

結晶構造解析が解き明かす芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの 基質認識と電子伝達メカニズム

Molecular Bases of Substrate Recognition and Inter-Component Electron Transfer of Aromatic Ring-Hydroxylating Oxygenases

芦川 雄二¹, 井上 謙吾¹, 香月 隼一¹, 宇佐美裕亮¹, 野口 治子^{1,2}, 野尻 秀昭^{1,2*}
YUJI ASHIKAWA¹, KENGO INOUE¹, JUNICHI KATSUKI¹, YUSUKE USAMI¹, HARUKO NOGUCHI^{1,2} and HIDEAKI NOJIRI^{1,2*}

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 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

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

* TEL: 03-5841-3064 FAX: 03-5841-8030

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

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

² Professional Programme for Agricultural Bioinformatics, The University of Tokyo,
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

キーワード: 芳香環水酸化ジオキシゲナーゼ, Rieske non-heme iron oxygenase, 基質認識,
タンパク質間相互作用, 電子伝達

Key words: Ring-hydroxylating oxygenase, Rieske non-heme iron oxygenase, substrate recognition,
protein-protein interaction, electron transfer

(原稿受付 2006年10月13日/原稿受理 2006年11月12日)

1. はじめに

長い間、芳香族化合物が微生物により分解を受けることが知られていたが、Rieske non-heme iron oxygenase system (略語として、ROS あるいは 'system' を除いた場合の 'RO' が使われる。本総説内では 'ROS' を使用する) が触媒する二原子酸素添加反応が芳香族化合物分解に重要な役割を果たすことが知られるようになったのは1968年以降のことである^{3,18)}。この酵素は、多くの芳香族化合物分解経路での最初の反応である *cis* 型二水酸化反応 (「最初の酸化反応」ということで「初発酸化反応」と呼ばれる) を触媒する。この反応の発見に際しては、*Pseudomonas* 属の菌体そのものを用いた Gibson らによる初期の先導的な研究が重要な役割を果たし、カテコール (benzene-1,2-diol) 型化合物ができる前に *cis*-dihydrodiol 型中間体が生成すること (*cis*-dihydroxylation, lateral dioxygenation と呼ばれる)、分子状酸素が二つの水酸基中の酸素原子になること、NAD(P)H が還元力として利用されることが明らかにされた^{16,18)}。また、この反応は、当時からは乳類細胞でよく知られていた cytochrome P450 モノオキシゲナーゼによる反応とは異なる反応であり、naphthalene と toluene がそれぞれ立体選択的に純粋な (+)-*cis*-(1R,2S)-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene と (+)-*cis*-1,2-dihydroxy-3-methylcyclohexa-3,5-diene へと変換されることも示された^{17,25,26,54)}。現在では、toluene

や naphthalene に加えてベンゼン・クメン・フェナントレン・ピレン等の単環・多環の芳香族炭化水素に限らず、ダイオキシン・ジベンゾチオフェン・カルバゾールなどのヘテロ環式芳香族化合物、PCB 等のビフェニル環化合物等の種々の芳香族化合物の好氣的代謝経路において、ROS が初発酸化酵素として一連の分解反応の進行の有無を左右する重要な役割を果たしていることが明らかにされている^{13,20,33,41,45)}。また、ROS を芳香環修飾酵素ととらえれば、部位特異的・立体選択的な反応によるキラルな物質生産への応用が考えられる。これも、多くの研究者が ROS に興味を持つ大きな要因となっている¹⁹⁾。

さて、ROS は酸素添加酵素の一種であり、同じく芳香族化合物分解経路に登場するカテコール化合物の環開裂を触媒するオルト開裂酵素 (intradiol dioxygenase や intradiol-cleaving catechol dioxygenase と呼ばれる) やメタ開裂酵素 (extradiol dioxygenase や extradiol-cleaving catechol dioxygenase と呼ばれる) と区別するために、芳香環水酸化ジオキシゲナーゼ (aromatic ring-hydroxylating dioxygenase) と呼ばれることもある。この酵素は、基質を認識し酸化反応を行う酸化酵素 (terminal oxygenase, TO) と、電子を NAD(P)H から TO に伝える電子伝達系から構成される多成分酵素である。TO が活性中心の非ヘム鉄 (Fe^{2+}) と、電子伝達系から電子を受け取るための Rieske 型 [2Fe-2S] クラスター (R 型クラスター)⁴⁷⁾ を含むことが、Rieske non-heme iron oxygenase system という

