特集:タンパク質の化学構造から生物機能に迫る

アゾ還元酵素の構造と反応機構

伊 東 孝 祐,田之 倉 優

微生物の酵素を利用した浄化システムは,穏和な条件下で安全かつ安価に環境汚染化学 物質を分解できることから注目を集めている.我々は,そのような酵素の反応の分子機構 を解明することに取り組んでおり,このほど,色素や染料などに使われるアゾ化合物を分 解する大腸菌由来のアゾ還元酵素 AzoR の立体構造を決定した.その結果,異なる大きさ の基質を取り込むための活性ポケットの構造変化,酵素の酸化還元にともなう補酵素 FMN の構造変化およびその周辺の水分子の移動の様子が明らかになった.また,酵素学 的解析の結果と合わせ,極めて信憑性の高い AzoR-アゾ化合物複合体のモデルを構築する ことができた.アゾ還元酵素は長年に渡って多くの研究報告がなされている酵素だが,こ のような酵素-アゾ化合物複合体の知見が得られた例は初めてである.さらに,酵素の基 質特異性の拡張にも成功したので合わせて紹介する.

1. 序 論

世界的規模での産業の発展にともない,環境汚染化学物 質を浄化する技術開発が急務となっている.そのなかで, 大量生産が可能な微生物の酵素を利用した浄化システム は,化学的なそれと比較し,マイルドな条件下で安全かつ 安価に環境汚染物質を分解できることから現在注目を集め ている^{1.2)}.我々の研究室では,そのような微生物酵素の立 体構造を原子レベルで解明することに積極的に取り組んで おり,その中から本稿では,難分解かつ有害な合成色素で あるアゾ化合物を取り上げ,それを分解する大腸菌由来の 酵素 AzoR (azoreductase)の研究成果を報告する.

アゾ化合物は製造が容易であり、安定な化合物であることから、印刷、染色、着色料、化粧品など様々な用途で大量に使用されている³. だがその安定性のため、ひとたび環境中に放出されると、自然界の浄化作用では分解されず

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 (〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1)

The structure and reaction mechanism of azoreductase Kosuke Ito and Masaru Tanokura (Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1–1–1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113–8657, Japan) に環境汚染を引き起こす.なかには、遺伝子変異を引き起 こすなどの有害性があるものも報告されている⁴.一方 AzoR は、アゾ化合物を分解する微生物のスクリーニング の過程で、典型的なアゾ化合物であるメチルレッド(4'dimethylaminoazobenzene-2-carboxylic acid)を分解する酵 素として同定された大腸菌由来のタンパク質である⁵⁰.現 在までの酵素学的研究により、AzoR は NADH を電子供与 体、FMN を補酵素とし、ピンポンバイバイ (ping pong bi bi)機構によりアゾ基を還元分解する酸化還元酵素である ことが分かっている (図1). AzoR は1モルのメチルレッ ド分解に2モルの NADH を必要とし、分解産物は ABA (2-aminobenzoic acid)と DMPD(N, N'-dimethyl-p-phenylenediamine)であることが同定されている.加えて、メチル レッド以外にもエチルレッド (4'-diethylaminoazobenzene-2-



図1 ピンポンバイバイ機構

酸化型 AzoR は電子供与体である NADH から電子を受け取り還 元型 AzoR となる.次いで,還元型 AzoR は電子受容体である メチルレッドに電子を渡して再び酸化型 AzoR となる. carboxylic acid) を分解すること, ジクマロール [3,3'methylenebis (4-hydroxycoumarin)] が競合阻害剤になるこ とが分かっている.一方, AzoR の生体内での機能は分 かっていないが, 相同遺伝子が多くの微生物で高度に保存 されていることがゲノムプロジェクトから明らかになっ た^{6~11)}.

環境問題改善を目的とし、長年に渡って多くのアゾ分解 酵素が報告されているが、その反応の分子機構に関する知 見は少ない^{12~20)}.タンパク質工学の分野においては、これ らの酵素を改変し、環境汚染物質の分解機能を向上させる 研究が盛んに行われているが、このことを実現するために は酵素反応の分子機構を知ることが必要不可欠である. 我々は、X線結晶構造解析および酵素学的解析により、 AzoR についてのアゾ化合物分解の分子機構を追究してお り, 最近, 3種類の酸化型 AzoR, 還元型 AzoR, AzoR-ジ クマロール複合体,合計5種類の結晶構造を決定し た^{21~23)}.本稿では、これらの構造から明らかになった酵素 反応の分子機構を解説する.また,酵素学的解析の結果と 合わせ、極めて信憑性の高い AzoR-メチルレッド複合体の モデルを得ることができた.アゾ還元酵素は長年に渡って 多くの研究報告がなされている酵素だが、このような酵 素-アゾ化合物複合体の知見が得られたのは初めての例で ある. さらに, ここで得られた成果をもとに, 部位特異的 変異法により, バイオリアクター開発を視野に入れた基質 特異性の拡張にも成功したので合わせて紹介する.

