

芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの電子伝達におけるタンパク質間相互作用

Electron-Transfer Interaction in Aromatic Ring Oxygenase Systems

井上 謙吾^{1*}, 梅田 隆志², 松澤 淳², 野尻 秀昭²

KENGO INOUE, TAKASHI UMEDA, JUN MATSUZAWA and HIDEAKI NOJIRI

¹ 宮崎大学 IR 推進機構 〒 889-1692 宮崎県宮崎市清武町木原 5200

² 東京大学生物生産工学研究センター 環境保全工学部門 〒 113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

* TEL/FAX: 0985-85-1843

* E-mail: kinoue@cc.miyazaki-u.ac.jp

¹ *Interdisciplinary Research Organization, University of Miyazaki,
5200 Kihara, Kiyotake, Miyazaki, Miyazaki 889-1692, Japan*

² *Biotechnology Research Center, The University of Tokyo,
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan*

キーワード: 芳香族化合物, オキシゲナーゼ, 電子伝達

Key words: Aromatic compounds, Oxygenase, Electron transfer

(原稿受付 2012年10月22日/原稿受理 2012年10月31日)

1. はじめに

ベンゼンをはじめとしてトルエン, ニトロベンゼンなどの単環芳香族化合物やビフェニル, ナフタレン, カルバゾール, フェナントレンなど, 複数の芳香環を持つ化合物には難分解性, 変異原性を有する環境汚染物質が多く存在する。それらの芳香族化合物は微生物によって好氣的に分解されることが知られており, 芳香環への水酸化を初発反応とした分解代謝経路を経て TCA 回路に取り込まれ, 微生物の炭素源・エネルギー源として利用される。芳香族化合物の初発水酸化反応に関しては, 環境汚染物質分解を利用した環境浄化への応用を目的としてこれまでに詳細な研究がなされ, 古くからその遺伝子学的・酵素学的解析がなされてきた。芳香環水酸化ジオキシゲナーゼは, 微生物による芳香族化合物の初発酸化反応を触媒する酵素として多くの例が知られており, 芳香環に対して分子状酸素由来の酸素原子を2つの水酸基の形で *cis* 型に導入する反応を触媒することができる¹⁻³⁾。そのため, 環境浄化のみでなく部位特異的・立体選択的な反応によるキラル化合物の物質生産への応用に向けた研究もなされている。また, 基質・酵素の種類によっては水酸基1つのみの導入 (monooxygenation), 硫黄原子への水酸化 (sulfoxydation), 水酸基導入に伴う脱窒素化 (denitrification) や脱メチル化 (demethylation) を触媒できる例も報告されている (図1)⁴⁻⁶⁾。芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの酸化酵素コンポーネント (後述) は Rieske [2Fe-2S] クラスタと呼ばれる酸化還元中心と非ヘム鉄を補因子として持つため, Rieske non-heme iron oxygenase (RO), あるいは単に Rieske oxygenase と呼ばれている。芳香環水酸化ジオキシゲ

ナーゼは微生物のみならず, 植物や動物も同類酵素を持つことが知られており, 自然界に広く分布することが示されている。例えば, 植物ではクロロフィルの分解, 動物では細胞死, 分化, コレステロール代謝などの生体活動に極めて重要な機能を果たすことが知られている⁷⁻¹⁰⁾。

1998年に初めてナフタレンジオキシゲナーゼの酸化酵素コンポーネントの X 線結晶構造が報告されて以来¹¹⁾, X 線結晶構造解析による原子レベルでの反応メカニズムが解析され, 現在 Protein Data Bank に登録されている関連酵素は70を超えている (表1)。これまでの芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの研究例では, そのユニークな水酸化反応のメカニズム解明を目的として精力的な研究が行われており, 多くの知見が蓄積している。さらに, 反応に必須な電子の伝達メカニズムについても, 結晶構造解析に基づいた詳細な考察がなされている例も報告されている。本稿では, 芳香環水酸化ジオキシゲナーゼについてこれまでに明らかにされてきた知見からその特徴と機能を概説すると共に, 酸化反応に必須な電子伝達の分子 (原子) レベルでのメカニズムについても紹介する。

2. 芳香環水酸化ジオキシゲナーゼのコンポーネントと分類

芳香環水酸化ジオキシゲナーゼは実際に酸素添加反応を行う酸化酵素 (terminal oxygenase) と電子伝達コンポーネントから構成される (図2A)。電子伝達コンポーネントはレダクターゼ単独, あるいはレダクターゼとフェレドキシンから構成され, それら電子伝達コンポー

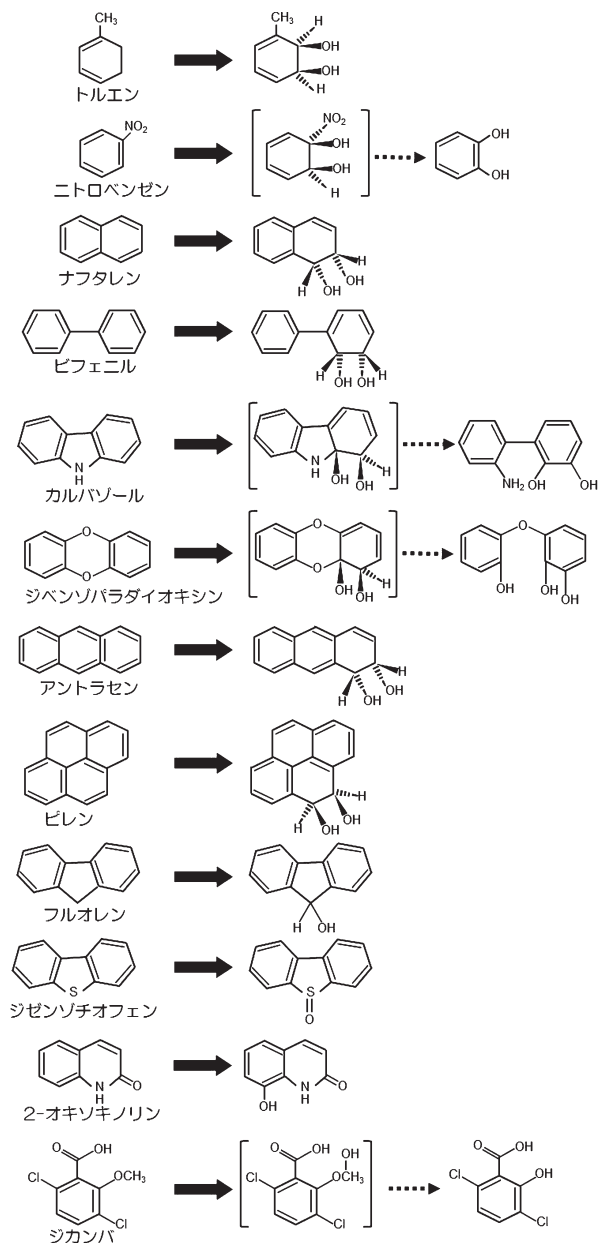


図1. 芳香環水酸化ジオキシゲナーゼが触媒する酸素添加反応の例

ネットは NAD(P)H からの電子を酸化酵素に伝える。酸化酵素は電子伝達コンポーネントからの電子によって分子内に取り込んだ酸素分子を活性化することで基質との反応を触媒する。どの芳香環水酸化ジオキシゲナーゼにおいても酸化酵素は **Rieske** クラスターと非ヘム鉄を持つことは共通する。しかし、電子伝達コンポーネントには多様性が存在するため、その数と種類に基づいて5種類に分類されている(表2)¹²⁾。電子伝達コンポーネントとしてフェレドキシンを持たず、レダクターゼのみのものはクラス I に分類される。レダクターゼが持つ補因子として、**FMN** と植物型 $[\text{2Fe-2S}]$ クラスターを持つものはクラス IA, **FAD** と植物型 $[\text{2Fe-2S}]$ クラスターを持つものはクラス IB に細分類され、どのレダクターゼも NAD(P)H 結合ドメインを有する。クラス I 以外の芳香環水酸化ジオキシゲナーゼは電子伝達コンポーネン