名前の由来となっている。ROS の電子伝達系は、NAD(P)H から電子を受け取るレダクターゼ (Red) 単独で構成される場合と、Red とフェレドキシン (Fdx) の二つで構成される場合がある。

細菌は、芳香族化合物への曝露とそれへの適応・進化を通して、多種多様な ROS を生み出してきたと考えられる。2006年8月末現在、約40種の化合物の分解菌から400種ほどの ROS が単離されている。ROS 機能のメカニズム解明研究のターゲットとしては、基質特異性決定機構の解明と後述する Batie の class⁴⁾ に代表される電子伝達様式多様化の分子基盤解明の2つの切り口が考えられる。最近、ROS コンポーネントの X 線結晶構造解析の報告が増えつつあり⁹⁾、これらの構造情報は、今まで直接的な解析が困難だった基質特異性・コンポーネント間相互作用と電子伝達メカニズムの解明に大きく寄与しつつある。本稿では、著者等が行っているカルバゾール (CAR) 分解系の ROS である carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) を用いた研究を中心に最新のトピックを概説する。

2. 電子伝達系の相違に基づく ROS の類型化

Batie らは、電子伝達鎖の相違を基に ROS の分類を提

唱した⁴⁾ (表1)。Class I 型の ROS は Fdx を持たず、TO と Red のみで構成される二成分酵素系である。Red は、plant 型 [2Fe-2S] クラスタ (P 型クラスタ)⁴⁾ とフラビン (FMN [class IA], FAD [class IB]) を含む。他の ROS は TO, Fdx, Red の3つのコンポーネントから構成され、Red が FAD のみを含むか (class II), FAD に加えて P 型クラスタをも含むか (class III) で区別できる。Class II に分類される ROS の場合、Fdx の大部分は R 型クラスタを含むが、一部、putidaredoxin 型 [2Fe-2S] クラスタ (Pu 型クラスタ) を含むものや、[3Fe-4S] クラスタを含むものもあり、それぞれ IIB, IIA, IIC のサブクラスに分類されている。

既知の全ての TO は、大多数の $(\alpha\beta)_n$ のヘテロ多量体構造を有するものと、 α_n のホモ多量体構造を有するものの2つに大別できる。ホモ多量体構造を有する TO を含む ROS は Batie の分類ではほぼ全て class IA に分類される。なお、精製過程での挙動など生化学的な研究結果に基づいて $\alpha_2\beta_2$, や α_4 , α_6 の4次構造が予想されている TO もあるが、今まで構造解析された TO は全て $\alpha_3\beta_3$ 型か α_3 型であり (図1)、構造保存性や、TO サブユニット間で行われる R 型クラスタから非ヘム鉄への電子伝達様式の保存性から考えて、全てが $\alpha_3\beta_3$ 型か α_3 型であると予想する研究者は多い⁹⁾。ところで、この TO の4次

表1. 電子伝達鎖の特徴による Rieske non-heme iron oxygenase (ROS) の分類⁴⁾と構造解析の進行状況 (2006年10月現在)。

class	含まれる補欠分子族			当該コンポーネントが結晶構造解析された ROS (コンポーネントの構造の PDB ID)		
	レダクターゼ (Red)	フェレドキシン (Fdx)	酸化酵素 (TO)	レダクターゼ (Red)	フェレドキシン (Fdx)	酸化酵素 (TO)
I	A	FMN P 型 クラスタ ^{b)}	Fe ²⁺ R 型 クラスタ ^{b)}	Phthalate dioxygenase (2PIA)		報告なし
	B			Benzoate 1,2-dioxygenase (1KRH)		2-Oxoquinoline 8-monoxygenase (1Z01 等)
II	A	FAD	Pu 型 クラスタ ^{b)}	報告なし	報告なし	CARDO-II _{KA1} ^{d)}
	B			Biphenyl 2,3-dioxygenase (1D7Y) Toluene 1,2-dioxygenase ^{e)}		
	C		[3Fe-4S] クラスタ	報告なし	報告なし	Naphthalene 1,2-dioxygenase (2B1X)
III	FAD P 型 クラスタ ^{b)}	R 型 クラスタ ^{b)}	Fe ²⁺ R 型 クラスタ ^{b)}	報告なし	CARDO _{CA10} (1VCK)	Naphthalene 1,2-dioxygenase (1NDO 等) Nitrobenzene dioxygenase (2BMO) CARDO _{J3} (1WW9) CARDO _{CA10} ^{f)}

