

芳香環二酸化酵素における触媒反応の分子基盤 Structural basis of the catalytic cycle of Rieske nonheme iron oxygenases

芦川雄二¹, 梅田隆志¹, 藤本瑞², 野尻秀昭^{1*}

¹東京大学生物生産工学研究センター 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

²農業生物資源研究所 〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2

1 はじめに

Rieske nonheme iron oxygenase (RO)は芳香環への *cis* の立体配置での二水酸化反応を触媒し、ダイオキシンや PCB を含む、種々の芳香族化合物の微生物分解の初発酵素である。RO は、酸化反応を触媒する oxygenase (Oxy)と電子伝達タンパク質 [reductase (Red)のみ、あるいは Red と ferredoxin (Fd)] から構成されるマルチコンポーネント型酵素である。現在まで、多くの RO の Oxy コンポーネントの結晶構造が報告されており[1]、基質特異性や酸化反応の位置・立体選択性の決定メカニズムについては多くの知見が存在する。一方で、RO の反応機構、すなわち、酸素の活性化や基質の結合がどのような順序で行われているかについては報告が乏しく、未だ結論が得られていない状況であった。本研究では、RO の一種である carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO)を材料に、Oxy と基質や酸素との複合体結晶を取得し、RO の反応機構を詳らかにする事を目的とした。

2 実験

これまでに、CARDO の Oxy:Fd 複合体に基質である carbazole (CAR)を soaking し基質複合体の結晶構造を得ており[2]、本研究では更に、Oxy:Fd 複合体を還元処理した後に CAR を soaking したものの (Oxy:Fd^{red-CAR})、還元処理した後に酸素を導入したものの (Oxy:Fd^{O2})、還元処理した後に CAR と酸素を導入したものの (Oxy:Fd^{CAR-O2})の結晶構造をそれぞれ 1.95 Å、1.85 Å、2.0 Å の分解能で取得した。

3 結果および考察

図 1 に示すように、Oxy:Fd^{red-CAR} では、還元処理をしていない Oxy:Fd:CAR 三者複合体 (Oxy:Fd^{CAR})と比較して、nonheme iron に配位している Asp333 が 0.5 Å 程度 CAR から離れる方向にシフトすることが明らかとなった。また、Oxy:Fd^{O2} では、二つの酸素原子と nonheme iron が三角形を形成する、side-on の形で酸素が存在していた。二つの酸素原子間の距離は 1.45 Å であったことから、酸素はペルオキシド体として存在することが示唆された。結晶化条件の pH (約 5.5)を鑑みると、Fe(III)-hydroperoxo として存在している可能性が考えられた (図 2)。Oxy:Fd^{CAR-O2} では、CAR の 1 位、9a 位の炭素原子と

peroxide のそれぞれの酸素分子の距離はいずれも 2.9 Å であったため、Oxy が CAR の 1 位と 9a 位に対する二水酸化を触媒することの構造的裏付けをとる事が出来た (図 2)。

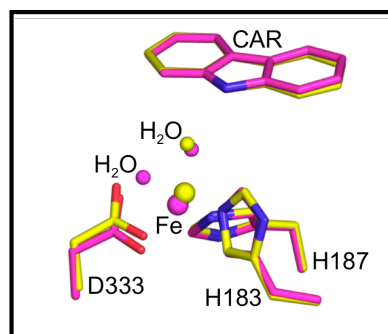


図 1 : 還元による Asp333 の移動
赤 : Oxy:Fd^{red-CAR}、黄 : Oxy:Fd^{CAR}

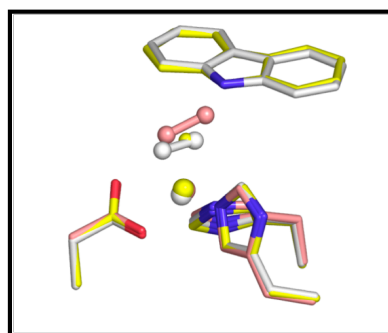


図 2 : 活性中心への酸素の結合
黄 : Oxy:Fd^{CAR}、白 : Oxy:Fd^{CAR-O2}、ピンク : Oxy:Fd^{O2}

4 まとめ

以上のことから、Oxy が Fd から電子を受け取ると、基質である CAR が結合し、それに伴い Asp333 の移動が起こる。この移動により作られたスペースに酸素が結合し、peroxide 体となる。その後、酸素原子間の結合が開裂し、CAR への二水酸化反応が起こるといふ一連の反応機構が提唱された[3]。

参考文献

- [1] DJ. Ferraro *et al.*, *BBRC* **338** (2005) 175-90.
- [2] Y. Ashikawa *et al.*, *Structure* **12** (2006) 1170-89.
- [3] Y. Ashikawa *et al.*, *BMC Struc. Biol.* in press.

*anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp