

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20248010

研究課題名（和文）芳香環二原子酸素添加酵素における電子伝達コンポーネント選択性の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Molecular bases of electron transport component selectivity in aromatic ring-hydroxylating dioxygenase system

研究代表者

野尻 秀昭 (Nojiri Hideaki)

東京大学・生物生産工学研究センター・准教授

研究者番号：90272468

研究成果の概要（和文）：

カルバゾール二水酸化酵素の還元型フェレドキシン単体と、酸化型フェレドキシン：還元型酸化酵素複合体の結晶構造を解明した。それらの比較から、酸化酵素の R118, R210 とフェレドキシンの E43, E55 の各々の間の塩橋・水素結合の酸化酵素の還元に伴う切断が検出された。アラニン置換体を用いた解析の結果、二つのアミノ酸は協調して機能すること、疎水相互作用を駆動力とする結合が周囲の塩橋・水素結合により安定化されていることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Crystal structures of reduced form of ferredoxin component (Fd) and complex form of oxidized Fd and reduced oxygenase (Oxy) of carbazole 1,9a-dioxygenase were solved. Cleavages of salt-bridge between Oxy R118 and Fd E43 and hydrogen-bonding between Oxy R210 and Fd E55 were detected along with the reduction of Oxy. Alanine replacement analyses revealed these bindings are cooperatively enhanced the binding between Oxy and Fd. Isothermal titration calorimetry analyses also revealed that the binding through hydrophobic interaction between the components were stabilized by surrounding salt-bridge and hydrogen-bonding.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	26,900,000	8,070,000	34,970,000
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
年度			
総計	37,500,000	11,250,000	48,750,000

研究分野：環境微生物学

科研費の分科・細目：農芸科学・応用微生物学

キーワード：芳香族化合物、オキシゲナーゼ、電子伝達、タンパク質間相互作用、結晶構造、結合定数、biodegradation、細菌

## 1. 研究開始当初の背景

芳香環に二つの隣接した *cis* 型水酸基を添加する反応は細菌の芳香族分解系によく見られ、酸化酵素 (TO) と電子伝達系 (多くの場合はフェレドキシン[Fd]とフェレドキシン

還元酵素[Red]) から構成される Rieske non-heme iron oxygenase system (RO) により触媒される。国内外の多くの研究者により TO 内のサブユニット間電子伝達機構、Red-Fd 間のコンポーネント間電子伝達機構

については詳細な機構が明らかにされつつある一方、Fd-TO 間の相互作用については極めて情報が少ない。多くの RO で、Fd-TO 間の電子伝達特異性が RO 全体の還元力伝達の成否（言い換えれば、反応性の有無）を決定することが知られているものの、解明が進んでいない研究分野と言える。数少ない情報としては、研究代表者らによる *Pseudomonas* 属/*Janthinobacterium* 属細菌由来含窒素芳香族化合物カルバゾール分解系の carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) (図 1 参照) における TO (CARDO-O) と Fd (CARDO-F) の複合体構造の解析がある (Ashikawa *et al.*, *Structure*, **14**, 1779-1789, 2006)。これにより、両コンポーネント間の結合位置が同定され電子伝達様式が明らかになったが、両者の結合・解離の ON/OFF を制御する機構は全く未解明であった。

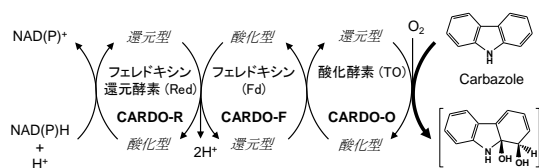


図 1. CARDO が触媒する反応

## 2. 研究の目的

Fd は Red と TO の間をシャトルの様に行き来して電子を伝達する (図 1) と考えられ、Fd から TO への電子伝達は図 2 のようにまとめることができる。

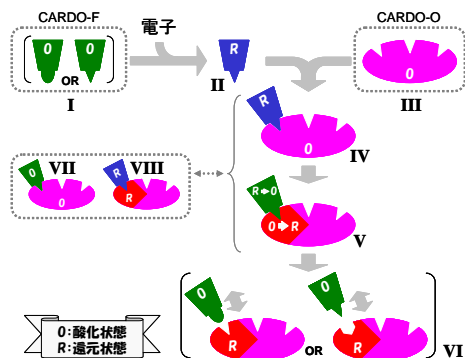


図 2. Fd (CARDO-F) から TO (CARDO-O) への電子伝達と構造解析の進捗状況

まず、酸化型の Fd (I) が Red により還元されて還元型 Fd (II) となる。これが三量体 TO (III) の一つの結合サイトに結合する (IV)。複合体中で電子が伝達されて Fd が酸化型、TO が還元型になると (V)、Fd、TO、あるいはその両方の結合面で構造的変化が起こり、結合力が低下して解離する (VI)。すなわち、酸化還元状態依存的に Fd-TO 結合面近辺で構造的な変化が生じ、結合定数 (結合しやす