^{a)} Batie らの報告⁴⁾ に従い作製。Class IIC は Batie らによる分類の範疇には存在しないものに対し新たに提唱した (野口ら、投稿準備中)。

^{b)} P 型クラスタ, Plant 型 [2Fe-2S] クラスタ; Pu 型クラスタ, Putidaredoxin 型 [2Fe-2S] クラスタ; R 型クラスタ, Rieske 型 [2Fe-2S] クラスタ

^{c)} 構造情報は未発表だが、結晶化論文は公開されている³⁾。

^{d)} 香月ら、未発表データ。

^{e)} 井上ら、未発表データ。

^{f)} 野口ら、投稿準備中。

構造と **Batie** の分類の関係には、いくつかの例外がある。まず、アニリン分解菌が有するアニリンジオキシゲナーゼはアニリンのカテコールへの変換を触媒する。この酵素システムの **Red** は **Batie** の分類の **class IA** のものと類似であるが、**TO** は $\alpha\beta$ ヘテロ多量体構造を持つという **class IA** としては例外的な組み合わせを持つ。さらに、アニリンジオキシゲナーゼは活性発現（アニリン特異的な酸素消費で検出しており、アニリンの *cis*-dihydrodiol 体の検出は行われていない）には **TO**, **Red** の他、アミノ基の脱離に必要と考えられる **glutamine synthetase** と **amidotransferase** のホモログが必要であるとされている^{11,12,36}。**TO** と電子伝達系以外のコンポーネントの酸化反応自体とその後のアミノ基脱離反応への寄与の解明は、今後のタンパク質レベルでの解析を待たねばならない。また、キノリン分解系に含まれる **2-oxo-1,2-dihydroquinoline 8-monooxygenase** (*Pseudomonas putida* 86株由来) は **Red** と **TO** から構成される **class I** 型酵素だが、**Red** が **FAD** を含むために電子伝達系は **class IB** である一方、**TO** は α_3 型のホモ三量体であり (図 1C)、これも **Batie** らの分類で例外的特徴を有する

酵素といえる^{32,48}。

我々は、複数の細菌から **CARD** に対し図 2 に示す反応を触媒する **ROS** である **CARDO** を取得し、解析してきた^{1,2,22-24,37-42,49,51,53}。 γ -プロテオバクテリアの *Pseudomonas resinovorans* CA10 株由来の **CARDO** の **TO** (**CARDO-O_{CA10}**) は、3 分子の **CarAa** タンパク質から構成される α_3 型の 4 次構造をとり (図 1A), **Red** (**CARDO-R_{CA10}**) と **Fdx** (**CARDO-F_{CA10}**) は、各々 **CarAc**, **CarAd** タンパク質の単量体である³⁸。生化学的解析から **CARDO_{CA10}** は **Batie** の分類における **class III** に分類されることが示されたが^{38,49}, **CARDO-O_{CA10}** の α_3 型という性質は、**class III** ではなく **class IA** との関連性を示すものであり、先に述べたアニリンジオキシゲナーゼ等と同様に **Batie** の分類における例外的特徴を有する **ROS** であると言いうことができた。この特徴は、**CarAa** のアミノ酸配列を基にした分子系統比較においても **class III** に分類される **ROS** とは類縁関係が低い事実とも整合性がある (データは示さず)。**CARDO** は CA10 株とは分類学的に全く異なる属の細菌からも見つかっているが、 β -プロテオバクテリアに属する *Janthinobacterium* sp. J3 株²⁴, α -プロ