2. AzoR の全体構造

AzoR は結晶中でホモダイマーとして存在していた.各 サブユニットは、中心部に5本のストランドからなるβ シート、その周囲を3本、および2本のαへリックスが サンドイッチしたフラボドキシン様構造をとっていた(図 2).補酵素である FMN は各サブユニットに1分子ずつ存 在し、二つのサブユニットの界面に結合していた.活性中 心が両サブユニットからのアミノ酸残基によって形成され ること、およびゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量 測定の結果から⁵、AzoR はホモダイマーで機能発現して いることが明らかになった.

驚くべきことに, AzoR は微生物の酵素であるにもかか わらず, またアミノ酸配列に有意な相同性が認められない のにもかかわらず, その立体構造は哺乳類の解毒酵素 NQO1(FAD-dependent NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, 別名 DT-diaphorase) と類似していた(図3)²⁴⁾. NQO1 は 補酵素を FAD, 電子供与体を NAD(P)H とし, AzoR と同 様ピンポンバイバイ機構によってキノンを還元する酸化還

図2 AzoR の全体構造

AzoR の全体構造をリボンモデルで表示した.二つのサブユニットをそれぞれ黄色と緑色で示してある.補酵素 FMN はスティック モデルで表示した.なお,本稿の図中では,各サブユニットをプライムの有無によって区別して表記しているが, AzoR はホモダイ マーなのでそれらは等価である.[文献 22 より一部改変]

図3 AzoR と NQO1 の全体構造比較

AzoR(左)とNQO1(右)の全体構造をリボンモデルで表示した. α ヘリックス, β ストランド,ループ部分をそれぞれ赤色,黄色,緑色で,NQO1のC 末端部分を灰色で表示した. AzoR の補酵素 FMN, NQO1の補酵素 FAD はスティックモデルで表示した.

図4 FMN とアミノ酸残基の相互作用

(A) FMN とアミノ酸残基の相互作用を図式化した.炭素,酸素,窒素,リン,硫黄原子をそれぞれ黒色,赤色,青色,黄色,紫色の 丸で表示した.水素結合を緑色の破線で,ファンデルワールス結合を赤色のシェーディングで表示した.(B) AzoR 表面の静電ポテ ンシャルを示した.赤がマイナス,青がプラスのポテンシャルを表している.補酵素 FMN はスティックモデルで表示した.[文献 22 より一部改変]

図5 酸化型,還元型 AzoR の活性中心の比較

(A)酸化型 AzoR (B)還元型 AzoR 中の FMN をボール&スティックモデルで F_o-F_o電子密度マップとともに表示した.炭素,酸素, 窒素,リン原子をそれぞれ黄色,赤色,水色,オレンジ色で示してある.(C)酸化型,還元型 AzoR の活性中心の重ね合わせ.酸化 型 AzoR は(A)同様の色で,還元型 AzoR の原子は全て青色で表示した.W_o,W_e はそれぞれ酸化型 AzoR,還元型 AzoR 中の水分子 を示している.[文献 23 より一部改変]

図6 2種類の酸化型 AzoR の重ね合わせ

2 種類の酸化型 AzoR の Cαトレースモデルをそれぞれ赤色と青色とし,重ね合わせて表示した.FMN のみスティックモデルで表示 してある.[文献 22 より一部改変]

図7 AzoR と NQO1 の活性中心比較

(A) AzoR-ジクマロール複合体. FMN とジクマロール結合に関与しているアミノ酸残基をボール&スティックモデルで表示した. ジ クマロールの炭素原子は緑色で表示し,その他の原子は図5と同様の色使いで表示してある. (B) Arg-59 が確認できた AzoR. 隣接 分子の Asp-62 の炭素原子を緑色,それ以外を(A)同様に表示した. (C) ヒト NQO1-ジクマロール複合体 (PDB ID:2F1O). (D) ラッ ト NQO1-デュロキノン複合体 (PDB ID:1QRD). (C) および(D) では,ジクマロールまたはデュロキノン結合に関わりかつ AzoR に おいても保存されているアミノ酸残基を(A)同様に表示した. [文献 23 より一部改変]

図9 AzoR-メチルレッドの結合モデル (ステレオ図)

メチルレッド, FMN,メチルレッド結合に関わると考えられるアミノ酸残基をボール&スティックモデルで表示した.メチルレッドの炭素原子を緑色,それ以外を図5同様に表示した.[文献23より一部改変]



図2





図 3

В



叉4



図 5













元酵素である. さらに NQO1 は, AzoR 同様ホモダイマー として存在しており, AzoR と同様メチルレッドも基質と する²⁵⁾. これらの類似性から, AzoR も大腸菌内において 解毒に関わっている可能性が考えられる. なお, NQO1 は 腫瘍治療のためのプロドラッグの標的タンパク質として注 目を集めている酵素である²⁶⁾.