さ) が変化すると予想できる。酸化還元状態の変化によって CARDO-F の構造が変化すると仮定すると、還元されて構造が変化した CARDO-F は酸化型の CARDO-O に結合することができ、電子を渡して CARDO-O が還元型に変わり CARDO-F が酸化型に戻ると構造が変化して複合体が離れることになる。あるいは、CARDO-F の酸化還元状態による構造変化が少ないとすれば、結合後電子の授受が終わると CARDO-O の構造が変化して複合体が解消される。もちろん、両方の現象が同時に起こる可能性もある。

本研究では、

- (1) 酸化状態で作製した結晶の還元試薬による還元 (従来法) に加え、嫌気条件下での CARDO-O 単独と CARDO-F 単独の結晶構造解析に加えて、酸化状態の CARDO-F と還元状態の CARDO-O の複合体結晶の作製と構造解析を試み、反応サイクル中で存在する状態の正確な構造を理解する。
- (2) 還元型 CARDO-F と酸化型 CARDO-O の結合力を正確に測定 (定量) し、解離する状態 (酸化型 CARDO-F と還元型 CARDO-O) の場合と比較する、の二つの目標を設定した。

## 3. 研究の方法

- (1) 「CARDO-F と CARDO-O 間の電子伝達中間体の X 線結晶構造解析」
  - ① 酸化状態の結晶の還元による還元型結晶の作製と構造解析: 酸化状態での構造解析については、CARDO-F, CARDO-O とも以前の研究 (Nojiri *et al.*, *Journal of Molecular Biology*, **351**, 355-370, 2005; Nam *et al.*, *Proteins*, **58**, 779-789, 2005) で報告済みであり、既に高分解能を示す結晶の作成条件が決定されている。還元剤を用いてこれらの結晶を還元することで、還元型結晶の作製を試み、還元状態での構造解析を試みる。
  - ② 還元 (嫌気) 状態での結晶化と構造解析: 好気条件下で調製した CARDO-O, CARDO-F の溶液を嫌気チャンバー内に持ち込み、結晶化から嫌気条件下で行う。市販のスクリーニングキットにて結晶化条件の検討を行った後、得られた結晶についてクライオ条件の検討、additive の検討を行う。得られた最適化結晶の X 線結晶構造解析を行い、立体構造を明らかにする。
  - ③ CARDO-F:CARDO-O 複合体結晶の取得と構造解析: 酸化型 CARDO-F と還元型 CARDO-O を混合したものをを用いて、結晶化条件のスクリーニングを嫌気条件下で行う。結晶の作製に成功した場合は、上記②の方法に準じて X 線結晶構造解析に供し、CARDO-F:CARDO-O 複合体の立体構造を解明する。

- (2) 「CARDO-F と CARDO-O 間の結合親和性の生化学的解析」
- ① 基質酸化活性・吸光度変化測定による結合親和性の解析： 上記(1)の解析にて判明した CARDO-O と CARDO-F の結合解離に重要と考えられるアミノ酸残基へのアラニン置換体を作成するとともに、再構成系によるカルバゾール酸化活性、酸化還元状態の変化に伴う吸光度変化の測定を行うことで、コンポーネント間の親和性を測定する。
  - ② Isothermal titration calorimetry (ITC) による結合親和性比較： ITC により上記アミノ酸置換体と野生型酵素間の結合親和性を評価する。

#### 4. 研究成果

- (1) 「CARDO-F と CARDO-O 間の電子伝達中間体の X 線結晶構造解析」
  - ① 酸化状態の結晶の還元による還元型結晶の作製と構造解析： 酸化状態の CARDO-O, CARDO-F の結晶の還元処理を試みたが、試した全ての条件で結晶が溶解してしまい構造解析可能な結晶を得るには至らなかった。
  - ② 還元 (嫌気) 状態での結晶化と構造解析： 結晶化に先立ち、CARDO-O, CARDO-F 溶液は嫌気条件下ですぐにアグリーゲーションを起こすことが判明したため、嫌気条件と溶解するバッファー条件を検討して、タンパク質溶液が安定な条件を決定した。具体的には、嫌気条件を実現するための嫌気チャンバー中のガスに含まれていた二酸化炭素 (10%) を抜き、窒素 95% 水素 5% の嫌気ガスを用いた。さらに、溶解させるバッファーとして、還元処理前 (酸化条件) のタンパク質溶液には 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) を、還元処理後の溶液には 5 mM Tris-HCl (pH 7.5) を用いた。