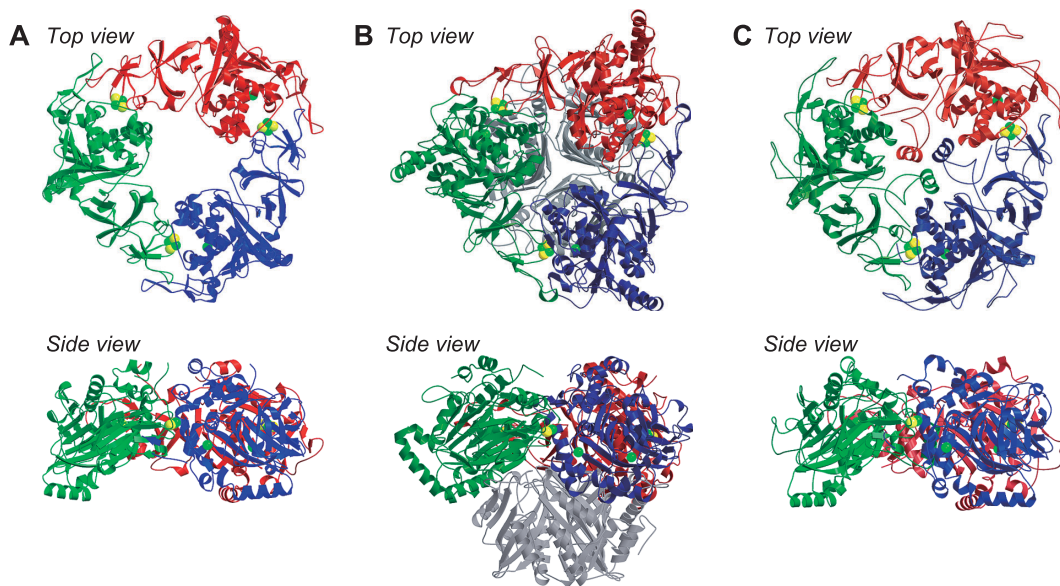


図 1. ROS の酸化酵素コンポーネントの結晶構造

(A) *Janthinobacterium* sp. J3 株由来 **CARDO** の **TO** (**CARDO-O_{J3}**) の構造³⁹, (B) *Pseudomonas* sp. NCBI9816-4 株由来 naphthalene 1,2-dioxygenase (**NDO**) の **TO** の構造²⁹, (C) *Pseudomonas putida* 86 株由来 2-oxo-1,2-dihydroquinoline 8-monooxygenase の **TO** の構造³²。 α_3 型の (A), (C) の構造と $\alpha_3\beta_3$ 型の (B) の構造の比較により、大きな 3 つの α サブユニット (触媒サブユニット) が作る円盤形 (もしくはドーナツ型) の構造は類似性が高く、(B) では構造維持のために 3 つの α サブユニットが円盤下側から結合しているように見える (結果的に、 $\alpha_3\beta_3$ 型の酵素はマッシュルームのような形をとり、 α_3 部分が傘を β_3 部分が石づきに相当する)。

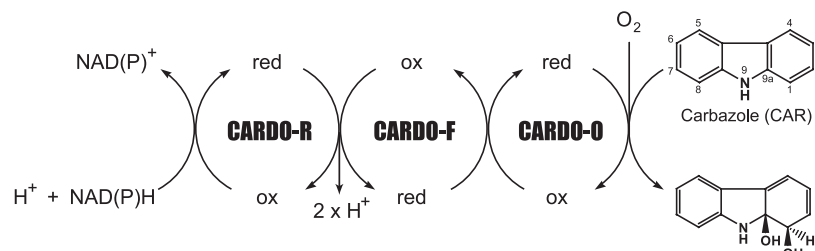


図 2. Carbazole 1,9a-dioxygenase (**CARDO**) の各コンポーネントの役割とカルバゾールへの水酸化反応

NAD(P)H に由来する電子は、レダクターゼ **Red** (**CARDO-R**) からフェレドキシン **Fdx** (**CARDO-F**) の各コンポーネント間電子伝達を経て基質の酸化の場である酸化酵素 **TO** (**CARDO-O**) へと渡され、活性中心にて酸素分子を活性化するために利用される。