興味深いことに AzoR には, NQO1 において NAD(P)H のアデノシン部位が結合している C 末端ドメインが存在 しない(図3)²⁷⁾.加えて, AzoR には NADH binding motif である *GXGXXG* モチーフが存在しない.これらのこと は, AzoR が新規の NADH 結合様式を持つことを強く示唆 する結果である.なお,我々が決定した AzoR の立体構造 は, NADH を電子供与体, FMN を補酵素とするアゾ還元 酵素の初めての例であり,また AzoR ファミリーの立体構 造決定の初めての例であった.

3. FMN 結合部位

各々の FMN は 15 本の水素結合によって一方のサブユ ニットと,疎水性結合によって両サブユニットと結合して いた.それらの相互作用について,FMN をイソアロキサ ジン環,リビトール,リン酸部位の3ヶ所に分けて説明す る.

FMN のイソアロキサジン環 O2 位は Gly-142, O4 位は Asn-97 および Phe-98, N1 位は Gly-141, N5 位は Asn-97 の 主鎖 N-H と水素結合していた(図 4A). イソアロキサジ ン環 O4 位は His-144 の NE2 とも水素結合を形成し、C7M 位はもう一方のサブユニットのLeu-50と疎水結合してい た. これらの結合の中で, N5 位と Asn-97 の水素結合は, タンパク質工学的立場から非常に興味が持たれるところで ある.なぜなら、N5位はヒドリドイオンが転移する部位 であるが、この部位の水素結合は、イソアロキサジン環の 電子共鳴状態に直接的に影響を及ぼして酵素の酸化還元特 性を変化させるからである^{28,29)}.次にリビトール部位であ るが、O2*位は Met-95 の主鎖 C=Oと Gly-141 の主鎖 N-H と水素結合を形成しており、その他の部分には幾つかの疎 水結合が認められた.最後にリン酸部位であるが,各酸素 原子は Ser-9の OG, Ser-15の OG, Gln16の主鎖 N-H, Ser17 の主鎖 N-H および OG, Tyr-96 の OH, Ser-139 の OG と水素結合していた.通常,FMNのリン酸部位は静電的 相互作用によってポリペプチド部位と結合するが、AzoR においてはそのような結合様式は認められず,上記の7本 の水素結合による相互作用しか認められなかった(図 4B).

AzoR 中において, FMN の一方の面はアミノ酸残基で完 全に空間が満たされた状態で結合している(図 4B). また, FMN のもう一方の面からは,活性ポケットの大きさから 考えて,基質である NADH とアゾ化合物が同時に接触す ることは不可能である.このことは,本酵素の触媒反応が ピンポンバイバイ機構に従うことと合致している.

酸化還元にともなう補酵素 FMN およびその周辺の環境変化

我々は,酸化型 AzoR の結晶をジチオナイトで還元する ことで,還元型 AzoR の構造を 1.7Åの分解能で決定する ことができた.この結果により,酵素の酸化還元にともな う構造変化,特に補酵素 FMN 周辺の構造変化を詳細に観 測することができた.また,酸化型 AzoR の結晶は,ジチ オナイトによる還元によって黄色から無色透明に変化し た.このことは,得られた還元型 AzoR の構造が 2 電子還 元状態にあることを意味している.

酸化型 AzoR 中では、FMN のイソアロキサジン環は若 干ねじれてはいたものの、ほぼ平面構造をとっていた(図 5A). ところが還元型 AzoR 中では, イソアロキサジン環 は N5-N10 軸に沿って 15 度ほど折れ曲がったバタフライ 型折れ曲がり構造をとっていた(図 5B). このバタフライ 型折れ曲がり構造の方向は、遊離のイソアロキサジン環と は逆である^{30~32)}.このことから、AzoR中におけるイソア ロキサジン環の構造は、周辺のペプチド部位の影響を強く 受けたものであることが明らかになった.次に、酸化型 AzoR 中で見られたイソアロキサジン環の中央の環のねじ れ構造についてであるが、これは還元型 AzoR 中でも維持 されていた (図 5A, B). しかし, N5 位と N10 位はさら に si-face 方向に立ち上がっていた。結果として、酵素の 還元に伴い、イソアロキサジン環の中央の環はねじれ舟型 になっていた.このように、還元型イソアロキサジン環の 中央の環が、イス型ではなく、エネルギー的に好ましくな いねじれ舟型になることは非常に興味深い事実である.恐 らく,酵素の酸化還元電位と密接な関係があるのだろう.