反応サイクル中で起こりうる構造の中で構造解析が成功していなかった還元型 CARDO-O と還元型 CARDO-F のうち、0.2 M ammonium acetate、0.1 M sodium acetate trihydrate pH 4.1、30% w/v polyethylene glycol 4,000 の条件下で結晶が得られた還元型 CARDO-F について分解能 1.4 Å で結晶構造の取得に成功した。得られた還元型の構造を、既に報告済みの酸化型の Fd の構造 (Nam *et al.*, *Proteins*, **58**, 779-789, 2005) と比較したところ大きな構造変化は検出できず、CARDO-F 単体では酸化還元状態の変化で大きな構造変化は起こらないことが示さ

れた。

- ③ CARDO-F: CARDO-O 複合体結晶の取得と構造解析： 嫌気条件下において還元状態の CARDO-O と酸化状態の CARDO-F を混合して結晶化条件のスクリーニングを行い、0.1 M sodium cacodylate trihydrate (pH 5.7)、14% (w/v) polyethylene glycol monomethyl ether 3,350 の条件で複合体結晶の生成に成功した。顕微分光解析の結果、複合体中の CARDO-O は還元型、CARDO-F は酸化型であることも確認した (図 3)。

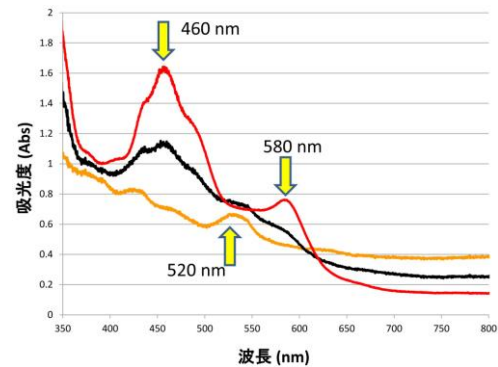


図 3. 複合体結晶の紫外可視吸光スペクトル (黒)。還元型 CARDO-O (赤)、酸化型 CARDO-F (橙) と共に示す。

この結晶を用いて X 線回折データの取得を試みたところ、分解能 2.2 Å で構造データを取得することに成功した。また、得られた結晶をカルバゾール溶液に浸漬することで、カルバゾールとの複合体の基質結合構造も分解能 3.0 Å で取得することができた。得られた構造は CARDO-F から CARDO-O への電子伝達直後の構造と考えられる。以前に得られていた電子伝達前の構造と類似と考えられる構造

(CARDO-O の酸化還元中心が酸化された酸化型複合体構造, 図 2 VII, Ashikawa *et al.*, *Structure*, **14**, 1779-1789, 2006) との比較から、CARDO-O 側の二つのアルギニン (Arg118, Arg210) と CARDO-F 側の二つのグルタミン酸 (Glu43, Glu55) のそれぞれの間で形成される塩橋・水素結合が、CARDO-O の還元に伴うアルギニン残基の側鎖のフリップによって切れることが明らかになった (図 4)。上記②で明らかにした CARDO-F 単体の還元型結晶構造と酸化型 CARDO-F 単体構造

(Nam *et al.*, *Proteins*, **58**, 779-789, 2005) の比較で、明確な構造変化が観察されなかった結果と合わせ、これらは酸化還元状態の変化によって結合乖離が引き起こされる際には、CARDO-O 側の構造要因が大きい可能性を示唆するものと言える。



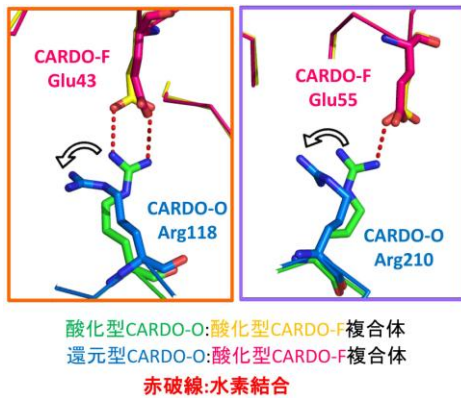


図4. 複合体結合面で見出された還元状態のCARDO-O 特異的な構造変化

また、 $\alpha_3$ 型のホモ三量体構造を取る複合体結晶構造中のCARDO-Oの三つの活性中心(二カ所にカルバゾールを含む)のうち、カルバゾールを結合しかつCARDO-Fを結合した状態のものと結合していない状態のものとの比較から、CARDO-Fがない場合に特異的に基質ポケット入口が閉じる構造変化が観察された。この構造変化は、反応過程で基質をトラップするために重要と予想されるため、実際の反応サイクルでは電子の授受後にCARDO-Fが乖離してから基質が結合するケースが多いことが示唆された。