テオバクテリアに属する *Sphingomonas* sp. KA1 株^{24,53}、グラム陽性細菌である *Nocardioideis aromaticivorans* IC177 株^{22,23} 由来の CARDO を調べた結果、TO は CA10 株のものも含めてお互いに >45% identity (>75% similarity) と顕著に高い類似性を示し、かつ著しいアミノ酸残基数の違いや大きな欠失・挿入が認められないことから、CA10 株由来のものと同様に CARDO-O はホモ三量体構造で酸化活性を示すものと予想された。J3 株は CA10 株と同様に class III 型の電子伝達系を持つと考えられたが、他の菌株は異なる種類の電子伝達系を持ち、KA1 株由来の CARDO が class IIA に、IC177 株由来のものが class IIB に分類された^{22,53}。以前の研究で、CARDO_{CA10} においては、Red-Fdx 間の認識は厳密ではなく他の Red から CARDO-F は電子を受け取る一方、TO と Fdx 間の認識が厳密である可能性が示唆されていた³⁹。精製酵素を用いた実験で、CA10 株の CARDO-O は KA1 株由来、IC177 株由来の CARDO-F から電子を受け取ることができないことも明らかになっており（香月ら、井上ら、未発表データ）、電子供与体としての Fdx 選択性が TO 間のどの様な構造の違いに起因しているのか興味深い。

3. ROS コンポーネントの構造解析

筆者らの知る限り、2006年9月現在、結晶構造が明らかにされている ROS のコンポーネントは、未発表のものも含めて表1に示す TO が11種、Fdx が3種、Red が4種である^{5-10,14,15,27-29,31,32,37,39,50}。表1から解るとおり、構造の報告がある ROS のコンポーネントは未だ *Batie* の分類の全ての class を網羅するものではない。さらに、ある菌株由来の特定の ROS（一組の ROS を構成して生化学的研究対象となっているものを指し、同一の基質に対する異なる細菌由来の ROS という意味ではない）に含まれるコンポーネントについては、筆者らの行っている CARDO-O³⁹（野口ら、投稿準備中）と CARDO-F³⁷ の他、詳細は未発表ながら米国 Iowa 大の Ramaswamy 博士の研究グループによる *Pseudomonas putida* F1 株由来 toluene 2,3-dioxygenase の3つのコンポーネントのみであり³¹、コンポーネント間相互作用と電子伝達機構の多様性をタンパク質構造に基づいて議論するにはさらに研究成果の蓄積を待たねばならない。

4. 基質特異性決定の分子機構

先に述べたように、ROS は環境汚染物質の効率的分解のために注目されてきた。米国 Iowa 大の Gibson らのグループによる naphthalene 1,2-dioxygenase (NDO) 等の基質特異性研究から、ROS の広い基質特異性（多くの基質を酸化できる性質）と、各々の基質に対して部位特異的・立体選択的な酸化様式が明らかになった。例えば、*Pseudomonas* sp. NCIB9816-4 株由来の NDO は、ナフタレン、フェナントレンをはじめとする60種以上の芳香族化合物へ酸化活性が確認されており、その反応生成物の多くで光学純度が高い。また、各種化合物に対して行う反応は、主たる反応としての lateral dioxygenation に加えて、monohydroxylation, desaturation (dehydrogenation),

O-dealkylation, N-dealkylation, sulfoxidation 等、多岐にわたることが明らかになっている^{44,46}。部分構造が類似している芳香族化合物に対し部位特異的・立体選択的な水酸化を行うことは、有機化学的手法では容易ではないため、ROS はキラルな物質を生産するための特異的水酸化を行う生物触媒として応用が図られている。しかしながら、1990年代半ばまでは経験的・場当たりの変異導入研究・応用研究が多く、基質特異性を統べる分子メカニズムは全く未解明であった。

この様な状況に break through をもたらしたのは、1998年に報告された米国 Iowa 大の Ramaswamy と Gibson らのグループによる NCIB9816-4 株由来 NDO の TO の結晶構造の報告である²⁹。これにより、基質特異性決定メカニズムを基質結合ポケットの形状・基質の結合位置から論ずることが可能になった。多くの場合、あらかじめ作製した TO の結晶を、基質を含むような溶液に浸すこと（ソーキングと呼ぶ）で TO-基質複合体結晶を得、それを X 線結晶構造解析に供することで基質結合位置を決定している。また、ソーキングがうまくいかない場合でも、TO の結晶構造を利用し、結合状態を予測することが可能である。いずれの場合でも、基質中の芳香環の中で酸化されるべき炭素原子が活性中心の鉄原子に最も近い位置に配置されており、合理的に酸化位置特異性と立体選択性を説明できる。具体的な事例として、以下に筆者らが行っている CARDO の例を示す。