トとしてフェレドキシンとレダクターゼの2つを持ち、レダクターゼが補因子として **FAD** のみをもつ場合はクラス II, **FAD** に加えて植物型 $[\text{2Fe-2S}]$ クラスターも持つものはクラス III に分類される。クラス II の芳香環水酸化ジオキシゲナーゼのうちフェレドキシンがプチダレドキシン型, **Rieske** 型のはそれぞれ IIA, IIB に分類される。これまでに報告されている芳香環水酸化ジオキシゲナーゼのうち、クラス IIB に分類される例は最も多く、最も研究が進んでいるビフェニルジオキシゲナーゼもこの分類群に属する。また、上記のナフタレンジオキシゲナーゼはクラス III に分類される。

3. 酸化酵素の構造解析

芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの構造解析については、表2に示した各クラスの全てのコンポーネントは網羅できていないものの、相当数の立体構造が明らかになっている。特に、酸化酵素のX線結晶構造解析は精力的に行われており、ナフタレンジオキシゲナーゼ、ビフェニルジオキシゲナーゼ、カルバゾールジオキシゲナーゼをはじめとする多くの報告例がある(表1)。これまでX線結晶構造が決定された酸化酵素は全て $\alpha_3\beta_3$ 型、もしくは $\alpha_3\beta_3$ 型のサブユニット構造を持つ。ナフタレンジオキシゲナーゼやビフェニルジオキシゲナーゼをはじめとする多くの芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの酸化酵素は $\alpha_3\beta_3$ 型をとり、マッシュルーム型の立体構造を持つ。*Pseudomonas putida* NCIB9816-4株由来ナフタレンジオキシゲナーゼにおいては高さ75 Å, 傘, 柄の直径はそれぞれ102, 50 Åの分子サイズである(図2B)¹¹⁾。一方、 α_3 型の報告例は限られており、これまでにカルバゾールジオキシゲナーゼ、ジカンバモノオキシゲナーゼ、2-オキソキノリン8-モノオキシゲナーゼが報告されているのみで、それらの酸化酵素はドーナツ型あるいはリング型と呼ばれる立体構造を持つことが明らかになっている(図2A)。*Janthinobacterium* sp. J3株由来カルバゾールジオキシゲナーゼは厚さ45 Å, 外径100 Å, 内径30 Åのサイズで、酸化還元中心である**Rieske** クラスターと非ヘム鉄、及び、基質結合ポケットは全て α サブユニットに存在する¹³⁾。 $\alpha_3\beta_3$ 型の芳香環水酸化ジオキシゲナーゼにおいて、 β サブユニットは構造維持が主な役割と考えられているものの、*Pandoraea pnomenus* (以前は *Commamonas testosteroni*) B-356株においては基質特異性にも影響を与えることが知られており、単にホロ酵素としての役割のみではないことを示した例であるといえる¹⁴⁾。 α サブユニットは大きく分けて**Rieske** ドメインと触媒ドメイン二つに分けることができ、前者はフェレドキシンからの電子を受け取る**Rieske** クラスターが含まれ、後者は**Rieske** クラスターからの電子、酸素、基質が出会う場である基質ポケットを含みそこで酸素添加反応が触媒される¹⁵⁾。酸化酵素の三つの α サブユニットにおいて、一つのサブユニット内の**Rieske** クラスター (**Rieske** ドメイン中の酸化還元中心)は同じ分子内の活性中心(触媒ドメイン中の基質ポケット内)よりも隣接するサブユニットの活性中心との距離の方が近く、**Rieske** クラスターからの電子は隣のサブユニットの活性中心へと伝達されると考えられてい

表 1. 芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの酸化酵素と電子伝達コンポーネント関連酵素の X 線結晶構造解析例とその PDB コード

酵素	複合体の場合は その基質	由来菌株 *	クラス	PDB ID	参考文献
酸化酵素					
ナフタレンジオキシゲナーゼ	—	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	III	1NDO	11)
ナフタレンジオキシゲナーゼ	インドール	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	III	1EG9	30)
ナフタレンジオキシゲナーゼ	ナフタレン	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	III	1O7G	31)
ナフタレンジオキシゲナーゼ	—	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	III	1O7H	31)
(酸化型 Rieseke クラスタ)					
ナフタレンジオキシゲナーゼ	O ₂	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	III	1O7M	31)
ナフタレンジオキシゲナーゼ	インドール & O ₂	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	III	1O7N	31)
ナフタレンジオキシゲナーゼ	ナフタレンジヒドロジ オール	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	III	1O7P	31)
ナフタレンジオキシゲナーゼ	—	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	III	1O7W	31)
(還元型)					
ナフタレンジオキシゲナーゼ	NO	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	III	1UUW	32)
ナフタレンジオキシゲナーゼ	NO & インドール	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	III	1UUV	32)
ナフタレンジオキシゲナーゼ	—	<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB12038	III	2B1X	33)
ナフタレンジオキシゲナーゼ	インドール	<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB12038	III	2B24	33)
ナフタレンジオキシゲナーゼ	フェナントレン	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	III	2HMK	34)
ナフタレンジオキシゲナーゼ	—	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	III	2HMJ	34)
変異酵素 Phe352Val					
ナフタレンジオキシゲナーゼ	フェナントレン	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	III	2HML	34)
変異酵素 Phe352Val					
ナフタレンジオキシゲナーゼ	アントラセン	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	III	2HMM	34)
ナフタレンジオキシゲナーゼ	アントラセン	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	III	2HMN	34)
変異酵素 Phe352Val					
ナフタレンジオキシゲナーゼ	3-ニトロトルエン	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	III	2HMO	34)
ピフェニルジオキシゲナーゼ	—	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	IIB	1ULI	35)
ピフェニルジオキシゲナーゼ	ピフェニル	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	IIB	1ULJ	35)
ピフェニルジオキシゲナーゼ	—	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> B1	IIB	2GBW	36)
ピフェニルジオキシゲナーゼ	ピフェニル	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> B1	IIB	2GBX	36)
ピフェニルジオキシゲナーゼ	—	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	IIB	2XR8	37)
ピフェニルジオキシゲナーゼ	ピフェニル	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	IIB	2XRX	37)
ピフェニルジオキシゲナーゼ	—	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	IIB	2XSO	37)
変異酵素 P4					
ピフェニルジオキシゲナーゼ	2,6-ジクロロピフェニル	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	IIB	2XSH	37)
変異酵素 P4					
ピフェニルジオキシゲナーゼ	—	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	IIB	2YFI	38)
変異酵素 RR41					
ピフェニルジオキシゲナーゼ	ジベンゾフラン	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	IIB	2YFJ	38)
変異酵素 RR41					
ピフェニルジオキシゲナーゼ	—	<i>Pandoraea pnomenusa</i> B-356	IIB	3GZY	—
ピフェニルジオキシゲナーゼ	ピフェニル	<i>Pandoraea pnomenusa</i> B-356	IIB	3GZX	—
ピフェニルジオキシゲナーゼ	フェニルシクロヘキサ ジエンジオール	<i>Pandoraea pnomenusa</i> B-356	IIB	3GZZ	—
カルバゾールジオキシゲナーゼ	—	<i>Janthinobacterium</i> sp. J3	III	1WW9	13)
カルバゾールジオキシゲナーゼ	—	<i>Nocardioides aromaticivorans</i> IC177	IIB	3GCF	39)
カルバゾールジオキシゲナーゼ	—	<i>Novosphingobium</i> sp. KA1	IIA	3GKQ	—
ニトロベンゼンジオキシゲナーゼ	—	<i>Comamonas</i> sp. JS765	III	2BMO	40)
ニトロベンゼンジオキシゲナーゼ	ニトロベンゼン	<i>Comamonas</i> sp. JS765	III	2BMQ	40)
ニトロベンゼンジオキシゲナーゼ	3-ニトロトルエン	<i>Comamonas</i> sp. JS765	III	2BMR	40)
ジカンバモノオキシゲナーゼ	—	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DI-6	IIA	3GTE	41)
ジカンバモノオキシゲナーゼ	ジカンバ	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DI-6	IIA	3GTS	41)
ジカンバモノオキシゲナーゼ	コバルト & ジカンバ	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DI-6	IIA	3GB4	41)
ジカンバモノオキシゲナーゼ	コバルト & 3,6-ジクロロサリチル酸	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DI-6	IIA	3GOB	41)
ジカンバモノオキシゲナーゼ	—	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DI-6	IIA	3GKE	22)
ジカンバモノオキシゲナーゼ	ジカンバ	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DI-6	IIA	3GL2	22)