(2) 「CARDO-F と CARDO-O 間の結合親和性の生化学的解析」

- ① 基質酸化活性・吸光度変化測定による結合親和性の解析: Oxy の二つのアルギニン残基に対してアラニン置換を導入し、再構成系での基質酸化活性、吸光度解析による電子伝達活性に対するアミノ酸置換の効果を評価した。表1に示すように、いずれの活性測定系を用いた場合も R210A、R118A、二重置換体の順で活性が低下し、単一のアミノ酸の寄与としては Alg118 の方が大きいこと、二つのアミノ酸は協調して機能することが示唆された。

表1. CARDO-O アミノ酸置換体の活性

CARDO-O	WT	R118A	R210A	R118A/R210A
カルバゾール変換活性 (%)	100±4.6	22±14	52±6.5	11±7.2
電子伝達活性 (%)	100±0.84	89±1.0	95±4.2	44±2.8

- ② ITC による結合親和性比較: ITC による結合活性の評価の結果、二重置換体と R118A 置換体では発生する熱量が大きく減少して結合自体が起きにくくなっていること (ITC による測定自体が困難であること) が示され、R210A 置換体でも結合定数は変化しないものの複合

体形成時の結合比が5割程度に減少していた (表2)。これらの結果は、両コンポーネントの結合は疎水相互作用を駆動力として起こるが、周囲の塩橋・水素結合が複合体を安定化することで、効率的な電子伝達を実現していることを示していた。

表2. CARDO-O アミノ酸置換体の ITC による結合活性の解析

CARDO-O CARDO-F	WT	R118A WT	R210A WT	R118A/R210A WT
K (結合定数) / $10^3$ (M <sup>-1</sup> )	4.5±1.1	ND	4.2±1.4	Not detected (ND)
$\Delta H$ / $10^3$ (cal/mol)	4.5±0.3	ND	6.5±2.7	ND
$\Delta S$ / (cal mol/deg)	31.4±1.4	ND	38.1±9.5	ND
n (結合比)	1.10±0.02	ND	0.59±0.13	ND

(3)まとめと展望

本研究により、従来ブラックボックスとされてきた RO のコンポーネント間電子伝達メカニズムがほぼ明らかにされた。研究立案から5年が経とうとする現在でも、RO の反応の鍵を握るとも言える Fd-Oxy 間の電子の授受メカニズムは CARDO 以外に解析が成功しておらず、本研究の成果は RO 研究における重要な一歩を記したものと考えられる。現在、嫌気条件下に設置した ITC を用いて、酸化型/還元型 CARDO-O と、酸化型/還元型 CARDO-F の間の結合親和性の定量比較を行っており、これらのデータと合わせることで、より正確な議論が可能になるものと期待される。

ところで、本研究は 500 を越える報告がある RO の中で、CARDO のみを用いてなされた成果である。CARDO-O は  $\alpha_3$  型の構造を取る一方で、RO の Oxy の大半は  $\alpha_3\beta_3$  型のヘテロ六量体構造を取ることも事実である。また、RO の Fd には多様性があり、実際、由来が異なる種々の CARDO の中には、今回用いた Rieske 型フェレドキシンではなく、プチダレドキシン型の Fd を持つものも知られている。今後は、今回明らかになった知見がどの程度一般性を持つかの検証を含めて、電子伝達における RO のコンポーネント間相互認識の一般性・特殊性を明らかにしていくことが重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Y. Ashikawa, H. Nojiri ら (7名中7番目), Structural insight into the substrate- and dioxygen-binding manner in the catalytic cycle of Rieske nonheme iron oxygenase system, carbazole

- 1,9a-dioxygenase, *BMC Structural Biology*, **12**, 15 (2012). (査読有)
- ② H. Nojiri, Structural and molecular genetic analyses of the bacterial carbazole degradation system, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **76**, 1-18 (2012). (査読有)
- ③ T. Umeda, H. Nojiri ら (9名中9番目), Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a ferredoxin reductase component of carbazole 1,9a-dioxygenase from *Novosphingobium* sp. KA1, *Acta Crystallographica Section F*, **F66**, 712-714 (2010). (査読有)
- ④ T. Umeda, H. Nojiri ら (9名中9番目), Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a terminal oxygenase of carbazole 1,9a-dioxygenase from *Novosphingobium* sp. KA1, *Acta Crystallographica Section F*, **F66**, 1480-1483 (2010). (査読有)
- ⑤ K. Inoue, H. Nojiri ら (11名中11番目), Specific interactions between the ferredoxin and terminal oxygenase components of a class IIB Rieske nonheme iron oxygenase, carbazole 1,9a-dioxygenase, *Journal of Molecular Biology*, **392**, 436-451 (2009). (査読有)