我々のグループが CAR 分解系と CARDO の機能解析を始めたのは1990年頃のことだが、そのきっかけは、(1) 研究が先行していたナフタレン・トルエンなどの芳香族炭化水素と比較して、ヘテロ環式芳香族化合物分解経路には何らかの違いと特徴があるのか、(2) 当時、汚染が注目され始めていたダイオキシンの骨格であるジベンゾフラン・ジベンゾ-*p*-ダイオキシンと CAR は構造類似であり、代謝経路に共通性があるのか、という二つの疑問を解明することであった。CARDO は、CAR の窒素原子に隣接する核間炭素原子 (C9a) と隣の炭素原子 (C1) に対して二つの水酸基を導入する (図3A)。この反応は angular dioxygenation (核間二水酸化) と呼ばれ、数ある ROS の中でもいくつかの ROS のみが触媒可能な反応である。CARDO が angular dioxygenation を触媒するのは、CAR の窒素原子に相当する位置が酸素原子に変わったジベンゾフランやカルボニル基に変わった 9-fluorenone とそれらの類縁体に対してのみである (図3A)^{40,51}。ただし、核間炭素原子の隣の原子の種類により angular dioxygenation を触媒できる効率は大きく異なり、CARDO の場合は CAR やジベンゾフランなど窒素原子や酸素原子の場合の方が圧倒的に効率よく反応が触媒される。一方、ナフタレン等の多環芳香族炭化水素やビフェニルを基質とした場合に CARDO は基質分子末端の空間的に空いている位置に水酸基を導入する (lateral dioxygenation を触媒する) (図3B) のに対し、ジベンゾチオフェンの sulfide 硫黄やフルオレンのメチレン炭素には CARDO は一水酸化反応を触媒する (図3C)⁴⁰。なぜ CARDO が幅広い基質に対して酸化活性を示すのか、なぜ窒素原子や酸素原子に隣接する炭素原子だけ CARDO が効率よく angular dioxygenation を触媒できるのか、また、angular dioxygenation 以外にも各