ジカンパモノオキシゲナーゼ	3,6-ジクロロサリチル酸	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DI-6	IIA	3GL0	22)
2-オキソキノリンモノオキシゲナーゼ (酸化型)	—	<i>Pseudomonas putida</i> 86	IB	1Z01	42)
2-オキソキノリンモノオキシゲナーゼ (還元型)	—	<i>Pseudomonas putida</i> 86	IB	1Z02	42)
2-オキソキノリンモノオキシゲナーゼ (酸化型)	2-オキソキノリン	<i>Pseudomonas putida</i> 86	IB	1Z03	42)
トルエンジオキシゲナーゼ	—	<i>Pseudomonas putida</i> F1	IIB	3EN1	43)
トルエンジオキシゲナーゼ (非ヘム鉄なし)	—	<i>Pseudomonas putida</i> F1	IIB	3EQQ	43)
クメンジオキシゲナーゼ	O ₂	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IIB	1WQL	44)
多環芳香族炭化水素ジオキシゲナーゼ	—	<i>Sphingomonas</i> sp. CHY-1	IIB	2CKF	45)
フェレドキシン					
ナフタレンジオキシゲナーゼ	—	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	III	2QPZ	46)
ピフェニルジオキシゲナーゼ	—	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	IIB	1FQT	23)
ピフェニルジオキシゲナーゼ	—	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> B1	IIB	2I7F	36)
ピフェニルジオキシゲナーゼ	—	<i>Pseudomonas (Acidovorax)</i> sp. KKS102	IIB	2E4P	27)
(酸化型)	—				
ピフェニルジオキシゲナーゼ	—	<i>Pseudomonas (Acidovorax)</i> sp. KKS102	IIB	2E4Q	27)
(還元型)	—				
カルバゾールジオキシゲナーゼ	—	<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10	III	1VCK	47)
カルバゾールジオキシゲナーゼ	—	<i>Nocardioideis aromaticivorans</i> IC177	IIB	3GCE	39)
トルエンジオキシゲナーゼ	—	<i>Pseudomonas putida</i> F1	IIB	3DQY	43)
レダクターゼ					
フタル酸ジオキシゲナーゼ	—	<i>Burkholderia cepacia</i> DB01	IA	2PIA	21)
安息香酸ジオキシゲナーゼ	—	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	IB	1KRH	48)
ピフェニルジオキシゲナーゼ	—	<i>Pseudomonas (Acidovorax)</i> sp. KKS102	IIB	1D7Y	24)
ピフェニルジオキシゲナーゼ	NADH	<i>Pseudomonas (Acidovorax)</i> sp. KKS102	IIB	1F3P	24)
ピフェニルジオキシゲナーゼ	—	<i>Pseudomonas (Acidovorax)</i> sp. KKS102	IIB	2GR2, 2GR3, 2GQW	27)
(酸化型)	—				
ピフェニルジオキシゲナーゼ	—	<i>Pseudomonas (Acidovorax)</i> sp. KKS102	IIB	2GR1, 2YVF	27)
(ハイドロキノン)	—				
ピフェニルジオキシゲナーゼ	—	<i>Pseudomonas (Acidovorax)</i> sp. KKS102	IIB	2YVG	27)
(セミキノン)	—				
ピフェニルジオキシゲナーゼ	NAD ⁺	<i>Pseudomonas (Acidovorax)</i> sp. KKS102	IIB	2GR0	27)
(再酸化型)	—				
トルエンジオキシゲナーゼ	—	<i>Pseudomonas putida</i> F1	IIB	3EF6	43)
電子伝達複合体					
ピフェニルジオキシゲナーゼ	—	<i>Pseudomonas (Acidovorax)</i> sp. KKS102	IIB	2YVJ	27)
レダクターゼとフェレドキシン					
カルバゾールジオキシゲナーゼ	—	<i>Janthinobacterium</i> sp. J3 (Oxy)	III	2DE5	28)
フェレドキシンと酸化酵素	—	<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10 (Fd)			
カルバゾールジオキシゲナーゼ	—	<i>Janthinobacterium</i> sp. J3 (Oxy)	III	2DE6	28)
フェレドキシンと酸化酵素 (還元型)	—	<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10 (Fd)			
カルバゾールジオキシゲナーゼ	カルバゾール	<i>Janthinobacterium</i> sp. J3 (Oxy)	III	2DE7	28)
フェレドキシンと酸化酵素	—	<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10 (Fd)			
カルバゾールジオキシゲナーゼ	カルバゾール	<i>Janthinobacterium</i> sp. J3 (Oxy)	III	3VMG	49)
フェレドキシンと酸化酵素 (還元型)	—	<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10 (Fd)			
カルバゾールジオキシゲナーゼ	O ₂	<i>Janthinobacterium</i> sp. J3 (Oxy)	III	3VMH	49)
フェレドキシンと酸化酵素 (再酸化型)	—	<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10 (Fd)			
カルバゾールジオキシゲナーゼ	カルバゾール & O ₂	<i>Janthinobacterium</i> sp. J3 (Oxy)	III	3VMI	49)
フェレドキシンと酸化酵素	—	<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10 (Fd)			