他にも酵素の還元に伴い, FMN 上の水分子の移動およ び二つの球状の電子密度の消失が観測された.まず水分子 の移動については,酸化型 AzoR 中で Asn-97 に水素結合 していた水分子は酵素の還元に伴って移動し、新たにイソ アロキサジン環の N5 位と水素結合していた (図 5C).こ の水素結合により、上述した還元状態のイソアロキサジン 環 N5 位の立ち上がりが安定化され、そのことにより酵素 の還元状態が安定化されるのだろう.なお,N5位は電子 の授受が行われる部位である²⁸⁾.また、この水分子は後述 の通り、基質還元反応の際にはアゾ化合物と置き換わらな ければならない場所に存在している. つまり, 基質還元反 応の際には、基質の結合によって N5 位の立ち上がりを支 える水素結合が消失し、還元状態のイソアロキサジン環 N5 位の不安定化が引き起こされる. そのため、イソアロ キサジン環の平衡は酸化状態へと移動し、イソアロキサジ ン環からアゾ化合物へ効率よく電子が放出されると考えら れる.次にFMN 上の二つの球状の電子密度についてであ

るが、これらが何の物質に相当するものなのか現在のとこ ろ不明である(二つとも水素結合で説明ができるため、図 5Cでは水分子として割り当てているが、電子密度の大き さは水分子のそれよりも大きい).しかしながら、酵素の 還元にともなったこれらの電子密度の消失は、イソアロキ サジン環の電子状態の再編を反映したものだと考えられ る.

5. 活性ポケットの構造変化

異なった種類の結晶から得られた2種類の酸化型 AzoR の立体構造を比較したところ,三つの部分の構造が顕著に 異なっていることが判明した.このような立体構造の違い は、タンパク質に本来備わっている柔軟性に富む部分の構 造変化に由来することが多い.AzoRにおいては、これら の部分は全て活性ポケットの形成に関与する部分であっ た.以下,構造が異なった三つの部分について説明する.

まず一つ目はループL9である(図6).ループL9は FMN のイソアロキサジン環の真上を覆っている.二つ目 は、ループL13とαヘリックス6のN末端側を含む部分 (L13-Nα6) である. L13-Nα6 部位もL9 同様, FMN 近傍 で活性中心ポケットを形成している. それゆえ, これらの 部分の構造変化が、大きさの異なる基質を認識および結合 することに重要な役割を果たしていると考えられる.実 際, AzoR は NADH, メチルレッド, エチルレッド, ビタ ミンK₃ (2-methyl-1, 4-naphthoquinone) など, 大きさの異 なった基質と同一の活性ポケットで反応することが酵素学 的解析より明らかになっている⁵. つまり、二つの酸化型 AzoR の活性ポケットの構造の違いは、大きさの異なる基 質を取り込む際の,活性ポケットの構造変化を分子レベル で証明したものだと解釈できる. 三つ目はループ L4 であ る. ループ L4 は FMN のイソアロキサジン環から 15Å以 上離れているが、もしループ L4 が FMN 側にシフトした 状態で、かつ NADH が伸長した状態で活性中心に接近し たならば、このループL4はNADHと充分接触できる.そ れゆえ,ループL4も基質結合に関与していることが考え られる.

6. 阻害剤ジクマロールとの結合

基質結合様式について手掛りを得るため,我々はAzoR とその競合阻害剤であるジクマロールとの複合体の結晶構 造解析を試みた.その結果,2.3Åの分解能で立体構造を 決定することに成功した.そこから,AzoRとジクマロー ルとの間には水素結合は含まれず,疎水結合が主なジクマ ロール結合の要因であることを見出した.以下に詳細を説 明する.

ジクマロールの一方のクマリン環は, Phe-162の側鎖と FMN のイソアロキサジン環に挟まれており, もう一方の クマリン環は Tyr-120 と Tyr-178 の側鎖に挟まれていた (図 7A). これらの平面はほぼ平行,かつ4Å以内の距離 に位置することから,π-スタッキングシステムがジクマ ロール結合の安定化に大きく寄与していることが分かっ た.また,Phe-98 と Phe-118の側鎖もジクマロールから4 Å以内の距離に位置し,Phe-162の側鎖とともに活性ポ ケットの深部で疎水性クラスターを形成してジクマロール と接触していた.その他,Gly-141のカルボキシル基の炭 素原子,Gly-142の Cα,Ala-177 のCβもジクマロールと 疎水結合していた.これらの結果から,ジクマロール同 様,疎水性化合物であるアゾ化合物も,イソアロキサジン 環周辺の疎水性領域に結合することが示唆された.

