

《農芸化学奨励賞》

新規な二原子酸素添加反応を含むダイオキシン関連化合物生分解系の
構造生物学的・分子遺伝学的研究



東京大学生物生産工学研究センター 助教授 野尻 秀昭

環境汚染物質であるダイオキシンなどのヘテロ環式芳香族化合物の細菌による好氣的分解経路には、特異な二酸素添加反応が含まれる。それは、ヘテロ原子と結合する核間の炭素原子とそれに隣接する炭素原子に二つの水酸基を *cis* 型に導入する反応で、核間二水酸化と呼ばれる (図 1a)。これに対し、ナフタレンなどの代謝系では分子側面に対して同様の *cis* 型の二水酸化 (末端二水酸化) が起こる (図 1b)。酵素学的には、両反応とも基質を認識・酸化する最終酸化酵素と、NAD(P)H 由来の還元

力 (電子) を酸化酵素の活性中心に運ぶ電子伝達系から構成される Rieske non-heme iron oxygenase system (ROS と略記) により触媒される。ダイオキシンが核間二水酸化を受けるとエーテル結合の自発的開裂により骨格が破壊されるため、核間二水酸化を触媒する ROS はダイオキシン汚染除去を考えるうえで非常に興味深い。また、すべての ROS は各基質に対し立体選択性・位置選択性の高い酸化反応を触媒することから、有用物質生産への応用が可能であり、グリーンケミストリーの一つの手段として期待される。このような理由から、核間二水酸化を触媒可能な ROS の触媒メカニズムを精密に理解することは、環境・物質生産の両分野において意義深い。

本研究では、含窒素芳香族化合物カルバゾール (CAR) の資化菌から、CAR や低塩素化ダイオキシンに対する核間二水酸化酵素遺伝子の単離に世界で初めて成功した。本酵素を含め CAR/ダイオキシン分解に関与する酵素群の諸性質の解明、基質特異性の決定、立体構造の決定を行って、各酵素の基質認識・反応活性化機構を解明した。また、この特殊な代謝能の自然界での伝播機構についても解析し、新規なプラスミド・トランスポゾンを見いだした。

1. ダイオキシン/CAR 分解酵素の単離と機能-構造解析

CAR を唯一の炭素源・窒素源・エネルギー源として生育可能な *Pseudomonas resinovorans* CA10 株は、CAR を核間二水酸化と自発的環開裂によりカテコール体へと変換した後、メタ開裂・加水分解を経てアントラニル酸へと変換する (図 2)。本研究では、CAR のアントラニル酸への 3 段階の変換酵素をコードする *car* 遺伝子群を CA10 株から単離することに成功し、世界で初めて核間二水酸化酵素 CAR 1,9 a-dioxygenase (CARDO) の一次構造を報告した。基質特異性の解析の結果、CARDO を含めた CAR 代謝系はダイオキシン分解系として機

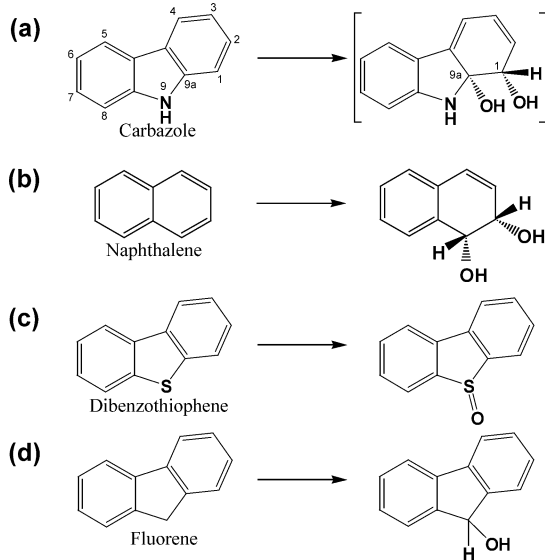


図 1 Carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) が触媒する反応
(a) CAR に対する核間二水酸化, (b) ナフタレンに対する末端二水酸化, (c) dibenzothiophene に対する sulfoxidation, (d) fluorene に対する 9-hydroxylation.