[学会発表] (計 18 件)

- ① 松澤、野尻 ら 7 名、含窒素芳香族化合物初発酸化酵素 carbazole 1,9a-dioxygenase における酸化酵素-ferredoxin 間の結合解離メカニズムの解明、環境バイオテクノロジー学会 2012 年度大会、2012 年 6 月 25 日、京都
- ② H. Nojiri, Structure and function of bacterial aromatic hydroxylating dioxygenase system, 日中バイオテクノロジー国際シンポジウム 2012 - バイオテクノロジーと農業・環境 -, 2012 年 5 月 13 日、東京
- ③ 松澤、野尻 ら 6 名、クラス III 型 carbazole 1,9a-dioxygenase における ferredoxin-terminal oxygenase 間の結合解離メカニズムの解明、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 24 日、京都
- ④ 梅田、野尻 ら 4 名、

- Novosphingobium* sp. KA1 株由来フェレドキシンが高い酸化還元電位を持つ原因の解明、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 24 日、京都
- ⑤ 島倉、野尻 ら 4 名、*Novosphingobium* 属細菌由来クラス IIA 型 carbazole 二水酸化酵素における電子伝達複合体形成に関わるアミノ酸残基の同定、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 26 日、京都
- ⑥ 梅田、野尻 ら 8 名、芳香環二水酸化酵素のコンポーネント間電子伝達の分子機構、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 26 日、京都
- ⑦ 松澤、野尻 ら 8 名、クラス III 型 carbazole 1,9a-dioxygenase における酸化酵素-ferredoxin 間の結合乖離メカニズムの解明、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 26 日、京都
- ⑧ T. Umeda, H. Nojiri ら 7 名、Electron transfer mechanism of carbazole 1,9a-dioxygenases, International Biotechnology Conferences and Exhibition 2010, 2010 年 9 月 6 日、リミニ(イタリア)
- ⑨ H. Nojiri, Structure and function of aromatic-hydroxylating dioxygenase system, JSPS-SLU Workshop Microbes at Work, 2010 年 6 月 22 日、ウプサラ (スウェーデン)
- ⑩ 相川、野尻 ら 7 名、酸化還元状態の制御による芳香環水酸化酵素の結晶化と構造解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 28 日、東京
- ⑪ 梅田、野尻 ら 9 名、芳香環二水酸化酵素におけるコンポーネント間電子伝達の可否を決定づける要因、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 28 日、東京
- ⑫ 島倉、野尻 ら 5 名、Carbazole 二水酸化酵素の電子伝達複合体形成に関わるアミノ酸残基の同定、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 28 日、東京
- ⑬ 梅田、野尻 ら 11 名、芳香環二水酸化酵素におけるコンポーネント間電子伝達の可否を決定づける要因、極限環境微生物学会 2009 年度大会、2009 年 10 月 29 日、東京
- ⑭ T. Umeda, H. Nojiri ら合計 10 名、Structural basis of electron transfer in aromatic ring-hydroxylating Rieske nonheme iron oxygenases, *Pseudomonas* 2009, 2009 年 8 月 14 日、

- ハノーバー（ドイツ）
- ⑮ 芦川、野尻ら 8 名、芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの電子伝達コンポーネント(ferredoxin reductase)の X 線結晶構造解析、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 27 日～29 日、福岡
  - ⑯ 梅田、野尻ら 10 名、*Novosphingobium* sp. KA1 株由来芳香環水酸化酵素に含まれる特異的フェレドキシンの機能の構造生物学的解析、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 27 日～29 日、福岡
  - ⑰ 相川、野尻ら 7 名、酸化還元状態の制御による芳香環水酸化酵素の安定化と結晶化、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 27 日～29 日、福岡
  - ⑱ 芦川、野尻ら 8 名、芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの電子伝達コンポーネント(ferredoxin reductase)の X 線結晶構造解析、日本生物物理学会 2008 年度大会、2008 年 12 月 3 日～5 日、福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野尻 秀昭 (NOJIRI HIDEAKI)

東京大学・生物生産工学研究センター・准教授

研究者番号：90272468