7. 活性中心における Arg-59 の立体配置

上述の結晶構造では、Arg-59を含むループの電子密度 は明確に確認することができず、その領域の立体構造は不 明であった.しかしながら、我々は数種類得られた結晶系 の中から、それらの領域の電子密度が明確に確認できるも のを見出し、その結晶構造を2.1Åの分解能で決定した. その中では、結晶中の隣接 AzoR 分子の Asp-62 が、対象 としている AzoR 分子の活性ポケットに入り込み、イソア ロキサジン環上で対象としている AzoR 分子の Arg-59 と 塩橋を形成していた(図 7B).この塩橋によって Arg-59 を含むループが固定され、この部分の電子密度が明瞭に なったと考えられる.なお、この Arg-59 の立体配置がど のような意味を持つかは、以下の「10. アゾ化合物の結 合様式」で述べる.

8. 基質特異性の解析

AzoR の基質認識のメカニズムを明らかにするために, メチルレッドおよびその類似化合物に対する酵素の基質特 異性を調べた.我々は以前,エチルレッドを利用した実験 から,基質のN,N'-ジメチルアラニン部位の大きさは基質 特異性に関係ないことを示していた(図8)⁵⁰.次に我々は, 基質のカルボキシル基の位置に着目し,p-メチルレッドを 基質として酵素活性測定を行った.その結果,AzoR はp-メチルレッドとは反応しないことが分かった(**表**1).こ のことはつまり,アゾ化合物のカルボキシル基の位置が基



 					
Enzyme	$K_{ m m}^{ m NADH} \ (\mu{ m M})$	$rac{K_{\mathrm{m}}^{\mathrm{MR}}}{(\mu\mathrm{M})}$	V_{\max}^{MR} (units/mg)	$K_{ m m}^{ m PMR} \ (\mu{ m M})$	V_{\max}^{PMR} (units/mg)
WT	70.6 ± 8.1	41.9 ± 3.4	393 ± 35	266 ± 2.8	9.11 \pm 0.14
R59A	403 ± 32 (×5.7)	84.9 \pm 7.1 (×2)	1336 ± 129 (×3.4)	1006 ± 188 (×3.8)	248 ± 41 (×27)

取り到りとだれらり、本田住り、 ちの日亡法庭 パニン

酵素活性は平均±標準誤差(n=3)で表記してある.野生型に対する R59A 変異体の相対活性を括弧内に示した.MR:メチルレッ ド, PMR: p-メチルレッド

質特異性を決定しているということを示した結果である.

基質特異性の拡張

「8. 基質特異性の解析」で述べた通り、アゾ化合物の カルボキシル基の位置で基質特異性は決定される。また一 方で、「7. 活性中心における Arg-59 の立体配置」で述べ た通り, Arg-59 はイソアロキサジン環上に位置できるこ とが分かった.またさらに, Arg-59 は活性ポケットに存 在する唯一の塩基性アミノ酸残基であった. これらの事実 から我々は、アゾ化合物のカルボキシル基と AzoR の Arg-59の間には静電的相互作用が存在し、その相互作用が AzoR の基質特異性を決定していることを予測した.この 予測を検証するため、アゾ化合物に対する R59A 変異体の 反応速度パラメーターを測定した.

R59A 変異体の *p*-メチルレッドに対する *V*_{max} は,野生型 のそれに比べて 27 倍上昇し、その値は野生型 AzoR のメ チルレッドに対する Vmax に相当するものであった (表1). その際, K_mの上昇は 3.8 倍であった.一方で, R59A 変異 体のメチルレッド分解活性は野生型のそれとほぼ同等で あった.これらの結果は、R59A 変異体がメチルレッドだ けでなく p-メチルレッド分解活性も獲得したことを意味 し、さらにはアゾ化合物のカルボキシル基と AzoR の Arg-59の相互作用を証明するものである.

アゾ化合物の結合様式

アゾ還元酵素は長年研究されている酵素の一つである が、酵素とアゾ化合物の複合体の立体構造は現在までに報 告されておらず、それゆえ酵素へのアゾ化合物の結合様式 は不明であった. アゾ化合物の極端な溶解度の低さが解析 を困難にしているのだろう.しかし我々は, AzoR と NOO1 の活性中心の比較, AzoR-ジクマロール複合体, Arg-59の 立体配置が確認できた結晶構造,酵素活性測定の結果か ら、極めて信憑性の高い AzoR-メチルレッド複合体の結合 モデルを初めて提唱することができた. その内容を以下に 紹介する.

