 at 4 °C)	20 mM
NaCl	0.2 M	NaCl	0.2 M
Glycerol	10 %	Glycerol	10 %
		imidazole	200 mM

フィルター濾過を行う。使用前に脱気する(4 時間)

操作

- 1) HiTrap affinity column (GE Helthcare, HiTrap Chelating, 1 CV = 5 mL)に 15 mL の滅菌水を流速 2 mL/min で流し、カラムを洗浄する。
- 2) 3 mL の 0.1 M NiSO₄を流速 0.5 mL/min で流し、カラムに Ni²⁺をチャージさせる。
- 3) 15 mL の滅菌水を流速 2 mL/min で流し、カラムを洗浄する。
- 4) A buffer を流速 2 mL/min で流し、カラムを平衡化する。
- 5) サンプルを流速 1 mL/min でアプライし、カラムに吸着させる。
- 6) 20 mM imidazole 含む A buffer を流速 2 mL/min で 25 mL 流し、非吸着物質を溶出させる。
- 7) 20 CV で imidazole 濃度が 30 mM から 300 mM までグラジエントがかかるように流速 2 mL/min で流し、酵素を溶出させる。フラクションは 5 mL ずつ回収する。
- 8) 5 CV の B buffer を流速 2 mL/min で流し、カラム内に残っているタンパク質を全て溶出させ、カラムの洗浄を行う。
- 9) 回収された酵素画分を centriprep YM-10 (Millipore)を用いて遠心(3,000 rpm, 4°C)することで濃縮をおこなう

M-17-2. イオン交換クロマトグラフィ (Hiprep DEAE column)

試薬

- Ion exchange chromatography A buffer
- Ion exchange chromatography B buffer

試薬の組成を以下に示す。

Ion exchange chromatography buffer			
A buffer		B buffer	
Tris-HCl (pH7.5 at 4 °C)	20 mM	Tris-HCl (pH7.5 at 4 °C)	20 mM
Glycerol	10 %	Glycerol	10 %
		NaCl	1 M

フィルター濾過を行う。使用前に脱気する(4 時間)

操作

- 1) HiPrep DEAE column (GE Healthcare)に TG buffer を流速 2 mL/min で流し洗浄する。
- 2) M-16-1 で精製したタンパク質をアプライする。
- 3) TGB buffer を流速 0.5 mL/min で流すことで酵素を溶出させる。フラクションは 2 mL ずつ回収する。
- 4) 回収した酵素を, Centriprep-YM10 (Millipore)を用いて 3,000 rpm, 4°Cで遠心することで濃縮し, 後述の GFC buffer に置換する。

M-17-3. ゲル濾過クロマトグラフィ(Superdex 75 column)

試薬

- Gel filtration chromatography (GFC) buffer

試薬の組成を以下に示す。

Gel filtration chromatography buffer	
Tris-HCl (pH7.5 at 4 °C)	20 mM
NaCl	0.2 M
Glycerol	10%

フィルター濾過を行う。これらを混合し調製した溶液を脱気する(6 時間)。

操作

- 1) Superdex 75 column (GE Healthcare, 1 CV = 320 mL)に 0.8 CV の GFC buffer を流速 0.5 mL/min で流し洗浄する。
- 2) 2-2-16-1. で精製した酵素をアプライする。
- 3) GFC buffer を流速 0.5 mL/分で流すことで酵素を溶出させる。フラクションは 2 mL ずつ回収する。
- 4) 回収した酵素溶液を, Centriprep-YM10 を用いて 3,000 rpm, 4°Cで遠心することで濃縮し, 結晶化用の buffer である 5 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer に置換する。

M-18. 吸光度測定

吸光度測定は BECKMAN DU-800 を用いて行った。

操作

- 1) 得られた精製酵素溶液を石英セルに入れる.
- 2) 200 nm から 800 nm まで連続的に波長を変化させて吸光度を測定する.

嫌気条件下での測定は, サンプルをセルに入れ, ブチルゴム栓で密閉した後, Ar ガスのバブリングによってセル内を嫌気条件下とした (三紳工業社製ガス噴射法による嫌気性菌培養装置 AG-1/AG-2 を用いた).

M-19. 酸化還元電位の測定

測定は ALS/CHI electrochemical analyzer Model 832A (BAS, Inc. USA) を用い, 作用極には pyrolytic graphite working electrode (BAS, Inc. USA), 対極には白金電極, 参照極には Ag/AgCl reference electrode (Cypress Systems, Inc. USA) を使用した. 測定方法は cyclic voltammetry と square wave voltammetry の 2 種類を行った.

試薬

測定溶液は以下の通りに混合した.

Fd _{IIA}	1 mM
Dithiothreitol	1 mM
Tris-HCl (pH7.5)	50 mM
液量を 500 μ L とした	

操作

- 1) 作用極をダイヤモンドで研磨し, 超音波洗浄する.
- 2) 測定セルに Fd_{IIA} 溶液を加え, 作用極, 対極, 参照極をセットする.
- 3) Ar ガスで 10 分間のバブリングを行い, 溶存酸素を除く.
- 4) Fd_{IIA} を含まない系でバックグラウンドの測定を行う.
- 5) サンプルの測定を行う.
- 6) 5)の結果から 4)を減算する.