* Oxy: 酸化酵素, Fd: フェレドキシン

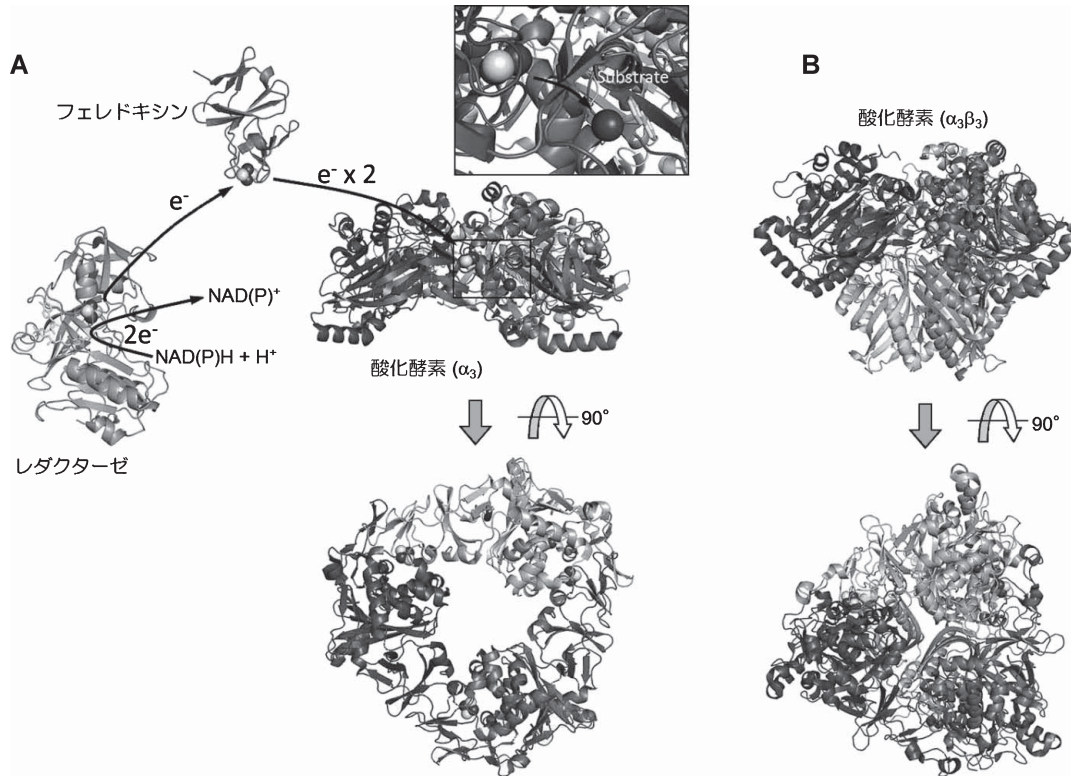


図2. 芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの酸化酵素と電子伝達コンポーネント. (A) カルバゾールジオキシゲナーゼ (クラス III) のシステム全体, (B) ナフタレンジオキシゲナーゼ (クラス III) の酸化酵素

表2. 電子伝達コンポーネントの特徴による芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの分類¹⁾

クラス	補欠分子族 ^a		
	酸化酵素	フェレドキシン	レダクターゼ
IA	[2Fe-2S] _R Fe ²⁺	—	FMN [2Fe-2S] _P
IB	[2Fe-2S] _R Fe ²⁺	—	FAD [2Fe-2S] _P
IIA	[2Fe-2S] _R Fe ²⁺	[2Fe-2S] _{Pu}	FAD
IIB	[2Fe-2S] _R Fe ²⁺	[2Fe-2S] _R	FAD
III	[2Fe-2S] _R Fe ²⁺	[2Fe-2S] _R	FAD [2Fe-2S] _P

^a Batie らの報告¹²⁾に従った

^b [2Fe-2S]_R: Rieske [2Fe-2S] クラスター, [2Fe:2S]_P: 植物型 [2Fe-2S] クラスター, [2Fe:2S]_{Pu}: プチダレドキシン型 [2Fe-2S] クラスター

る。Rieske ドメインはドメイン構造そのものが古くから知られる光合成電子伝達系や呼吸鎖中の Rieske 鉄硫黄タンパク質 (Rieske iron-sulfur protein) と類似した構造を持つため^{16,17)}, 酸化酵素の Rieske ドメインはそれら Rieske 鉄硫黄タンパク質と共通の祖先を持つものと考えられる。触媒ドメインの基質ポケット中心部には非ヘム鉄を含む活性中心が位置し、酸素の配位と基質が結合できる空間が存在する。基質結合ポケットの内側表面には疎水性残基が配置されており、同様に疎水的な基質である芳香族化合物との疎水性相互作用によって適した位置へ安定的な結合ができるような構造になっている。芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの種類によっては、基質の化学構造に応じてその位置と向きをより厳密に制御できる仕組みを持つものがある。その一例であるカルバゾール

ジオキシゲナーゼでは、カルバゾール中のイミノ基 (図1) と水素結合を形成する残基 (J3 株では Gly178) が存在し、基質の向きを固定する役割を果たしていると考えられる¹³⁾。芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの基質ポケットの構造と基質特異性に関する研究は、構造レベルでその詳細が明らかにされており、その情報に基づいて、ポケットを構成するあるいは周辺に位置するアミノ酸残基への変異導入などを行って基質特異性の改変を行っている例も数多く報告されている¹⁸⁻²⁰⁾。これら基質特異性に関する研究は、芳香環水酸化ジオキシゲナーゼのユニークな特徴の解明だけでなく、物質生産へ有用な反応を触媒できる酵素を創出できる可能性も秘めているため、多くの研究者が興味をもつところである。

4. 電子伝達コンポーネントの構造解析

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については、酸化酵素ほど例は多くないものの、結晶構造解析の報告例が存在する (表1)。上記、酸化酵素の Rieske ドメインと Rieske 型フェレドキシンが非常に似た立体構造を有することや、レダクターゼにおいてもやはりよく似た構造を持つタンパク質が高等生物を含めたあらゆる生物に保存され、呼吸鎖などの生命活動に必須な生理的機能を果たしていることが知られている。よって、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もそれらのタンパク質と進化的由来を共有するものと考えられる。

クラス I に属する芳香環水酸化ジオキシゲナーゼは

レダクターゼのみを電子伝達コンポーネントとして持ち、その立体構造として、クラス IA に分類される *Burkholderia cepacia* DB01 株由来フタル酸ジオキシゲナーゼ²¹⁾、及び、*Acinetobacter baylyi* ADP1 株由来安息香酸ジオキシゲナーゼ²²⁾ のレダクターゼコンポーネントが知られている。これらレダクターゼが持つ酸化還元中心 (FMN/FAD, 植物型 [2Fe-2S] クラスター) および NADH 結合ドメインはいずれも分子の中心部に位置し、電子伝達の際の酸化酵素との接触部分もこの中心部であることが予想されるが、現在までのところ、酸化酵素とレダクターゼが結合した複合体の状態での結晶構造は得られていないため、コンポーネント間の結合部位などの詳細については今後の研究成果を待たなければならない。