AzoR と NQO1 の活性中心の構造を比較したところ, 幾 つかのアミノ酸残基が同様の位置に存在していることが明 らかになった. まず, NQO1のPhe-178はAzoRのPhe162 と同様の位置に存在していた. NQO1 において Phe-178は、補酵素 FAD のイソアロキサジン環と共に、基質 であるデュロキノン (2,3,5,6-tetramethyl-quinone) を, 阻 害剤であるジクマロールのクマリン環と同様の位置に挟み 込んでいた (図 7C, D)^{24, 27, 33)}. 一方, AzoR において Phe-162は、FMN のイソアロキサジン環と共に阻害剤である ジクマロールのクマリン環を挟み込んでいた(図7A).こ のことから、AzoR においても基質であるアゾ化合物の芳 香環が, Phe-162 とイソアロキサジン環に挟みこまれるこ とが予測される. 実際, NQO1 も AzoR 同様にメチルレッ ド分解活性を持つことが分かっており⁵⁰、このこともイソ アロキサジン環とそれを覆うフェニルアラニンがアゾ化合 物を挟み込むという予測を後押ししている. また, AzoR の Phe-98, Tyr-120, Gly-141, Gly-142 は, NOO1 の Phe-106, Tyr-128, Gly-149, Gly-150と同様の位置に存在して おり、NOO1のそれらと同様に疎水性クラスターを形成し てジクマロール結合に関与していた. その他, 基質特異性 の解析および p-メチルレッド分解活性獲得の実験で示さ れた、アゾ化合物のカルボキシル基と AzoR の Arg-59 の 静電的な相互作用も、AzoR-メチルレッド結合モデル構築 の手掛りとなった.

図9にAzoRとメチルレッドの結合モデルを示す.この モデルで、AzoRはArg-59が確認できた結晶構造を使用 し、そこでメチルレッドのカルボキシル基を、対象分子に 隣接していた分子の Asp-62 の側鎖と重ね合わせ, Arg-59 と塩橋を形成させた.また,前述のNQO1-デュロキノン 複合体のデュロキノン同様、メチルレッドの N, N'-ジメチ ルアラニン部位を、イソアロキサジン環と Phe-162 間に π-スタッキングシステムを考慮して挟んだ.結果として、ア ゾ化合物のアゾ基はイソアロキサジン環のN5位の真上 3.5Åに位置した. この立体配置は、ヒドリドイオンがイ ソアロキサジン環から基質へ直接転移するために理想的な ものである^{24,29}.またこの結合モデルは、アゾ化合物のカ ルボキシル基と Arg-59 の相互作用が基質特異性を決定し ているという仮説をうまく説明している. すなわち, p-メ チルレッドのカルボキシル基が Arg-59 の側鎖と塩橋を形 成すると、アゾ基はイソアロキサジン環のN5位から離れ たところに位置することとなり、ヒドリドイオンを直接受 け取ることができなくなる.しかしながら,このヒドリド イオン転移に好ましくない配向は,Arg-59の側鎖を除去 することで解消される.そのため,R59A変異体は*p*-メチ ルレッド分解活性も獲得したと考えられる.一方で,活性 ポケットにはメチルレッドの*N*,*N*⁻ジメチルアラニン部位 の代わりに*N*,*N*⁻ジエチルアラニンが入り込める余裕があ る.このため,AzoR はメチルレッド以外にエチルレッド 分解活性を持つのであろう.また,酵素-アゾ化合物の相 互作用は,主に疎水性相互作用により安定化されていると 考えられる.そのため,アゾ化合物と塩橋を形成できない R59A変異体もメチルレッド分解活性を保持していたと考 えられる.

11. 電子転移反応

化学量論的に, AzoR は2モルの NADH を使用して(4 電子を使用して)1モルのメチルレッドを ABA と DMPD に分解することが証明されている⁵⁾. また, FMN は酵素の 二つの活性中心に1分子ずつ結合しており(FMN は1分 子あたり2電子を授受する),それらは25Å以上離れてい る.そしてその間に電子伝達経路は存在していない.した がって,アゾ化合物還元反応は,一つの活性中心で一度に 4電子転移が起こるものではなく,2電子転移の2回繰り 返し,もしくは1回の2電子転移反応で生成したアゾ化合 物の2電子還元体が,NADHから直接2電子を受容する ものであろう.つまり,AzoR はピンポンバイバイ反応を 2サイクル繰り返し,もしくは1サイクルのピンポンバイ バイ反応後,酵素反応ではない自発的な反応でアゾ化合物 を分解していると考えられる.

