

芳香族化合物初発酸化酵素の電子伝達様式と反応サイクルの構造基盤

野尻 秀昭

東京大学 生物生産工学研究センター

研究成果

含窒素芳香族化合物カルバゾール(CAR)の初発酸化酵素 CAR 1,9a-dioxygenase (CARDO)の反応サイクルにおいて、構造が未解明だった還元型 ferredoxin コンポーネント(Fd_{red})、CAR 結合状態の還元型 oxygenase コンポーネント($Oxy_{red/red}$)、CAR と酸素原子、あるいは反応産物が結合した酸化型 Oxy ($Oxy_{ox/ox}$)の構造を解明し、Fd 結合・乖離、Oxy 還元、基質結合・変換の機構を明らかにした。また、 $\alpha_3\beta_3$ 型の Oxy の Fd 結合位置が CARDO の Oxy とは異なり、分子側面である可能生が示唆された。

研究の目的

以前の研究で、 $Oxy_{ox/red}$ (図 1 の I、以下同様)¹⁾、酸化型 Fd (Fd_{ox}) (II)²⁾、 $Oxy_{ox/red}:Fd_{ox}$ 複合体(III)³⁾の構造を決定し、基本的な構造の特徴や Fd と Oxy の結合の構造基盤を明らかにしてきたが、電子伝達と反応の進行に関する構造情報は皆無であった。

最近 $Oxy_{red/red}:Fd_{ox}$ 複合体(IV)と $Oxy_{red/red}$ (V) の構造解析に成功したのに続いて (Matsuzawa ら, 論文作成中)、本研究では Fd_{red} (VI)の構造を明らかにすることで、一度目の Fd の結合解離による Oxy 還元の機構の解明を行った。また、V の結晶を用いて基質・酸素・反応産物の結合状態の構造 (VII, VIII, IX) を解析した。なお、類似酵素の Oxy の多くは CARDO の場合 (α_3 型)と異なり $\alpha_3\beta_3$ 型の 4 次構造を持つ。本研究では CARDO での Fd 結合位置が $\alpha_3\beta_3$ 型 Oxy でも共通かを調べた。

方法

還元型 Fd を嫌気環境下で結晶化し、X 線回折データから Fd_{ox} の構造をモデルに最終構造を得た。VII の構造解析には V の結晶を CAR 溶液に浸漬した結晶を、VIII と IX の構造解析には CAR 溶液浸漬後に純酸素にさらした結晶を用いて、上記と同様に構造解析を行った。 $\alpha_3\beta_3$ 型 Oxy として cumene 2,3-dioxygenase (CDO)⁴⁾の Oxy と Fd を用い、両者の結合領域と推定された部位に Ala 置換を導入して、CDO 再構成系での Fd による Oxy の還元速度を指標に Fd 結合能を評価した。