クラス II 及びクラス III に属する芳香環水酸化ジオキシゲナーゼはフェレドキシンとレダクターゼの二つの電子伝達コンポーネントを持ち、電子伝達コンポーネントそれぞれについて構造学的詳細が明らかにされている。RO のフェレドキシンの結晶構造として最初に報告されたのが *Burkholderia xenovorans* LB400 株由来 BphF (クラス IIB) であり、矢じりのような形状で、Rieske クラスターが先端にむき出しになる形で存在することが明らかになった²³⁾。これまでに LB400 株由来 BphF を含めて 8 種のフェレドキシンの結晶構造が報告されており (表 1)、いずれも BphF と類似した構造であった。しかし、*Novosphingobium* sp. KA1 株由来カルバゾールジオキシゲナーゼのフェレドキシンは、Rieske 型フェレドキシンではなく、プチダレドキシン型であり、矢じりの先端というよりは球状に近い形をしていた (Umeda et al., 投稿準備中)。この形状の違いは酸化酵素あるいはレダクターゼとの相互作用に影響を与えるものと考えられる。クラス II, III の芳香環水酸化ジオキシゲナーゼのレダクターゼのうち、結晶構造が初めて明らかになったのは、クラス IIB の *Pseudomonas (Acidovorax)* sp. KKS102 株由来ピフェニルジオキシゲナーゼのレダクターゼ

BphA4 であり²⁴⁾、NADH との複合体構造も同時に報告された。明らかになったレダクターゼの構造は、*Pseudomonas putida* 由来 P450cam (樟脳 [camphor] のモノオキシゲナーゼ) のプチダレドキシンレダクターゼとよく似た構造をしており、グルタチオンレダクターゼファミリーと呼ばれる一連の還元酵素と同様の基本構造をとっていた。芳香環水酸化ジオキシゲナーゼでは、その他にも *Novosphingobium* sp. KA1 株由来カルバゾールジオキシゲナーゼ (クラス IIA) (Umeda et al., 投稿準備中)、*Pseudomonas putida* F1 株由来トルエンジオキシゲナーゼ (クラス IIB)、*Janthinobacterium* sp. J3 株由来カルバゾールジオキシゲナーゼ (クラス III) (未発表データ) のレダクターゼについて結晶構造が明らかにされている (表 1)。

5. 結晶構造からみたコンポーネント間電子伝達

芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの活性には酸化酵素への電子の供給が必要であり、その役割を担うのが電子伝達コンポーネントである。コンポーネント間で電子の伝達が行われるために、それぞれのコンポーネントが持つ酸化還元中心の接近と結合、及び、酸化還元中心の酸化還元電位 (表 3) が重要な因子となる。コンポーネント間の相互作用には、立体的障害なく結合でき、また、イオン結合、疎水結合、水素結合などの共有結合ではない比較的弱い結合力で結合状態を形成する必要がある。なぜなら、酵素反応を繰り返すにあたり電子伝達コンポーネントは電子を渡した後に、再度他の分子より電子を受け取って還元されなければならない、そのためには結合と解離を繰り返す必要があるからである。酸化還元電位においては、一般的に低いものから高いものへ電子が伝達されるため、電子を受容する側は電子を供与する側よりも酸化還元電位が高い必要がある。芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの各コンポーネントの酸化還元電位については、限られた数ではあるが報告されている例が存在する

表 3. 芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの酸化還元電位 (標準水素電極に換算した値)*

クラス	酵素名	由来菌株	Red (mV[E°])	Fd (mV[E°])	Oxy (mV[E°])	文献
IA	フタル酸ジオキシゲナーゼ	<i>Pseudomonas cepacia</i>	-287 (FMN _{sq/hq}) -174 (FMN _{ox/sq}) -174 ([2Fe-2S])	—	-150, -220	50, 51)
	ハロベンゾエイトジオキシゲナーゼ	<i>Burkholderia cepacia</i> 2CBS	-200	—	-125	52)
IB	アントラニル酸ジオキシゲナーゼ	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	報告なし	報告なし	-86	53)
	2-オキシキノリン-8-モノオキシゲナーゼ	<i>Pseudomonas putida</i> 86	-180	報告なし	-100	4)
IIA	ダイオキシンジオキシゲナーゼ	<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1	報告なし	-245, -247	報告なし	54, 55)
	ジカンバモノオキシゲナーゼ	<i>Pseudomonas maltophilia</i> DI-6	報告なし	-171	-21	56)
IIB	ピフェニルジオキシゲナーゼ	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	報告なし	-157	報告なし	57)
	ベンゼンジオキシゲナーゼ	<i>Pseudomonas putida</i>	報告なし	-155	-112	58)
	カルバゾールジオキシゲナーゼ	<i>Nocardoides aromaticivorans</i> IC177	報告なし	-185	報告なし	39)
	トルエンジオキシゲナーゼ	<i>Pseudomonas putida</i> F1	報告なし	-109	報告なし	59)
III	カルバゾールジオキシゲナーゼ	<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10	報告なし	-169	報告なし	47)
	ナフタレンジオキシゲナーゼ	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIB9816-4	報告なし	-150	報告なし	46)

* Red : レダクターゼ, Fd : フェレドキシン, Oxy : 酸化酵素

(表3)。酵素によってある程度のばらつきはあるものの、概ね酸化酵素が電子伝達コンポーネントよりも高い傾向にある。表3に挙げたいずれの酵素においても酸化酵素の Rieske クラスターの酸化還元電位は、ミトコンドリア *bc₁* complex の Rieske クラスターや P450 と比較して 100~250 mV 程度低く、この傾向は芳香環水酸化ジオキシゲナーゼに特徴的である。ちなみに、Rieske [2Fe-2S] クラスターの酸化還元電位を決める要因は酸化還元中心のリガンド (S, Fe 原子) への水素結合の数や pH などクラスターの電子状態に影響を受けることが知られている^{25,26)}。

現在までのところ、RO のコンポーネント間電子伝達について二つの異なるコンポーネント複合体の結晶構造が得られた例は、*Pseudomonas (Acidovorax) sp. KKS102* 株由来ビフェニルジオキシゲナーゼのレダクターゼ BphA4 とフェレドキシン BphA3 の複合体²⁷⁾、及び、*Janthinobacterium sp. J3* 株由来カルバゾールジオキシゲナーゼの酸化酵素と *Pseudomonas resinovorans CA10* 株由来カルバゾールジオキシゲナーゼのフェレドキシンの複合体²⁸⁾ の2つが報告されている。これらの複合体構造からは、それぞれのタンパク質の相互作用位置、結合力についての情報に加え、結合による構造変化の詳細が明らかになった。

BphA4 と BphA3 の複合体構造では、BphA4 の中心部分に BphA3 が疎水性相互作用 (BphA4 の4つのトリプトファン残基、BphA3 の2つのプロリン残基)、イオン結合 (BphA4 の負の電荷をもつ残基と BphA3 の正の電荷をもつ残基)、及び、複数の水素結合により結合していた。また、その電子伝達経路については、BphA4 からの電子は BphA4 の Trp320 から BphA3 の His66 (Rieske クラスターのリガンドの一つ) を介して BphA3 の Rieske クラスターへと伝えられることが示唆された。BphA4、BphA3 それぞれ単独の結晶構造と比較すると、複合体では、BphA4 の NADH と C 末端側ドメインの回転、BphA3 の His66 側鎖のペプチド結合の回転などの違いが観察され、レダクターゼとフェレドキシンの結合によって部分的な構造変化が起こることが分かった。さらに、異なる酸化還元状態での構造を比較したところ、BphA3、BphA4 共に酸化還元状態での構造変化が起こることが明らかとなり、これにより互いの結合状態の形成のしやすさが制御されていることが示唆された。また、BphA4 の補因子である FAD は分子全体に渡りダイナミックに構造変化をしていることも明らかになった。