Square wave voltammetry では cyclic voltammetry と比べて明瞭なピークが得られるため, バックグラウンドの減算は行わなかった.

参照極には Ag/AgCl 電極を用いているため, 実測値に 199 mV を加えることで, 標準水素電極を用いた場合の酸化還元電位に換算した. なお, 本実験で使用した機器は東京大学農学生命科学研究科応用生命化学専攻分析化学研究室のものを使用させて頂いた.

M-20. 結晶化条件のスクリーニング

Fd_{IIA} の結晶化操作は Hanging drop 蒸気拡散法, Red_{IIB} の結晶化操作は Sitting drop 蒸気拡散法により行った. 好気条件下と嫌気条件下での 2 通りを行った. 温度条件に関しては, 好気条件では室温で結晶化操作を行い, 20°C で incubate するものと, 4°C で結晶化操作を行い, 5°C で incubate する条件の 2 通りを行い, 嫌気条件では室温で結晶化操作を行い, 20°C で incubate した.

嫌気条件下での実験には Te-Her Anaerobox ANX-3 (ヒラサワ) を使用し, 嫌気ガスの組成は 80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂ であり, 嫌気チャンバー内の残留酸素はパラジウム触媒を用いて H₂ を水に変換させて除いた. 全ての実験操作の前に BR0055B anaerobic indicator (Oxoid) を使用し, 嫌気状態を保持している事を確認した. Senda らの方法に基づき [Senda et al., 2007], VDX プレートなどのプラスチック製実験器具は実験開始から少なくとも 2 週間以上前に嫌気チャンバー内に入れておき, 器具に付着している酸素を除いた. 結晶化試薬についても同様に 2 週間以上前に入れ, 回転振とうを繰り返す事で, 溶存酸素を除いた. 実験に使用する前に, キットから無作為に選んだ結晶化試薬を indicator に滴下し, 酸素が除かれているかどうかの確認を行った上で結晶化操作に供した.

試薬

好気条件: Crystal Screen I, Crystal Screen II, Crystal Screen Cryo, Crystal Screen Index, Crystal Screen SaltRX (以上は Hampton Research), Wizard I, Wizard II (以上は Emerald).
嫌気条件: Crystal Screen, Crystal Screen II, Crystal Screen Cryo, Crystal Screen Index (Hampton Research).

装置

Sitting drop 蒸気拡散法でのスクリーニングは HYDRA II-Plus-One (Apogent Siscoveries) を用いた.

操作

- 1) 精製酵素を Centriprep YM-10 (Millipore) を用いて 3,000 rpm, 4°C で遠心することにより濃縮し, そこへ 5 mM Tris-HCl (pH 7.5) を 5 mL 加え, 再び濃縮する.
- 2) 1) の操作を再度繰り返し, 十分に buffer 交換した後, NANOSEP MF (0.45µm, 日本ジェネティクス) で濾過する.
- 3) Reagent を VDX プレート (Hampton Research) のウェルの中に 700 µL (嫌気条件では 500 µL) 入れた. Sitting drop の場合は 96 well プレートに 80 µL の reagent を入れる.
- 4) カバーガラスを air スプレーで埃を除き, サンプルを 2 µL のせ, そこにウェル中の reagent を 2 µL 加える. 装置の関係上, 嫌気条件での結晶化では, air スプレーは用いな

- い. Sitting drop の場合は 0.5 μL のサンプルと 0.5 μL の reagent を加える.
- 5) 4) のカバーガラスを裏返してウェルに被せ, ウェルとカバーガラスを密着させる.
Sitting drop の場合はプレートに ClearSeal film を貼り, プレートと密着させる.
- 6) 適当な温度で incubate する.

M-21. Fd_{IIA} の安定性試験

装置

吸光度測定は BECKMAN DU-800 を用いて行った.

操作

- 1) Fd_{IIA} を好気条件下あるいは嫌気条件下において室温で数日放置する.
- 2) 吸光スペクトルを測定する.

M-22. 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⁺⁺ (Rigaku, Japan), および高エネルギー加速器研究機構の放射光施設(Photon Factory:PF)にて収集した. データの取得にはそれぞれ, 波長 1.5418 (R-AXIS), 1.0000 Å (PF)の X 線を用いた. R-AXIS IV⁺⁺はスナップショットの測定のみを行い, PF での回折データ取得に用いる事が出来る結晶化どうかの確認に用いた. PF, PR-Advanced Ring (PF-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.

M-23. 構造決定と精密化

初期位相の決定は CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994)の molrep [Vagin and Teplyakov et al., 2000]を用いた分子置換法によって行った. V_M (Matthews coefficient [Matthews, 1968])の算出は CCP4 の Cell content analysis を用いた.

モデルの精密化には CCP4 の re mac5 [Murshudov et al., 1997], 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 XtalView/Xfit [McRee, 1999], 及び, COOT[Emsley and Cowtan, 2004]を用いた. 得られた立体構造の評価には PROCHECK [Laskowski et al., 1992], WHATCHECK [Hooft et al., 1996], および Molprobity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>)を用いた.

M-24. 構造モデルの重ね合わせと作図

構造モデルの重ね合わせは CCP4 の Superpose molecule を用いた.