通常,NADHからFMNに2電子が供与される際は, FMNのイソアロキサジン環のN5位をヒドリドイオンが 攻撃し,次いでN1位が水素化されるが,本酵素中ではイ ソアロキサジン環のN1位に水素イオンを供与するような



Thr149

- 2) 互変異性をともなったエノラートアニオンの形成
- 3) エノール形成による2電子還元状態
- 4) 基質を還元し再び酸化状態へ

アミノ酸残基,および水分子は存在しない.しかしなが ら、イソアロキサジン環 O2 位は His-144 の Nc2 と水素結 合を形成しており、この Nc2 上の水素イオンがイソアロ キサジン環 O2 位に結合することが考えられる.つまり、 AzoR の結晶構造から、AzoR の2電子転移の反応機構は 通常のタイプのものではなく、イソアロキサジン環の互変 異性をともなったものであることが示唆された(図 10).

12. おわりに

現在までに、補酵素のイソアロキサジン環とアミノ酸残 基との水素結合の様式の違いにより、ヒドリドイオン転移 の効率が異なることが報告されている^{28,29}. これらの水素 結合様式の情報と AzoR の立体構造をもとに、よりヒドリ ドイオン転移効率がよいアゾ化合物分解酵素の開発が可能 であろう.また、酵素の立体構造から、酵素-基質の結合 様式をシミュレーションし、酵素の基質特異性をタンパク 質工学的手法により改変させることも可能である.この様 に、AzoR の立体構造を原子レベルで決定したことによ り、アゾ化合物分解酵素の研究開発が発展することは間違 いないであろう.

謝辞

ここに紹介した研究は、岐阜大学工学部 北出幸夫教 授、中西雅之博士(現松山大学薬学部准教授)、東京大学 大学院農学生命科学研究科 佐々木宏助手(現常磐短期大 学講師)、李愚哲博士(現 University of British Columbia 博 士研究員)、支月華研究員、東京大学大学院理学系研究科 西郷薫名誉教授、善野修平博士(現前橋工科大学工学部准 教授)との共同研究の成果です。この研究は、タンパク 3000 プロジェクトの支援を受けて行ったものです。この 場をお借りして深く御礼申し上げます。

文 献

- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., & Nigam, P. (2001) *Bioresour. Technol.*, 77, 247–255.
- 2) Stolz, A. (2001) Appl. Microbiol. Biotechnol., 56, 69-80.
- Holme, I. (1984) Ecological Aspects of Color Chemistry: Developments in the Chemistry and Technology of Organic Dyes (Griffiths, J., ed.), pp. 111–128, Society of Chemistry Industry, Oxford.
- 4) Levine, W.G. (1991) Drug Metab. Rev., 23, 253-309.
- Nakanishi, M., Yatome, C., Ishida, N., & Kitade, Y. (2001) J. Biol. Chem., 276, 46394–46399.
- 6) Chain, P.S., Carniel, E., Larimer, F.W., Lamerdin, J., Stoutland, P.O., Regala, W.M., Georgescu, A.M., Vergez, L.M., Land, M.L., Motin, V.L., Brubaker, R.R., Fowler, J., Hinnebusch, J., Marceau, M., Medigue, C., Simonet, M., Chenal-Francisque, V., Souza, B., Dacheux, D., Elliott, J. M., Derbise, A., Hauser, L.J., & Garcia, E. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A., 101, 13826–13831.