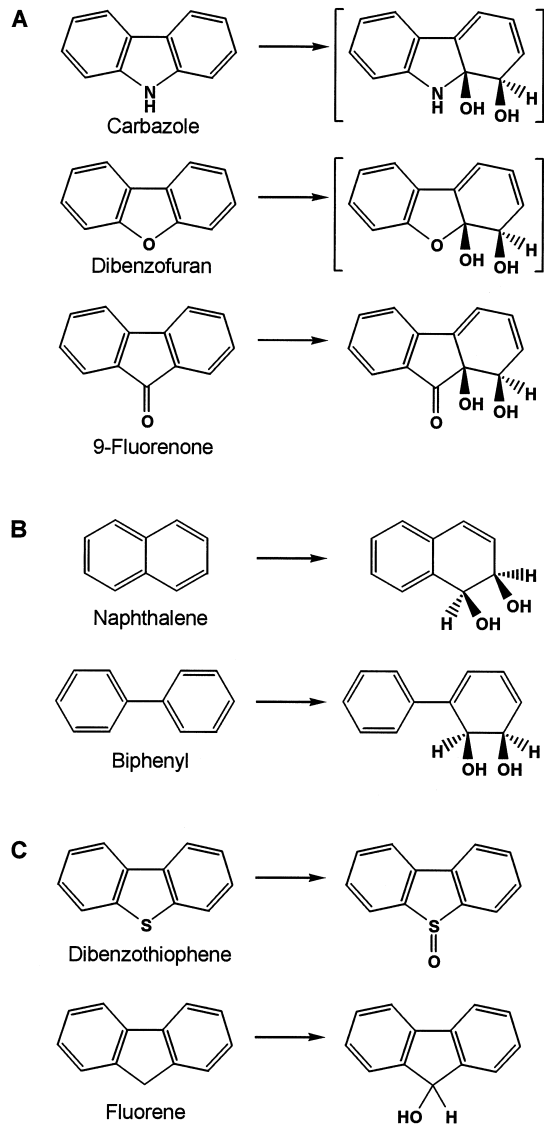


図3. Carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) が触媒する反応

CARDO は各種芳香族化合物に対して (A) angular dioxygenation, (B) lateral dioxygenation (*cis*-dihydroxylation とも言われることがあるが、厳密には angular dioxygenation も lateral dioxygenation も *cis* 型の二水酸化反応であるため、呼称としては lateral dioxygenation が望ましい), (C) mono-oxygenation の異なる種類の反応を触媒する。ただし、(A) の括弧内に示した生成物は不安定なため、直接検出されたことはない。また、CAR からプロダクトの立体化学は結晶構造中での CAR の結合様式に基づいており、その他の生成物については予測に基づいている。

種基質毎に特異的な反応を CARDO がどの様に触媒するのか、という疑問について CARDO-O の結晶構造に基づく基質結合予測や酵素基質複合体の結晶構造から解釈が可能である。

図4は、CARDO-O 単体 (図1A) と CARDO-O:CAR 複合体 (図5A) の結晶構造解析から明らかになった angular dioxygenation が触媒される際に起こる現象を示したものである (一部未発表データを含む)^{2,39}。CARDO-O の3つのサブユニットの結合領域に活性中心へと通じる空洞状の基質結合ポケットが存在している (図4A)。CAR の結合によって本来基質結合ポケットの入り口付

近の壁を形成している Leu202-Thr214, Asp229-Val238 の二つの領域が C α で最大 4 Å 程度移動し、基質結合ポケットの入り口が閉じられることが明らかになった (図4B)。これにより、基質結合ポケットに結合した基質が反応を受ける前に離れるリスクが回避されると考えられる。電子伝達系からの電子により酸素が活性化された後に、酸化を受けずに基質が解離すると活性化された酸素から過酸化物を発生することが知られており²⁰、基質結合ポケットからの基質の漏出防止は、過酸化物発生リスク軽減のためにも重要であろうことが推察される。

CAR の活性中心近傍への結合状態を詳細に描画したものが図4Cである。CAR は活性中心の Fe²⁺ の直上に結合しており、その際に angular dioxygenation を受ける位置である C1位, C9a位が Fe²⁺ から約 4.3 Å と最も近くなっていた。また、結晶構造中の CAR と活性中心の間の空間に、鉄に結合し活性化された状態と考えられる酸素に由来する電子密度が認められ、この位置は C1位, C9a位の炭素原子から約 2.8~2.9 Å であった。このような基質の結合位置は CARDO-O が CAR に対して angular dioxygenation を触媒することを良く説明するものである。*Pseudomonas* sp. NCIB9816-4 株由来 NDO の TO への酸素とナフタレンの結合様式が明らかにされており²⁰、Fe²⁺ に対して酸素分子の二つの酸素原子が共に配位するように結合すること (side-on binding と呼ぶ)、両酸素原子がナフタレンの酸化されるべき1位, 2位に最も近い位置にナフタレン環の同一面側から配置されることが示されている。このことは、酸素分子の両酸素原子が *cis* 型水酸基として導入される NDO の酸化様式をよく説明するものであるが、図4Cに示した CARDO-O での活性中心に対する酸素と CAR の結合様式は NDO の TO での結合状態と極めて良い一致を見せている。上記のような angular dioxygenation を受けうる結合位置の決定には、基質が結合する 'environment' を形成する図4Cに示した疎水性アミノ酸残基が重要である。実際に、この疎水性アミノ酸への部位特異的変異の導入が、CARDO の基質特異性を変化させることも明らかになっている (Uchimura, Horisaki et al., 未発表データ)。また、CAR 分子中央の5員環のイミノ基の窒素原子と Gly178 の主鎖カルボニル酸素との間の水素結合 (約 2.9 Å) の形成が、フラットな CAR 分子の結合方向を決定するのに重要であることも示された (図4C)。