M-25. 静電ポテンシャルの描画

静電ポテンシャルの描画に discovery studio (accelys)を用い、プログラムとしては DelPhi [Gilson and Honig, 1991]を用いた。

M-26. Oxy_{IIA}:Fd_{IIA} および Fd_{IIA}:Red_{IIA} のドッキングシミュレーション

ドッキングシミュレーションは ZDOCK [Chen et al., 2003], FTDock [Katchalski-Katzir et al., 1992], CE [Shindyalov et al., 1998]を用いて行った。前任者が行った FTDock によるドッキングシミュレーションでは、Oxy_{IIA}のN末端部分と Fd_{IIA}が衝突している解が得られていたため、Oxy_{IIA}のN末端を15残基まで削ったものと Fd_{IIA}の間ドッキングシミュレーションを行っていた [香月, 2008]。実際の構造では、Oxy_{IIA}のN末端の高い温度因子から、複合体形成時に大きく動くのではないかと予想される。そこで、本研究では、N末端を削ったものと全長をそのまま使用したものの2通りでドッキングシミュレーションを行った。電子伝達距離は Betts の経験式に従って予測した [Betts et al., 1992]。

M-27. 等温滴定型熱量測定

装置

解離定数等の熱力学定数の決定には iTC₂₀₀ (GE Healthcare)を使用した。

試薬

- dcn90
- メタノール

測定溶液は以下の通りに混合した。

サンプルセル側		滴定シリンジ側	
Oxy あるいは Red	0.3 mM	Fd	1 mM
NaCl	0.2 M	NaCl	0.2 M
Tris-HCl (pH7.5)	20 mM	Tris-HCl (pH7.5)	20 mM
Glycerol	10% v/v	Glycerol	10% v/v
液量を 500 μ L とした		液量を 100 μ L とした	

操作

- 1) サンプルセルを、dcn90 を用いて洗浄する。
- 2) 滴定シリンジを milliQ で洗浄した後、メタノールで洗浄しよく乾燥させる。
- 3) サンプルセルを測定に用いる buffer で共洗いし、よく水分を除く

- 4) サンプルセルにサンプルを 200 μ L 入れる. 入れる際にはセル内に気泡が入らないようにする.
- 5) 滴定シリンジにサンプルを充填する.
- 6) 滴定シリンジをサンプルセルに挿し、サンプルセルの温度を 30°Cにする.
- 7) DP を 5, シリンジ回転速度を 1000 rpm と設定し、測定を始める.

M-28. QuickChange 法を利用したタンパク質へのアミノ酸置換の導入

タンパク質のアミノ酸置換の導入は QuickChange Site-Directed Mutagenesis のプロトコールに従って行った.

アミノ酸置換の導入に用いた primer を以下に示す.

Fd_{T51A}

forward 5-gcgctgcgctgcgcg**g**cggtgccacgtcattgtccc-3

reverse 3-gggacaatgacgtggca**cg**ccgagggcgagggcg-5

Fd_{T51S}

forward 5-gcgctgcgctgcgcg**ag**ctgccacgtcattgtccc-3

reverse 3-gggacaatgacgtggca**gct**cgagggcgagggcg-5

Fd_{T51D}

forward 5-gcgctgcgctgcgcg**g**attgccacgtcattgtccc-3

reverse 3-gggacaatgacgtggca**atc**cgagggcgagggcg-5

Fd_{Q90A}

forward 5-ccgacttcgagcctgtcgtg**cg**gatccgcctcctccgc-5

reverse 3-gcggagagggcgatcgcgcac**gac**agggcggaagtcgg-3

Table M-1. 本研究で用いた菌株およびプラスミド

Strains or plasmids	Relevant characteristics	Source or reference
Bacterial strains		
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, Δ(lac-proAB)/F^r[traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15]</i>	Sambrook et al., 1989
DH5α	<i>F^r, φ80d, lacZ Δ M15, Δ(lacZYA-argF) U169, endA1, recA1, hsdR17 (rk-, mk+), deoR, thi-l, supE44λ, gyrA96, relA1</i>	Toyobo
BL21(DE3)	<i>F⁻, ompT (lon) hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3)</i>	Novagen
B834	<i>F⁻, ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm met (DE3)</i>	Novagen
Plasmids		
pET-26b(+)	<i>pBR322 origin, Km^r, lacI, T7 promoter</i>	Novagen
pEKANhtAcII	<i>Km^r, pET-26b(+)</i> with 0.3-kb. <i>NdeI-HindIII</i> DNA fragment containing <i>CarAcII</i> gene of <i>Novosphingobium</i> sp. strain KA1, for Fd _{IIA} expression as his-tagged protein at N-terminal	This study
pEKA232	<i>Km^r, pET-26b(+)</i> with 1.2-kb. <i>NdeI-HindIII</i> DNA fragment containing <i>CarAaII</i> gene of <i>Novosphingobium</i> sp. strain KA1, for Oxy _{IIA} expression as his-tagged protein at C-terminal	This study
pEKA240	<i>Km^r, pET-26b(+)</i> with 1.2-kb. <i>NdeI-HindIII</i> DNA fragment containing <i>fdrII</i> gene of <i>Novosphingobium</i> sp. strain KA1, for Red _{IIA} expression as his-tagged protein at C-terminal	This study
pE177502	<i>Km^r, pET-26b(+)</i> with 1.2-kb. <i>NdeI-HindIII</i> DNA fragment containing <i>CarAa</i> gene of <i>Nocardioides aromaticivorans</i> strain IC177, for Oxy _{IIB} expression as his-tagged protein at C-terminal	Inoue et al., 2009
pE177503	<i>Km^r, pET-26b(+)</i> with 0.3-kb. <i>NdeI-HindIII</i> DNA fragment containing <i>CarAc</i> gene of <i>Nocardioides aromaticivorans</i> strain IC177, for Fd _{IIB} expression as his-tagged protein at C-terminal	Inoue et al., 2009

pE177506	Km ^r , pET-26b(+) with 1.2-kb. <i>NdeI-HindIII</i> DNA fragment containing <i>CarAd</i> gene of <i>Nocardioides aromaticivorans</i> strain Ic177, for Red _{IIIB} expression as his-tagged protein at C-terminal Inoue et al., 2009
pECAC1	Km ^r , pET-26b(+) with 0.3-kb. <i>NdeI-HindIII</i> DNA fragment containing <i>CarAd</i> gene of <i>Pseudomonas resinovorans</i> strain CA10, for Fd _{III} expression as his-tagged protein at C-terminal Nam et al., 2002
pEJ3AaC	Km ^r , pET-26b(+) with 1.5-kb. <i>NdeI-HindIII</i> DNA fragment containing <i>CarAa</i> gene of <i>Janthinobacterium</i> sp. train J3, for Oxy _{III} expression as his-tagged protein at C-terminal Nojiri et al., 2005
pEJ3NAd	Km ^r , pET-26b(+) with 0.3-kb. <i>NdeI-HindIII</i> DNA fragment containing <i>CarAd</i> gene of <i>Janthinobacterium</i> sp. train J3, for Red _{III} expression as his-tagged protein at C-terminal Ashikawa et al., 2007

参考文献

- Aliverti A, Pandini V, Pennati A, de Rosa M, Zanetti G.** 2008. Structural and functional diversity of ferredoxin-NADP(+) reductases. *Arch Biochem Biophys.* 474:283-91.
- Alexander, M.** 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* 211:132-138.
- Armengaud, J., Timmis, K. N.** 1997. Molecular characterization of Fdx1, a putidaredoxin-type [2Fe-2S] ferredoxin able to transfer electrons to the dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. RW1. *Eur. J. Biochem.* 247: 833-42.
- Ashikawa Y, Fujimoto Z, Noguchi H, Habe H, Omori T, Yamane H, Nojiri H.** 2006. Electron transfer complex formation between oxygenase and ferredoxin components in Rieske nonheme iron oxygenase system. *Structure.* 14:1779-89.
- Barriault D, Sylvestre M.** 1999. Functionality of biphenyl 2,3-dioxygenase components in naphthalene 1,2-dioxygenase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51:592-7.
- Beharry, Z. M., D. M. Eby, E. D. Coulter, R. Viswanathan, E. L. Neidle, 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.
- Bell SG, F Xu, Johnson D, IM. Forward, M Bartlam, Z Rao, LL Wong.** 2010. Protein recognition in ferredoxin-P450 electron transfer in the class I CYP199A2 system from *Rhodospseudomonas palustris*. *J Biol Inorg Chem* (2010) 15:315–328
- Benedik, M. J., P. R. Gibbs, R. R. Riddle, R. C. Willson.** 1998. Microbial denitrogenation of fossil fuels. *Trends Biotechnol.* 16:390–395.
- Bes, M. T., Parisini, E., Inda, L. A., Saraiva, L. M., Peleato, M. L., Sheldrick, G. M.** 1999. Crystal structure determination at 1.4 Å resolution of ferredoxin from the green alga *Chlorella fusca*. *Structure.* 7: 1201-11.
- Betts, J. N., D. N. Beratan, J. N. Onuchic.** 1992. Mapping electron tunneling pathways: an algorithm that finds the "minimum length"/maximum coupling pathway between electron donors and acceptors in proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 114; 4043-4046.
- Birnboim, H. C., Doly, J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-23.
- Blumer M, Youngblood WW.** 1975. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils and Recent Sediments. *Science.* 188:53-55
- 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.
- Breton, J. L., Duff, J. L., Butt, J. N., Armstrong, F. A., George, S. J., Pétilot, Y., Forest, E., Schäfer, G., Thomson, A. J.** 1995. Identification of the iron-sulfur clusters in a ferredoxin from the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. Evidence for a reduced [3Fe-4S] cluster with pH-dependent

electronic properties. *Eur. J. Biochem.* 233: 937-46.

Brown, E. N., Friemann, R., Karlsson, A., Parales, J. V., Couture, M. M. Eltis, L. D., Ramaswamy, S. 2008. Determining Rieske cluster reduction potentials. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13:1301-13.

Carredano, E., A. Karlsson, B. Kauppi, D. Choudhury, R. E. Parales, J. V. Parales, K. Lee, D. T. Gibson, H. Eklund, S. Ramaswamy. 2000. Substrate binding site of naphthalene 1,2-dioxygenase: functional implications of indole binding. *J. Mol. Biol.* 296:701-712.

Charles A. Tyson S, Lipscomb JD, Gunsalus IC 1972. The Roles of Putidaredoxin and P450cam in Methylene Hydroxylation. *Journal of Biological Chemistry.* 247:5777-5784.