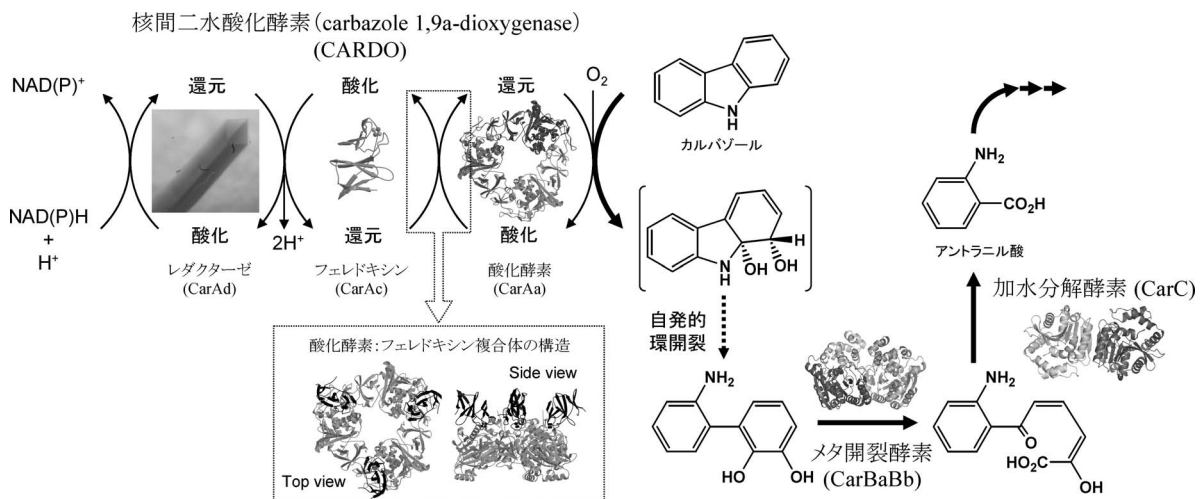


図 2 ダイオキシン/CAR 分解酵素の X 線結晶構造解析

能することが示された。特に CARDO はダイオキシン骨格であるジベンゾ-*p*-ダイオキシンやジベンゾフランに対して核間二水酸化を触媒する一方、ナフタレン・ピフェニルなどには末端二水酸化を、ジベンゾチオフェン・フルオレンに対しては一酸素添加反応を触媒することが示され、基質の構造に応じて異なる種類の酸化反応を触媒することが明らかとなった (図 1)。

CARDO (酸化酵素, フェレドキシン, レダクターゼから構成される) を含めた CAR 代謝系酵素の機能を原子レベルで理解することを目的として X 線結晶構造解析を行い、現在までに CARDO の酸化酵素, フェレドキシン (酸化酵素への電子供与タンパク質), メタ開裂酵素, 加水分解酵素の構造解析に成功した (図 2)。CARDO の基質特異性決定機構の解明のために酸化酵素活性中心部位の構造に基づき基質特異性変異酵素を作製し、それらの構造-活性相関の解明, 野生型・変異酵素への基質結合状態の結晶構造決定・コンピュータ予測から, CARDO が核間二水酸化を触媒できる理由を明らかにした。また, CARDO の触媒サイクルの駆動力として重要な酸化酵素への電子伝達機構解明を目的に酸化酵素: フェレドキシン複合体の構造解析を行い, 特異なタンパク質相互作用と電子伝達様式を明らかにした。生理的な条件で離合集散を繰り返す電子伝達タンパク質の結合状態を X 線結晶構造解析で解明した例は非常に少なく, ROS では初めての例である。