もう一つの電子伝達複合体の結晶構造の例であるカルバゾールジオキシゲナーゼでは、酸化酵素とフェレドキシンが結合時に形成する結合力についての詳細が明らかとなっている。カルバゾールジオキシゲナーゼの酸化酵素は α_3 型の四次構造をとり、3量体では3か所のフェレドキシンとの結合部位を有する。そのため、得られた複合体構造においても3つのフェレドキシンが3量体の酸化酵素の結合した形で得られた (図3)。フェレドキシンはその先端の Rieske クラスターの部分を接触面として酸化酵素の Rieske クラスターに向けて突き刺さるように結合していた。フェレドキシンと酸化酵素の結合部位は4カ所に渡り、合計で4対のイオン結合、3つの疎水結合の他に複数の水素結合が観察された。また、上

記レダクターゼとフェレドキシンの複合体と同様、レダクターゼ、フェレドキシンそれぞれ単独の結晶構造との比較により、複合体形成に伴った構造変化が明らかになった。フェレドキシンにおいては、Pro66~Gly70 の間で大きな変化が認められ、中でも Phe67 ではその疎水性側鎖の方向が変化して酸化酵素との疎水結合を形成していた。一方、酸化酵素では Arg11、Glu353 の側鎖が移動してフェレドキシンの His68 の側鎖、主鎖と水素結合を形成していた。カルバゾールジオキシゲナーゼのフェレドキシン-酸化酵素複合体については、フェレドキシンの Rieske クラスターから酸化酵素の Rieske クラスターへの電子伝達経路が予想されている (図3)。フェレドキシンの Rieske クラスターのリガンドから酸化酵素のそれとは 12-13 Å の距離があるが、これはトンネル効果による電子移動が起こり得る範囲 (14 Å : 溶媒中でのタンパク質) 以内でもある²⁹⁾。

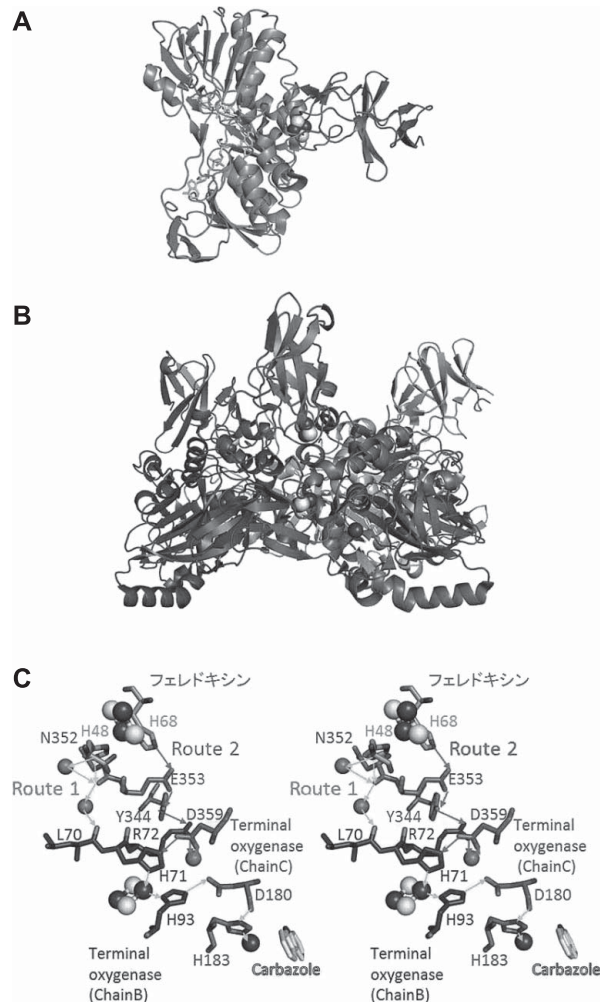


図3. 芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの電子伝達複合体 (A: *Acidovorax sp. KKS102* 株由来ビフェニルジオキシゲナーゼのレダクターゼ-フェレドキシン複合体, B: *Janthinobacterium sp. J3* 株由来カルバゾールジオキシゲナーゼの酸化酵素と *Pseudomonas resinovorans CA10* 株由来カルバゾールジオキシゲナーゼのフェレドキシンの複合体) と (C) カルバゾールジオキシゲナーゼにおけるフェレドキシン-酸化酵素間予想電子伝達経路。

6. おわりに

芳香族化合物を分解する細菌に関する研究から詳細が明らかになってきた芳香環水酸化ジオキシゲナーゼであったが、その報告例は年々増加し、遺伝的多様性のみならず、機能的な多様性、生物種を超えて広く分布していることも報告されてきた。その機能のユニークさが基質特異性にあり、多くの研究者が基質認識機構や酵素の改変に注力するのは当然である。その一方で、活性に必要な還元力を供給するための電子伝達鎖についての研究となると、その報告例は比較的少ない。しかし、その進化的背景や生物普遍性を鑑みると、非常に興味深く、また、芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの物質生産への応用を考えた場合、無視することはできないのは明白である。最近では、電子伝達コンポーネント同士を連結した融合タンパク質の創生が試みられた例もあり（福光ら2012年、農芸化学会大会）、今後も、酸化酵素だけでなく電子伝達コンポーネントを含めた芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの高機能化へ向けた研究は精力的に行われていくものと考えられる。