Chen, Z. W., M. Koh, G. Van Driessche, J. J. Van Beeumen, R. G. Bartsch, T. E. Meyer, M. A. Cusanovich, and F. S. Mathews. 1994. The structure of flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from a purple phototrophic bacterium. *Science* 266:430-432.

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.

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.

Crossnoe, C. R., Germanas, J. P., LeMagueres ,P., Mustata, G., Krause, K. L. 2002. The crystal structure of *Trichomonas vaginalis* ferredoxin provides insight into metronidazole activation. *J. Mol. Biol.* 318: 503-18.

Cytochrome P450_{scc}: Effect on Adrenodoxin Binding. *Journal of Cellular Biochemistry* 95:720–730.

D'Ordine RL, Rydel TJ, Storek MJ, Sturman EJ, Moshiri F, Bartlett RK, Brown GR, Eilers RJ, Dart C, Qi Y, Flasiniski S, Franklin SJ. 2009. Dicamba monooxygenase: structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *J Mol Biol.* 392:481-97.

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. 187:2483-2490.

- Dumitru R, Jiang WZ, Weeks DP, Wilson MA.** 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: a Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *J Mol Biol.* 392:498-510.5.
- Emsley, P., Cowtan, K.** 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 60:2126-32.
- 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.
- Ewen KM, Hannemann F, Iametti S, Morleo A, Bernhardt R.** 2011. Functional characterization of Fdx1: evidence for an evolutionary relationship between P450-type and ISC-type ferredoxins. *J Mol Biol.* 413940-51.
- Ewen KM, Kleser M, Bernhardt R.** 2011. Adrenodoxin: the archetype of vertebrate-type [2Fe-2S] cluster ferredoxins. *Biochim Biophys Acta.* 1814:111-25.
- Ferraro DJ, Brown EN, Yu CL, Parales RE, Gibson DT, Ramaswamy S.** 2007. Structural investigations of the ferredoxin and terminal oxygenase components of the biphenyl 2,3-dioxygenase from *Sphingobium yanoikuyae* B1. *BMC Struct Biol.* Mar 9;7:10.
- Ferraro, D. J., Brown, E. N., Yu, C. L., Parales, R. E., Gibson, D. T., Ramaswamy, S.** 2008. Structural investigations of the ferredoxin and terminal oxygenase components of the biphenyl 2,3-dioxygenase from *Sphingobium yanoikuyae* B1. *BMC Struct. Biol.* 7:10.
- 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.
- Frank Hannemann, Arnaud Guyot, Andy Zollner, Jurgen J. Muller, Udo Heinemann, Rita Bernhardt** 2009. The dipole moment of the electron carrier adrenodoxin is not critical for redox partner interaction and electron transfer *Journal of Inorganic Biochemistry* 103: 997–1004.
- Friemann R, Lee K, Brown EN, Gibson DT, Eklund H, Ramaswamy S.** 2009. Structures of the multicomponent Rieske non-heme iron toluene 2,3-dioxygenase enzyme system. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* Jan;65(Pt 1):24-33.
- 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, Yasukochi Y, Kikuchi Y, Nagata Y, Kimbara K, Horiuchi H, Takagi M, Yano K.** 1994. Identification of the bphA and bphB genes of *Pseudomonas* sp. strains KKS102 involved in degradation of biphenyl and polychlorinated biphenyls. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Jul

29;202(2):850-6.

Fukuyama, K., Hase, T., Matsumoto, S., Tsukihara, T., Katsube, Y., Tanaka, N., Kakudo, M., Wada, K., Matsubara, H. 1980. Structure of *S. platensis* [2Fe-2S] ferredoxin and evolution of chloroplast-type ferredoxins. *Nature* 286: 522-524.

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.

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.

George T. Gassner and Stephen J. Lippard. 2005. Component Interactions in the Soluble Methane Monooxygenase System from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Biochemistry.* 28:68-85.

Ghisellini P, Paternolli C, Nicolini C. 2005. Site-Directed Mutations (Asp405Ile and Glu124Ile) in **Gilson, M. K., and Honig, B.** 1991. The inclusion of electrostatic hydration energies in molecular mechanics calculations. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 5: 5-20.

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.

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.

Hagelueken G, Wiehlmann L, Adams TM, Kolmar H, Heinz DW, Tümmler B, Schubert WD. 2007. Crystal structure of the electron transfer complex rubredoxin rubredoxin reductase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:12276-81

Hagelueken, G., Adams, T. M., Wiehlmann, L., Widow, U., Kolmar, H., Tümmler, B., Heinz, D. W., Schubert, W. D. 2006. Crystal structure of the electron transfer complex rubredoxin rubredoxin reductase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:12276-81.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.

Herman PL, Behrens M, Chakraborty S, Chrastil BM, Barycki J, Weeks DP. 2005. A three-component dicamba O-demethylase from *Pseudomonas maltophilia* strain DI-6: purification and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 437: 20-8.

Hites RA, Laflamme RE, Farrington JW. 1977. Sedimentary Polycyclic Aromatic Hydrocarbons:

The Historical Record. *Science*. 1977 198:829-831.

Hooft, 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.

Huang YY, Hsu DK, Kimura T. 1983. The effect of pH on the formal reduction potential of adrenodoxin in the presence and absence of adrenodoxin reductase: the implication in the electron transfer mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 30;115(1):116-22.