- 7) McClelland, M., Sanderson, K.E., Clifton, S.W., Latreille, P., Porwollik, S., Sabo, A., Meyer, R., Bieri, T., Ozersky, P., McLellan, M., Harkins, C.R., Wang, C., Nguyen, C., Berghoff, A., Elliott, G., Kohlberg, S., Strong, C., Du, F., Carter, J., Kremizki, C., Layman, D., Leonard, S., Sun, H., Fulton, L., Nash, W., Miner, T., Minx, P., Delehaunty, K., Fronick, C., Magrini, V., Nhan, M., Warren, W., Florea, L., Spieth, J., & Wilson, R.K. (2004) Nat. Genet., 36, 1268–1274.
- 8) Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., Bocs, S., Boursaux-Eude, C., Chandler, M., Charles, J.F., Dassa, E., Derose, R., Derzelle, S., Freyssinet, G., Gaudriault, S., Medigue, C., Lanois, A., Powell, K., Siguier, P., Vincent, R., Wingate, V., Zouine, M., Glaser, P., Boemare, N., Danchin, A., & Kunst, F. (2003) *Nat. Biotechnol.*, 21, 1307–1313.
- Chen, C.Y., Wu, K.M., Chang, Y.C., Chang, C.H., Tsai, H.C., Liao, T.L., Liu, Y.M., Chen, H.J., Shen, A.B., Li, J.C., Su, T. L., Shao, C.P., Lee, C.T., Hor, L.I., & Tsai, S.F. (2003) *Genome Res.*, 13, 2577–2587.
- 10) Harrison, A., Dyer, D.W., Gillaspy, A., Ray, W.C., Mungur, R., Carson, M.B., Zhong, H., Gipson, J., Gipson, M., Johnson, L.S., Lewis, L., Bakaletz, L.O., & Munson, R.S. Jr. (2005) J. Bacteriol., 187, 4627–4636.
- Nelson, K., Paulsen, I., Weinel, C., Dodson, R., Hilbert, H., Fouts, D., Gill, S., Pop, M., Martins Dos Santos, V., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J., Timmis, K., Duesterhoft, A., Tummler, B., & Fraser, C. (2002) *Environ. Microbiol.*, 4, 799–808.
- 12) Zimmermann, T., Kulla, H.G., & Leisinger, T. (1982) Eur. J. Biochem., 129, 197–203.
- 13) Zimmermann, T., Gasser, F., Kulla, H.G., & Leisinger, T. (1984) Arch. Microbiol., 138, 37–43.
- 14) Ghosh, D.K., Mandal, A., & Chaudhuri, J. (1992) FEMS Microbiol. Lett., 77, 229–233.
- 15) Ghosh, D.K., Ghosh, S., Sadhukhan, P., Mandal, A., & Chaudhuri, J. (1993) *Indian J. Exp. Biol.*, **31**, 951–954.
- 16) Rafii, F. & Cerniglia, C.E. (1993) Appl. Environ. Microbiol., 59, 1731–1734.
- 17) Suzuki, Y., Yoda, T., Ruhul, A., & Sugiura, W. (2001) J. Biol. Chem., 276, 9059–9065.
- 18) Moutaouakkil, A., Zeroual, Y., Zohra Dzayri, F., Talbi, M., Lee, K., & Blaghen, M. (2003) Arch. Biochem. Biophys., 413, 139–146.
- 19) Maier, J., Kandelbauer, A., Erlacher, A., Cavaco-Paulo, A., & Gubitz, G.M. (2004) Appl. Environ. Microbiol., 70, 837–844.
- 20) Ramalho, P.A., Paiva, S., Cavaco-Paulo, A., Casal, M., Cardoso, M.H., & Ramalho, M.T. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3882–3888.
- 21) Ito, K., Nakanishi, M., Lee, W.C., Sasaki, H., Zenno, S., Saigo, K., Kitade, Y., & Tanokura, M. (2005) Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun., 61, 399–402.
- 22) Ito, K., Nakanishi, M., Lee, W.C., Sasaki, H., Zenno, S., Saigo, K., Kitade, Y., & Tanokura, M. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 20567–20576.
- 23) Ito, K., Nakanishi, M., Lee, W.C., Zhi, Y., Sasaki, H., Zenno, S., Saigo, K., Kitade, Y., & Tanokura, M. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 13889–13896.

- 24) Faig, M., Bianchet, M.A., Talalay, P., Chen, S., Winski, S., Ross, D., & Amzel, L.M. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 3177–3182.
- 25) Bayney, R.M., Rodkey, J.A., Bennett, C.D., Lu, A.Y., & Pickett, C.B. (1987) J. Biol. Chem., 262, 572–575.
- 26) Posner, G.H., Cho, C.G., Green, J.V., Zhang, Y., & Talalay, P. (1994) J. Med. Chem., 37, 170–176.
- 27) Li, R., Bianchet, M.A., Talalay, P., & Amzel, L.M. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92, 8846–8850.
- 28) Muller, F. (1991) in Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes (Muller, F., ed.) Vol. 1, pp. 1–71, CRC Press, Inc.,

Boca Raton, FL.

- 29) Fraaije, M.W. & Mattevi, A. (2000) Trends Biochem. Sci., 25, 126–132.
- 30) Dixon, D.A., Lindner, D.L., Branchaud, B., & Lipscomb, W.N. (1979) *Biochemistry*, 18, 5770–5775.
- 31) Zheng, Y.J. & Ornstein, R.L. (1996) J. Am. Chem. Soc., 118, 9402–9408.
- 32) Nakai, S., Yoneda, F., & Yamabe, T. (1999) *Theor. Chem.* Acc., 103, 109–116.
- 33) Asher, G., Dym, O., Tsvetkov, P., Adler, J., & Shaul, Y. (2006) *Biochemistry*, 45, 6372–6378.