文 献

- Boyd, D.R. and G.N. Sheldrake. 1998. The Dioxygenase-catalysed formation of vicinal cis-diols. *Nat. Prod. Rep.* 15: 309–324.
- Gibson, D.T. and R.E. Parales. 2000. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 236–243.
- Ullrich, R. and M. Hofrichter. 2007. Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 271–293.
- Rosche, B., S. Fetzner, F. Lingens, W. Nitschke, and A. Riedel. 1995. The 2Fe2S centres of the 2-oxo-1,2-dihydroquinoline 8-monooxygenase from *Pseudomonas putida* 86 studied by EPR spectroscopy. *Bioch. Biophys. Acta* 1252: 177–179.
- Herman, P.L., M. Behrens, S. Chakraborty, B.M. Chrastil, J. Barycki, and D.P. Weeks. 2005. A Three-component Dicamba O-Demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, Strain DI-6. *J. Biol. Chem.* 280: 24759–24767.
- Nojiri, H. 2012. Structural and molecular genetic analyses of the bacterial carbazole degradation system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76: 1–18.
- Gray, J., P.S. Close, S.P. Briggs, and G.S. Johal. 1997. A novel suppressor of cell death in plants encoded by the *Lls1* gene of maize. *Cell* 89: 25–31.
- Tanaka, A., H. Ito, R. Tanaka, N.K. Tanaka, K. Yoshida, and K. Okada. 1998. Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12719–12723.
- Yoshiyama, T., T. Namiki, K. Mita, H. Kataoka, and R. Niwa. 2006. Neverland is an evolutionally conserved Rieske-domain protein that is essential for ecdysone synthesis and insect growth. *Development* 133: 2565–2574.
- Yoshiyama-Yanagawa, T., S. Enya, Y. Shimada-Niwa, S. Yaguchi, Y. Haramoto, T. Matsuya, K. Shiomi, Y. Sasakura, S. Takahashi, M. Asashima, H. Kataoka, and R. Niwa. 2011. The conserved Rieske oxygenase DAF-36/Neverland is a novel cholesterol-metabolizing enzyme. *J. Biol. Chem.* 286: 25756–25762.
- Kauppi, B., K. Lee, E. Carredano, R.E. Parales, D.T. Gibson, H. Eklund, and S. Ramaswamy. 1998. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure* 6: 571–586.
- Batie, C.J., D.P. Ballou, and C.C. Correll. 1991. *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, Volume 3, Muller F. (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida. 543–556.
- Nojiri, H., Y. Ashikawa, H. Noguchi, J.W. Nam, M. Urata, Z. Fujimoto, H. Uchimura, T. Terada, S. Nakamura, K. Shimizu, T. Yoshida, H. Habe, and T. Omori. 2005. Structure of the terminal oxygenase component of angular dioxygenase, carbazole 1,9a-dioxygenase. *J. Mol. Biol.* 351: 355–370.
- Hurtubise, Y., D. Barriault, and M. Sylvestre. 1998. Involvement of the terminal oxygenase beta subunit in the biphenyl dioxygenase reactivity pattern toward chlorobiphenyls. *J. Bacteriol.* 180: 5828–5835.
- Ferraro, D.J., L. Gakhar, and S. Ramaswamy. 2005. Rieske business: structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 175–190.
- Carrell, C.J., H. Zhang, W.A. Cramer, and J.L. Smith. 1997. Biological identity and diversity in photosynthesis and respiration: structure of the lumen-side domain of the chloroplast Rieske protein. *Structure* 5: 1613–1625.
- Iwata, S., M. Saynovits, T.A. Link, and H. Michel. 1996. Structure of a water soluble fragment of the ‘Rieske’ iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome *bc1* complex determined by MAD phasing at 1.5 Å resolution. *Structure* 4: 567–579.
- Furukawa, K. and H. Fujihara. 2008. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls: biochemical and molecular features. *J. Biosci. Bioeng.* 105: 433–449.
- Parales, R.E. and J.L. Ditty. 2005. Laboratory evolution of catabolic enzymes and pathways. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 315–325.
- Uchimura, H., T. Horisaki, T. Umeda, H. Noguchi, Y. Usami, L. Li, T. Terada, S. Nakamura, K. Shimizu, T. Takemura, H. Habe, K. Furihata, T. Omori, H. Yamane, and H. Nojiri. 2008. Alteration of the substrate specificity of the angular dioxygenase carbazole 1,9a-dioxygenase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 3237–3248.
- Correll, C.C., C.J. Batie, D.P. Ballou, and M.L. Ludwig. 1992. Phthalate dioxygenase reductase: a modular structure for electron transfer from pyridine nucleotides to [2Fe-2S]. *Science* 258: 1604–1610.
- Dumitru, R., W.Z. Jiang, D.P. Weeks, and M.A. Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: a Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *J. Mol. Biol.* 392: 498–510.
- Colbert, C.L., M.M. Couture, L.D. Eltis, and J.T. Bolin. 2000. A cluster exposed: structure of the Rieske ferredoxin from biphenyl dioxygenase and the redox properties of Rieske Fe-S proteins. *Structure* 8: 1267–1278.
- Senda, T., T. Yamada, N. Sakurai, M. Kubota, T. Nishizaki, E. Masai, M. Fukuda, and Y. Mitsuidagger. 2000. Crystal structure of NADH-dependent ferredoxin reductase component in biphenyl dioxygenase. *J. Mol. Biol.* 304: 397–410.
- Hunsicker-Wang, L.M., A. Heine, Y. Chen, E.P. Luna, T. Todaro, Y.M. Zhang, P.A. Williams, D.E. McRee, J. Hirst, C.D. Stout, and J.A. Fee. 2003. High-resolution structure of the soluble, respiratory-type Rieske protein from *Thermus thermophilus*: analysis and comparison. *Biochemistry* 42: 7303–7317.
- Dey, A., F.E. Jr. Jenney, M.W. Adams, E. Babini, Y. Takahashi, K. Fukuyama, K.O. Hodgson, B. Hedman, and E.I. Solomon. 2007. Solvent tuning of electrochemical potentials in the active sites of HiPIP versus ferredoxin. *Science* 318: 1464–1468.
- Senda, M., S. Kishigami, S. Kimura, M. Fukuda, T. Ishida, and T. Senda. 2007. Molecular Mechanism of the Redox-dependent Interaction between NADH-dependent ferredoxin reductase and Rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin. *J. Mol. Biol.* 373: 382–400.
- Ashikawa, Y., Z. Fujimoto, H. Noguchi, H. Habe, T. Omori, H. Yamane, and H. Nojiri. 2006. Electron transfer complex formation between oxygenase and ferredoxin components in Rieske nonheme iron oxygenase system. *Structure* 14: 1779–1789.