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, Barriault D, Powlowski J, Sylvestre M. . 1995. Purification and characterization of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase components. 1995. *J Bacteriol.* 177:6610-8.

Ikemizu, S., Bando, M., Sato, T., Morimoto, Y., Tsukihara, T., Fukuyama, K. 1994. Structure of [2Fe-2S] ferredoxin I from *Equisetum arvense* at 1.8 Å resolution. *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50: 167-74.

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, Ashikawa Y, Umeda T, Abo M, Katsuki J, Usami Y, Noguchi H, Fujimoto Z, Terada T, Yamane H, Nojiri H. 2009. Specific Interactions between the ferredoxin and terminal oxygenase components of a class IIB Rieske nonheme iron oxygenase, carbazole 1,9a-dioxygenase. *J Mol Biol.* 392:436-51.

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.

Jacobson, B. L., Chae, Y. K., Markley, J. L., Rayment, I., Holden, H. M. 1993. Molecular structure of the oxidized, recombinant, heterocyst [2Fe-2S] ferredoxin from *Anabaena* 7120 determined to 1.7-Å resolution. *Biochemistry* 32: 6788-93.

Jakoncic J, Jouanneau Y, Meyer C, Stojanoff V. 2007. The crystal structure of the ring-hydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1. *FEBS J.* 274:2470-81.

Jelesarov I and H. R. Bosshard HR. 1994. Thermodynamics of Ferredoxin Binding to Ferredoxin:NADP⁺ Reductase and the Role of Water at the Complex Interface? *Biochemistry* 1994,

33: 13321-13328.

Johnson D, J, Shona Normana, Robert C. Tuckeyb, Lisandra L. Martina, 2002. The effect of pH on the formal reduction potential of adrenodoxin in the presence and absence of adrenodoxin reductase: the implication in the electron transfer mechanism. *Bioelectrochemistry* 59 (2003) 41–47

Jouanneau Y, Meyer C. 2006. Purification and characterization of an arene cis-dihydrodiol dehydrogenase endowed with broad substrate specificity toward polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiols. *Appl Environ Microbiol.* 72:4726-34.

Juürgen J. Müller, AA Müller, Matthias Rottmann, Rita Bernhardt and Udo Heinemann. 1999. Vertebrate-type and Plant-type Ferredoxins: Crystal Structure Comparison and Electron Transfer Pathway Modelling. *J. Mol. Biol.* (1999) 294, 501±513

Kakuta, Y., Horio, T., Takahashi, Y., Fukuyama, K. 2001. Crystal structure of *Escherichia coli* Fdx, an adrenodoxin-type ferredoxin involved in the assembly of iron-sulfur clusters. *Biochemistry.* 40: 11007-12.

Karlsson A, Beharry ZM, Matthew Eby D, Coulter ED, Neidle EL, Kurtz DM Jr, Eklund H, Ramaswamy S. 2002 X-ray crystal structure of benzoate 1,2-dioxygenase reductase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J Mol Biol.* Apr 26;318(2):261-72.

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.

Katchalski-Katzir, E., Shariv, I., Eisenstein, M., Friesem, A. A., Aflalo, C., Vakser, I. A. 1992 Molecular surface redognition: determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 2195-9.

Kauppi, B., K. Lee, E. Carredano, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund, S. Ramaswamy. 1998. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-haphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure* 6:571-586.

Khan AA, Wang R-F, Cao W-W, Franklin W, Cerniglia CE. 1996. Reclassification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Beijerinckia* sp. strain B1, as *Sphingomonas yanoikuyae* by fatty-acid analysis, protein pattern-analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S ribosomal DNA-sequencing. *Int J Sys Bacteriol* 46:466–469

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.

Kimata, Y., Hase, T. 1989. Localization of Ferredoxin Isoproteins in Mesophyll and Bundle Sheath Cells in Maize Leaf. *Plant. Physiol.* 89: 1193-1197.

Kurusu, G., M. Kusunoki, E. Katoh, T. Yamazaki, K. Teshima, Y. Onda, Y. Kimata-Arigo, and T. Hase. 2001. Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP(+)

reductase. *Nat. Struct. Biol.* 8:117-121.

Kyritsis, P., Hatzfeld, O. M., Link, T. A., Moulis, J. M. 1998. The two [4Fe-4S] clusters in *Chromatium vinosum* ferredoxin have largely different reduction potentials. Structural origin and functional consequences. *J. Biol. Chem.* 273: 15404-22

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.

Lipscomb JD, Sugar SG, MJ. Namtvedt, IRWC. Gunsalus. 1975. Autooxidation and Hydroxylation Reactions of Oxygenated Cytochrome P-450cam. *Journal of Biological Chemistry.* 251:1116-1124.

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.

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., 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.

Matthews B. W. 1968. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33:491-497.

McRee, D. E. 1999. XtalView/Xfit- a versatile program for manipulating atomic coordinate and electron density. *J. Struct. Biol.* 125:156-165.

Morales, R., M. H. Charon, G. Kachalova, L. Serre, M. Medina, C. Gomez-Moreno, and M. Frey. 2000. A redox-dependent interaction between two electron-transfer partners involved in photosynthesis. *EMBO Rep.* 1:271-276

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.