2. ダイオキシン/CAR 分解プラスミドの機能解析

P. resinovorans CA10 株の *car* 遺伝子群は約 199 kb の環状プラスミド pCAR1 上に存在している。その全塩基配列の決定の結果 (図 3), 接合伝達関連遺伝子が腸内細菌由来プラスミドのものと関連性が認められるなど, pCAR1 は既知のものと同類似性が低い新規なものであった。実際, pCAR1 は当時研究例が少なかった IncP-7 群の不和合性群に属していた。IncP-7 群プラスミドは非選択圧下でも非常に安定だが, この特徴を決定する複製・分配能支配領域の同定も行った。一方, pCAR1 は *Pseudomonas* 属の他細菌への接合伝達が確認されたことに加

え, *car* 遺伝子を含む約 73 kb のクラス II 型トランスポゾン Tn4676 の転移能も実証された。すなわち, 両可動性遺伝因子が, 少なくとも *Pseudomonas* 属内での *car* 遺伝子群の伝播装置として働くことが示された。現在, pCAR1 は生化学的に解析された唯一の塩基配列利用可能な IncP-7 プラスミドとして, 同グループの archetype とされている。

ところで, 今までに 52 株のダイオキシン/CAR 分解菌が取得されているが (うち 40 株は本研究で単離), 1 株を除いてすべてグラム陰性細菌 [多くが *Pseudomonas* 属 (12 株) か *Sphingomonas* 属 (20 株)] であった。それら単離株での CA10 株由来 *car* 遺伝子群の保存性を調べたところ, *Pseudomonas* 属に加えて, *Sphingomonas* 属細菌をはじめとする多くの細菌が同遺伝子群ホモログを保持していた。興味深いことに, *Sphingomonas* sp. KA1 株の *car* 遺伝子群ホモログは, pCAR1 とは異なる約 255 kb の環状プラスミド pCAR3 上に存在していた。全塩基配列決定の結果, pCAR3 が CAR を完全分解するためのすべての分解酵素遺伝子を有すること, フタル酸やプロトカテック酸などの分解酵素遺伝子を有することなど, 分解プラスミドとして多機能性を有しているなど, 興味深い特徴が明らかになった。

おわりに

CARDO 酸化酵素の結晶構造解析の成功により, 他の ROS では報告例の少ない特徴である核間二水酸化の様式が明らかになった。現在, 基質特異性が変化した変異体酵素の機能構造解析も併せて行っている。今後, 種々基質に対する CARDO の多様な反応を原子レベルで詳細に理解できるようになるものと期待され, 有用酵素のデザインなどに利用できるものと思われる。一方, ROS のコンポーネント構成と電子伝達様式は分類にも用いられる重要な特徴であるが, 本研究の成果によりその原子メカニズムの解明に道筋がつけられた。われわれは, 本研究で解析した CARDO とは電子伝達系が異なる CARDO もすでに取得しており, その構造・機能解析を進めている。ROS の電