- 29) Page, C.C., C.C. Moser, X. Chen, and P.L. Dutton. 1999. Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* 402: 47–52.
- 30) Carredano, E., A. Karlsson, B. Kauppi, D. Choudhury, R.E. Parales, J.V. Parales, K. Lee, D.T. Gibson, H. Eklund, and S. Ramaswamy. 2000. Substrate binding site of naphthalene 1,2-dioxygenase: functional implications of indole binding. *J. Mol. Biol.* 296: 701–712.
- 31) Karlsson, A., J.V. Parales, R.E. Parales, D.T. Gibson, H. Eklund, and S. Ramaswamy. 2003. Crystal structure of naphthalene dioxygenase: side-on binding of dioxygen to iron. *Science* 299: 1039–1042.
- 32) Karlsson, A., J.V. Parales, R.E. Parales, D.T. Gibson, H. Eklund, and S. Ramaswamy. 2005. NO binding to naphthalene dioxygenase. *J. Biol. Inorg. Chem.* 10: 483–489.
- 33) Gakhar, L., Z.A. Malik, C.C. Allen, D.A. Lipscomb, M.J. Larkin, and S. Ramaswamy. 2005. Structure and increased thermostability of *Rhodococcus* sp. naphthalene 1,2-dioxygenase. *J. Bacteriol.* 187: 7222–7231.
- 34) Ferraro, D.J., A.L. Okerlund, J.C. Mowers, and S. Ramaswamy. 2006. Structural basis for regioselectivity and stereoselectivity of product formation by naphthalene 1,2-dioxygenase. *J. Bacteriol.* 188: 6986–6994.
- 35) Furusawa, Y., V. Nagarajan, M. Tanokura, E. Masai, M. Fukuda, and T. Senda. 2004. Crystal structure of the terminal oxygenase component of biphenyl dioxygenase derived from *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *J. Mol. Biol.* 342: 1041–1052.
- 36) Ferraro, D.J., E.N. Brown, C.L. Yu, R.E. Parales, D.T. Gibson, and S. Ramaswamy. 2007. Structural investigations of the ferredoxin and terminal oxygenase components of the biphenyl 2,3-dioxygenase from *Sphingobium yanoikuyae* B1. *BMC Struct. Biol.* 7: 10.
- 37) Kumar, P., M. Mohammadi, J.F. Viger, D. Barriault, L. Gomez-Gil, L.D. Eltis, J.T. Bolin, and M. Sylvestre. 2011. Structural insight into the expanded PCB-degrading abilities of a biphenyl dioxygenase obtained by directed evolution. *J. Mol. Biol.* 405: 531–547.
- 38) Mohammadi, M., J.F. Viger, P. Kumar, D. Barriault, J.T. Bolin, and M. Sylvestre. 2011. Retuning Rieske-type oxygenases to expand substrate range. *J. Biol. Chem.* 286: 27612–27621.
- 39) Inoue, K., Y. Ashikawa, T. Umeda, M. Abo, J. Katsuki, Y. Usami, H. Noguchi, Z. Fujimoto, T. Terada, H. Yamane, and H. Nojiri. 2009. Specific interactions between the ferredoxin and terminal oxygenase components of a class IIB Rieske non-heme iron oxygenase, carbazole 1,9a-dioxygenase. *J. Mol. Biol.* 392: 436–451.
- 40) Friemann, R., M.M. Ivkovic-Jensen, D.J. Lessner, C.-L. Yu, D.T. Gibson, R.E. Parales, H. Eklund, and S. Ramaswamy. 2005. Structural insight into the dioxygenation of nitroarene compounds: the crystal structure of nitrobenzene dioxygenase. *J. Mol. Biol.* 348: 1139–1151.
- 41) D'Ordine, R.L., T.J. Rydel, M.J. Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasiniski, and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *J. Mol. Biol.* 392: 481–497.
- 42) Martins, B.M., T. Svetlitchnaia, and H. Dobbek. 2005. 2-Oxoquinoline 8-Monooxygenase oxygenase component: active site modulation by Rieske-[2Fe-2S] center oxidation/reduction. *Structure* 13: 817–824.
- 43) Friemann, R., K. Lee, E.N. Brown, D.T. Gibson, H. Eklund, and S. Ramaswamy. 2009. Structures of the multicomponent Rieske non-heme iron toluene 2,3-dioxygenase enzyme system. *Acta Crystallog. Sect. D* 65: 24–33.
- 44) Dong, X., S. Fushinobu, E. Fukuda, T. Terada, S. Nakamura, K. Shimizu, H. Nojiri, T. Omori, H. Shoun, and W. Wakagi. 2005. Crystal structure of the terminal oxygenase component of cumene dioxygenase from *Pseudomonas fluorescens* IP01. *J. Bacteriol.* 187: 2483–2490.
- 45) Jakoncic, J., Y. Jouanneau, C. Meyer, and V. Stojanoff. 2007. The crystal structure of the ring-hydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1. *FEBS J.* 274: 2470–2481.
- 46) Brown, E.N., R. Friemann, A. Karlsson, J.V. Parales, M.M. Couture, L.D. Eltis, and S. Ramaswamy. 2008. Determining Rieske cluster reduction potentials. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13: 1301–1313.
- 47) Nam, J.-W., H. Noguchi, Z. Fujimoto, H. Mizuno, Y. Ashikawa, M. Abo, S. Fushinobu, N. Kobashi, T. Wakagi, K. Iwata, T. Yoshida, H. Habe, H. Yamane, T. Omori, and H. Nojiri. 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.
- 48) Karlsson, A., Z.M. Beharry, D. Matthew Eby, E.D. Coulter, E.L. Neidle, D.M. Jr Kurtz, H. Eklund, and S. Ramaswamy. 2002. X-ray crystal structure of benzoate 1,2-dioxygenase reductase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J. Mol. Biol.* 318: 261–272.
- 49) Ashikawa, Y., Z. Fujimoto, Y. Usami, K. Inoue, H. Noguchi, H. Yamane, and H. Nojiri. 2012. Structural insight into the substrate- and dioxygen-binding manner in the catalytic cycle of Rieske nonheme iron oxygenase system, carbazole 1,9a-dioxygenase. *BMC Struct. Biol.* 12: 15.
- 50) Gassner, G.T., M.L. Ludwig, D.L. Gatti, C.C. Correll, and D.P. Ballou. 1995. Structure and mechanism of the iron-sulfur flavoprotein phthalate dioxygenase reductase. *FASEB J.* 9: 1411–1418.
- 51) Tarasev, M., A. Pinto, D. Kim, S.J. Elliott, and D.P. Ballou. 2006. The “bridging” aspartate 178 in phthalate dioxygenase facilitates interactions between the Rieske center and the iron(II)—mononuclear center. *Biochemistry* 45: 10208–10216.
- 52) Riedel, A., S. Fetzner, M. Rampp, F. Lingens, U. Liebl, J.L. Zimmermann, and W. Nitschke. 1995. EPR, electron spin echo envelope modulation, and electron nuclear double resonance studies of the 2Fe2S centers of the 2-halobenzoate 1,2-dioxygenase from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* 2CBS. *J. Biol. Chem.* 270: 30869–30873.
- 53) Beharry, Z.M., D.M. Eby, E.D. Coulter, R. Viswanathan, E.L. Neidle, R.S. Phillips, and D.M. Jr Kurtz. 2003. Histidine ligand protonation and redox potential in the rieske dioxygenases: role of a conserved aspartate in anthranilate 1,2-dioxygenase. *Biochemistry* 42: 13625–13636.
- 54) Armengaud, J. and K.N. Timmis. 1997. Molecular characterization of Fdx1, a putidaredoxin-type [2Fe-2S] ferredoxin able to transfer electrons to the dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. RW1. *Eur. J. Biochem.* 247: 833–842.
- 55) Armengaud, J., J. Gaillard, and K.N. Timmis. 2000. A second [2Fe-2S] ferredoxin from *Sphingomonas* sp. strain RW1 can function as an electron donor for the dioxin dioxygenase. *J. Bacteriol.* 182: 2238–2244.
- 56) Chakraborty, S., M. Behrens, P.L. Herman, A.F. Arendsen, W.R. Hagen, D.L. Carlson, X.Z. Wang, and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba O-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: purification and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 437: 20–28.
- 57) Couture, M.M., C.L. Colbert, E. Babini, F.I. Rosell, A.G. Mauk, J.T. Bolin, and L.D. Eltis. 2001. Characterization of BphF, a Rieske-type ferredoxin with a low reduction potential. *Biochemistry* 40: 84–92.
- 58) P.J. Geary, F. Saboowalla, D. Patil, and R. Cammack. 1984. An investigation of the iron-sulphur proteins of benzene dioxygenase from *Pseudomonas putida* by electron-spin-resonance spectroscopy. *Biochem. J.* 217: 667–673.
- 59) Subramanian, V., T.N. Liu, W.K. Yeh, C.M. Serdar, L.P. Wackett, and D.T. Gibson. 1985. Purification and properties of ferredoxinTOL. A component of toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1. *J. Biol. Chem.* 260: 2355–2363.