- Müller, J. J., Lapko, A., Bourenkov, G., Ruckpaul, K., Heinemann, U.** 2001. Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 276: 2786-9.
- 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, Ashikawa Y, Noguchi H, Nam JW, Urata M, Fujimoto Z, Uchimura H, Terada T, Nakamura S, Shimizu K, Yoshida T, Habe H, Omori T.** 2005. Structure of the terminal oxygenase component of angular dioxygenase, carbazole 1,9a-dioxygenase. *J Mol Biol.* 351:355-70.
- Nojiri, H. & Omori, T.** 2007 *Pseudomonas* volume 5. *A Model System in Biology*, edited by Ramos, J. L. & Filloux, A. pp. 107-145. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, N. Y., USA.
- 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., 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., T. Omori.** 2002. Molecular bases of aerobic bacterial degradation of dioxins: involvement of angular dioxygenation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:2001-2016.
- 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.
- Parales RE, Lee K, Resnick SM, Jiang H, Lessner DJ, Gibson DT.** 2000. Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: effect of specific amino acids at the active site of the enzyme. *J Bacteriol.* 182:1641-9.
- Parales, R. E. and Haddock J. D.** 2004. Biocatalytic degradation of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 374-9.
- 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.

- Pelletier, H., and J. Kraut.** 1992. Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome c peroxidase and cytochrome c. *Science* 258:1748-1755.
- 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.
- 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 2Fe2S centers of the 2-halobenzoate 1,2-dioxygenase from Burkholderia (*Pseudomonas*) cepacia 2CBS. *J. Biol. Chem.* 270:30869-30873.
- 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.
- Rypniewski, W. R., Breiter, D. R., Benning, M. M., Wesenberg, G., Oh, B. H., Markley, J. L., Rayment, I., Holden, H. M.** 1991. Crystallization and structure determination to 2.5-Å resolution of the oxidized [2Fe-2S] ferredoxin isolated from *Anabaena* 7120. *Biochemistry.* 30: 4126-31.
- Sainz, G., Jakoncic, J., Sieker, L. C., Stojanoff, V., Sanishvili, N., Asso, M., Bertrand, P., Armengaud, J., Jouanneau, Y.** 2006 Structure of a [2Fe-2S] ferredoxin from *Rhodobacter capsulatus* likely involved in Fe-S cluster biogenesis and conformational changes observed upon reduction. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11:235-46.
- Sambrook, J., D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 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.
- Senda M, Kishigami S, Kimura S, Fukuda M, Ishida T, Senda T.** 2007. Molecular mechanism of the redox-dependent interaction between NADH-dependent ferredoxin reductase and Rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin. *J Mol Biol.* 373:382-400.
- Senda M, Kishigami S, Kimura S, Senda T.** 2007. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the electron-transfer complex of Rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin and NADH-dependent ferredoxin reductase derived from *Acidovorax* sp. strain KKS102. *Acta. Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*
- Senda, T., Yamada, N., Sakurai, T., Kubota, M., Nishizaki, T., Masai, E., Fukuda, M., Mistui, Y.** 2000. Crystal structure of NADH-dependent ferredoxin reductase component in biphenyl

dioxygenase. *J. Mol. Biol.* 304:397-410.

Sevrioukova IF, Garcia C, Li H, Bhaskar B, Poulos TL. 2003. Crystal structure of putidaredoxin, the [2Fe-2S] component of the P450cam monooxygenase system from *Pseudomonas putida*. *J Mol Biol.* 333:377-92.

Sevrioukova IF, Poulos TL, Churbanova IY. 2010. Crystal structure of the putidaredoxin reductase x putidaredoxin electron transfer complex. *J Biol Chem.* 285:13616-20.

Sevrioukova, I. F. 2005. Redox-dependent structural reorganization in putidaredoxin, a vertebrate-type [2Fe-2S] ferredoxin from *Pseudomonas putida*. *J. Mol. Biol.* 347: 607-21.

Sevrioukova, I. F., Li, H., Poulos, T.L. 2004. Crystal structure of putidaredoxin reductase from *Pseudomonas putida*, the final structural component of the cytochrome P450cam monooxygenase. *J. Mol. Biol.* 336: 889-902.

Shindyalov IN, Bourne PE. 1998. Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path. *Protein Eng.* 11:739-47.

Shintani, M., M. Urata, K. Inoue, K. Eto, H. Habe, T. Omori, H. Yamane, H. Nojiri. (2006) The *Sphingomonas* plasmid pCAR3 is involved in complete mineralization of carbazole. *J. Bacteriol.* 189: 2007-20.

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.

Sligar SG, P. G. Debrunner, J. D. Lipscomb, M. J. Namtvedt, AND I. C. Gunsalus. 1974. A Role of the Putidaredoxim COOH-terminus in P-450am (Cytochrome m*) Hydroxylations (monooxygenase activity/protein cytochrome P-450). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71:3906-3910.

Smith, N., Mayhew, M., Holden, M. J., Kelly, H., Robinson, H., Heroux, A., Vilker, V. L., Gallagher, D. T. 2004. Structure of C73G putidaredoxin from *Pseudomonas putida*. *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60: 816-22.

Sticht, H. and Rosch, P. 1998. The structure of iron-sulfur proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 70: 95-136.

Strushkevich N, MacKenzie F, Cherkesova T, Grabovec I, Usanov S, Park HW. 2011. Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:10139-43.