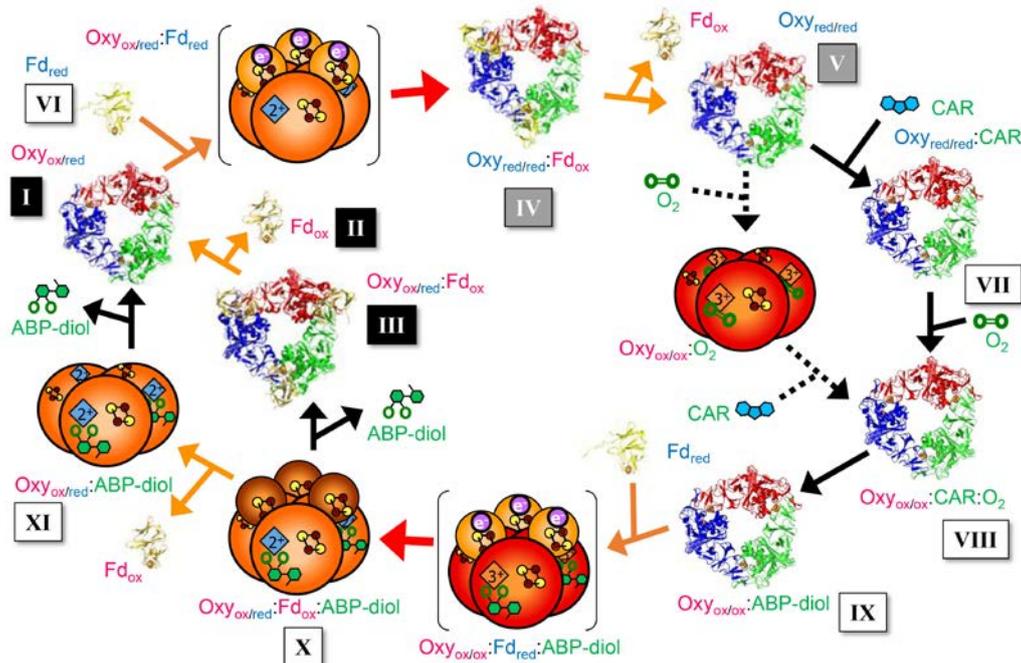


図 1. CARDO の Oxy の反応サイクル

Oxy の場合は鉄硫黄クラスター/活性中心鉄の、Fd の場合は鉄硫黄クラスターの酸化還元状態を下付の ox (酸化)、red (還元) で示している。

結果

Fd_{red} (VI)の構造を 1.8 Å で決定した。構造解析が困難な I の後の括弧内の Oxy の構造を酸化還元状態が同じ III の Oxy 部分で代用し、I と VI の結合から V に至る構造変化を解析した。検出された構造変化の中で、特に Oxy の Arg118 の側鎖の動き(図 2A)は重要である。Arg118 の側鎖は Fd との結合に伴って Fd の Glu43 の側鎖と塩橋を形成する (図 2A 左)。電子伝達後に塩橋は切れ、Arg118 側鎖は Oxy 内で水素結合を形成し固定され(図 2A 中央)、Fd が乖離してもこの水素結合は維持される (図 2A 右)。類似の動きは Oxy の Arg210 でも認められ、これらが Fd と Oxy の結合・乖離のスイッチと考えられた。また、CAR が V に結合した構造 (VII)を 2.2 Å の分解能で決定した。また、CAR 結合後に純酸素に晒した Oxy 結晶の構造を分解能 2.2 Å で決定したが、この構造中では 3 つの活性中心のうち、1 つは CAR と酸素の結合構造 (VIII)、2 つは反応産物 (図 1 中の ABP-diol) 結合構造 (IX) であった。構造 IX では二つの芳香環がねじれの位置にあり酸素の電子密度は周囲と一体化していた (図 2B)。V, VII, VIII の活性中心周辺構造から、CAR の結合に伴い活性中心に配位した水は失われ、このスペースに酸素が結合していた (図 2C)。

一方、 $\alpha_3\beta_3$ 型の特徴である CDO のマッシュルーム様分子で Fd 結合領域と推定された分子上部 (CARDO での Fd 結合部位に相当) と側面 ($\alpha\beta$ 結合領域) の二つの領域を構成するアミノ酸のうち、上部に位置する α subunit の Asp158, Trp159, Glu180, Arg407、側面に位置する α subunit の Lys117, Lys141 と β subunit の Arg65, Leu98, Trp100

に Ala 置換を行った。Fd からの電子受容活性を調べた結果、 α subunit の Lys117Ala 置換体で 20%以下、 β subunit の Arg65Ala 置換体で 40~60%程度に活性が低下し、側面が Fd との結合部位である可能性が高まった。

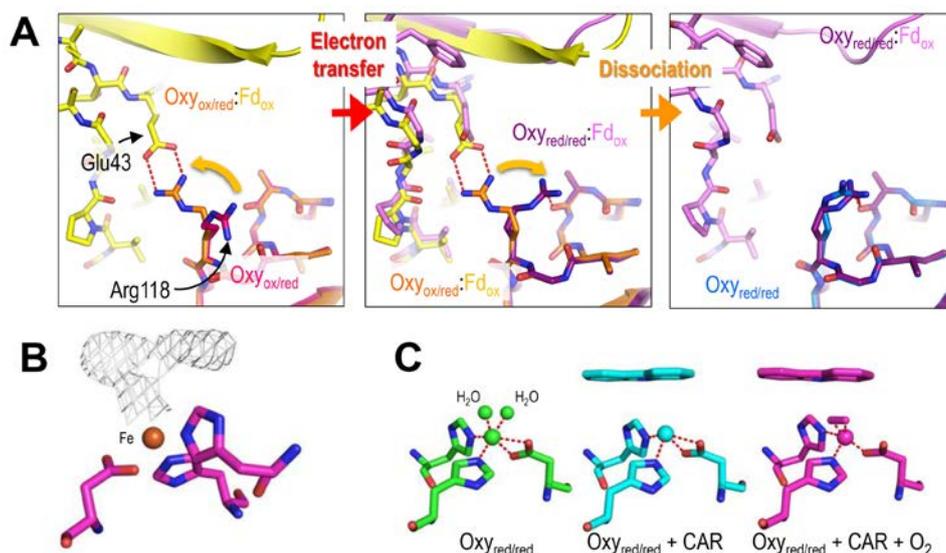


図 2. Fd 結合乖離(A)や基質結合と産物生成(BC)に特異的な構造変化

結論

本研究の成果により、図 1 の反応サイクル中での I から IX までの変化がどのように起こるのか、構造を基盤として議論が可能になった。今後、(1) IX の状態の Oxy と還元型 Fd の複合体結晶 (X) を得て X 線結晶構造解析を行う、(2) I と III の結晶に反応産物をソーキングすることで X, XI の状態の結晶を得て構造解析を行う、という二つの課題を解決し、反応サイクル全体の解明を達成したい。また、 $\alpha_3\beta_3$ 型での Fd 結合について、今後のさらなる生化学的解析や構造解析の基礎となる重要な知見を得ることができた。

参考文献

- 1) Nojiri, H. *et al.*, (2005) Structure of the terminal oxygenase component of angular dioxygenase, carbazole 1,9a-dioxygenase. *J. Mol. Biol.* **351**:355-370.
- 2) Nam, J.-W. *et al.*, (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* **58**:779-789.
- 3) Ashikawa *et al.*, (2006) Electron transfer complex formation between oxygenase and ferredoxin components in Rieske nonheme iron oxygenase system. *Structure* **14**, 1779-1789.
- 4) Dong, X. *et al.* (2005) Crystal structure of the terminal oxygenase component of cumene dioxygenase from *Pseudomonas fluorescence* IP01. *J. Bacteriol.* **187**: 2483-2490.