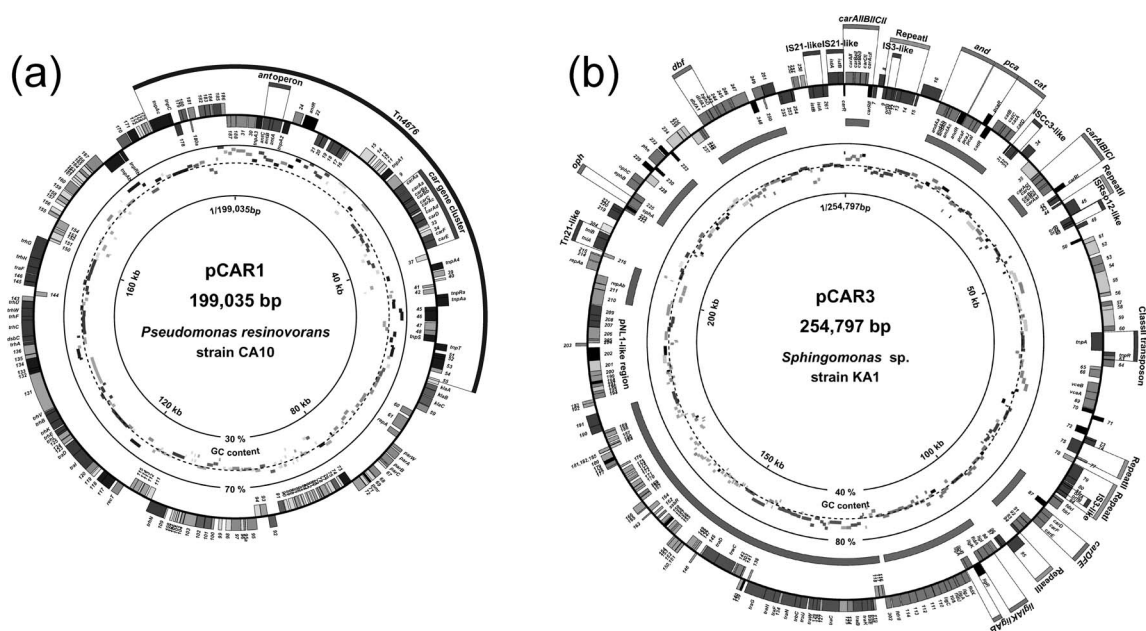


図 3 ダイオキシン/CAR 分解プラスミドの構造 (a) *Pseudomonas resinovorans* CA10 株由来 IncP-7 プラスミド pCAR1 の構造, (b) *Sphingomonas* sp. KA1 株由来 pCAR3 の構造。

子伝達系の多様性はゲノムの多様化の結果生じたものと考えられるが、本研究の成果が微生物機能の適応・進化の興味深い例を提供してくれることを期待している。

一方、プラスミドは種々細菌間を伝達されながら、さまざまなホスト中でその染色体と特異的な協調作用をしていると予想される。われわれは、最近 pCAR1 の全塩基配列情報を用いたトランスクリプトーム解析による、染色体ゲノムとプラスミドゲノムの相互作用解明を行っている。すでに、相互作用に重要と思われる両ゲノム上の因子を同定しており、今後の展開に期待している。また、*Sphingomonas* 属細菌は分解菌として重要で、かつプラスミド上に分解遺伝子群が存在する例が多く報告されているが、同属に由来するプラスミドの研究は非常に少ない。このため、pCAR3 の機能の解明はプラスミド学そのものから考えても興味深い貢献を行うものと期待される。

本研究は、東京大学生物生産工学研究センター環境保全工学部門（旧 生物制御工学部門）にて行われたものです。本研究に出会うチャンスを与えていただき終始ご指導ご激励を賜りました東京大学名誉教授（現 芝浦工業大学大学院工学研究科教授）・大森俊雄先生に深謝いたします。また、卒論生時代から一貫

してご指導ご激励を頂きました東京大学生物生産工学研究センター教授・山根久和先生に厚く感謝いたします。また、本研究は同センター助手・羽部 浩先生、同元助手・吉田貴子先生のご助言なくして完遂できなかったものであり、厚く感謝いたします。また、研究の進展に伴う新しい研究手法の導入にあたり、多くのご助言ご指導を賜りました(独)農業生物資源研究所元蛋白質機能研究チーム長（現 NEC ソフト株式会社）・水野 洋博士、同主任研究官・藤本 瑞博士、東京大学農学生命科学研究科応用生命工学専攻教授・清水謙多郎先生、同助教授・中村周吾先生、同助手・伏信進矢先生、東京大学農学生命科学研究科アグリバイオインフォマティクス人材養成プログラム特任助教授・寺田 透先生、東北大学大学院生命科学研究科生態システム生命科学専攻教授・津田雅孝先生に厚く感謝いたします。また、東京大学旧農芸化学科の諸先生ならびに諸先輩方には、多数の有益なご助言と温かい励ましを賜りました。ここに深く感謝いたします。本研究の成果はすべて、研究室の多くの博士研究員、大学院生、学部学生諸氏の昼夜を問わない努力の賜物であり、ここに改めて感謝の意を表したいと思います。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関東支部長太田明德先生に厚く御礼申し上げます。