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.

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.

Thomas, A., OM Hatzfeld, P Unalkat, JK Shergill. 1996. Comparison of the "Rieske"[2Fe-2S] center in the bc 1 complex and in bacterial dioxygenases by circular dichroism spectroscopy and cyclic voltammetry. *Biochemistry.* 35:7546-7552

Tsuda H, Hagiwara A, Shibata M, Ohshima M, Ito N. 1982 Carcinogenic effect of carbazole in the liver of (C57BL/6N x C3H/HeN)F1 mice. *J Natl Cancer Inst.* 69:1383-9.

Tsukihara, T., Fukuyama, K., Mizushima, M., Harioka, T., Kusunoki, M., Katsube, Y., Hase, T., Matsubara, H. 1990. Structure of the [2Fe-2S] ferredoxin I from the blue-green alga *Aphanothece sacrum* at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 216: 399-410.

Tsukihara, T., Fukuyama, K., Tahara, H., Katsube, Y., Matsuura, Y., Tanaka, N., Kakudo, M., Wada, K., Matsubara, H. 1978. X-ray analysis of ferredoxin from *Spirulina platensis*. II. Chelate structure of active center. *J. Biochem.* 84: 1645-7.

Uhlmann H, Bernhardt R. 1995. The role of threonine 54 in adrenodoxin for the properties of its iron-sulfur cluster and its electron transfer function. *J Biol Chem.* 270:29959-66.

Umeda, T., Katsuki, J., Usami, Y., Inoue, K., Noguchi, H., Fujimoto, Z., Ashikawa, Y., Yamane, H., Nojiri, H. 2008 Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a novel ferredoxin involved in the dioxygenation of carbazole by *Novosphingobium* sp. KA1. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commn.* 64: 632-5.

Urata M, Uchimura H, Noguchi H, Sakaguchi T, Takemura T, Eto K, Habe H, Omori T, Yamane H, Nojiri H. 2006. Plasmid pCAR3 contains multiple gene sets involved in the conversion of carbazole to anthranilate. *Appl Environ Microbiol.* 72:3198-205.

Vagin A, Teplyakov A. 2000. An approach to multi-copy search in molecular replacement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 56:1622-4.

Weber-Main A. M., Hurley, J. K., Cheng, H., Xia, B., Chae, Y. K., Markley, J. L., Martinez-Júlvez, M., Gomez-Moreno, C., Stankovich, M. T, Tollin, G. 1998. An electrochemical, kinetic, and spectroscopic characterization of [2Fe-2S] vegetative and heterocyst ferredoxins from *Anabaena* 7120 with mutations in the cluster binding loop. *Arch Biochem Biophys.*; 355: 181-8.

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.

Wolfe, M. D., J. V. Parales, D. T. Gibson, J. D. Lipscomb. 2001. Single turnover chemistry and regulation of O₂ activation by the oxygenase component of naphthalene 1,2-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 276:1945-1953.

Yanbing Zu, Manon M.-J. Couture, Derrick R. J. Kolling, Antony R. Crofts| Lindsay D. Eltis, James A. Fee and Judy Hirst, 2003.Reduction Potentials of Rieske Clusters: Importance of the Coupling between Oxidation State and Histidine Protonation State *Biochemistry* 42: 12400-12408

芦川雄二, 平成 17 年度, 東京大学博士論文

井上謙吾, 平成 18 年度, 東京大学博士論文

香月隼一, 平成 19 年度, 東京大学修士論文

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

本博士論文研究は、多くの方々からの御指導、御協力の元で遂行されました。ここに深甚なる謝意を表します。

素晴らしい研究の場を与えて下さると共に、懇切丁寧なる御指導御鞭撻、格別の御厚情を賜りました、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 山根久和先生に深謝致します。

本研究を行うにあたり、直接御指導頂き、厳しくも懇篤なる御指導により本研究の遂行に多大な御尽力頂き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准教授 野尻秀昭先生に心より万謝致します。

研究生生活全般に渡り御厚志を賜り、研究に関する数々の正鵠を射た御助言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 岡田憲典先生に深く感謝致します。

Photon Factory において、X線結晶構造解析を行うにあたり、解析の御指導と有益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農業生物先端ゲノム研究センター生体分子研究ユニット主任研究員 藤本瑞博士に感謝致します。

タンパク質のドッキングシミュレーションを行うにあたり、解析手法の御指導と御協力を頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科アグリバイオインフォマティクス教育研究ユニット特任准教授 寺田透先生に感謝致します。

タンパク質の酸化還元電位の測定を行うにあたり、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 安補充先生に感謝致します。

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宇佐美裕亮博士、井上謙吾博士、芦川雄二博士、野口治子博士、香月隼一氏、相川大樹氏、島倉智行氏、松澤淳氏に深く感謝致します。

日夜、研究についての忌憚りの無い議論を交わし、また、日常生活においても格別な御厚誼を賜り、配属時からの研究生生活を絶えず実りあるものにして頂きました、同期である岩田修氏、高橋裕里香氏、宮本皓司氏を始めとする環境保全工学研究室の方々、及び卒業生の皆様に万謝致します。

最後に、常に暖かく見守り、励ましてくれた両親、家族、故 唐戸伊三男氏、唐戸征子氏にこの論文を捧げます。

2012年 2月