5. Class III 型 CARDO における TO-Fdx 間の特異的な相互作用と電子伝達

ROS の各コンポーネントはゲル濾過による精製時に全く結合状態が捕捉できないなど、非常に弱い結合力(接触と言った方が良いかもしれない)で相互作用して電子を伝達しているらしい。このような場合、一般的に複合体として結晶化すること自体が難しく、ROS 以外の種々電子伝達タンパク質を含めて考えても、X線結晶構造解析で構造解明した例は少ない。我々の知る限り、今までに、*Anabaena* とトウモロコシ由来の Fdx と Fdx:NADP⁺ オキシドレダクターゼの複合体構造^{30,34}、ステロイド生合成に関与する肝細胞ミトコンドリア由来 adrenodoxin と adorenodoxin 還元酵素の複合体構造³⁵ が報

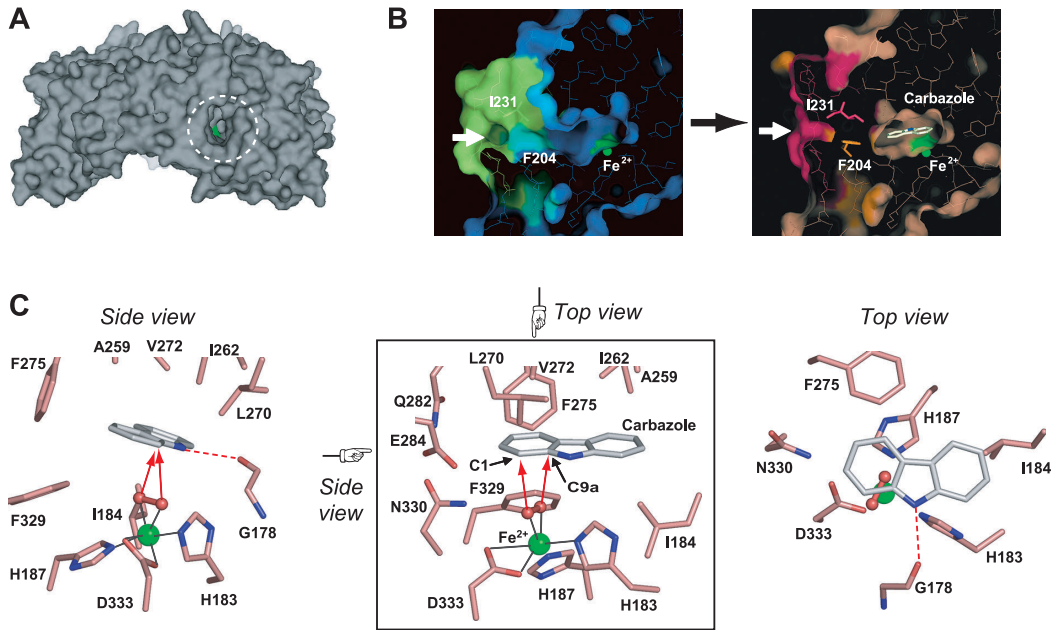


図4. Carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) の terminal oxygenase (TO) コンポーネント (CARDO-O) に存在する基質結合ポケットへの carbazole (CAR) の結合

(A) ドーナツ型の CARDO-O の全体構造を横から見た図³⁹⁾。分子表面を描画してある。破線で示す空洞状の基質結合ポケットの内部には緑色で示す活性中心の Fe^{2+} が確認できる。(B) 基質結合の前後で観察される基質結合ポケット入り口付近の構造変化。左が結合前、右が CAR 結合後の基質結合ポケットの断面を示したものである。CAR の結合に伴って入り口付近の二つのループが動くことで、基質結合ポケットが閉じた様子を示している。白矢印は基質結合ポケットの入り口を示す。(C) 活性中心の Fe^{2+} と結合した CAR、酸素 (peroxide) の相対的位置と周囲に存在するアミノ酸残基。中央枠内の様子を上から眺めたのが右図 (Top view)、枠内を左から眺めたのが左図 (Side view) である。Side view は基質結合ポケット最深部より CAR 越しに入り口付近を見る方向である。活性中心の Fe^{2+} とそのリガンドとなるアミノ酸 (H183, H187, D333) との結合を黒実線で示した (左図, 中央枠内)。 Fe^{2+} に結合した酸素分子は赤で示し、活性化された酸素の CAR へのアタックを赤矢印で示した。なお, (B), (C) の CAR 結合状態は CARDO-O:CARDO-F 複合体結晶を用いて明らかになったものである²⁾ (一部未発表データ)。

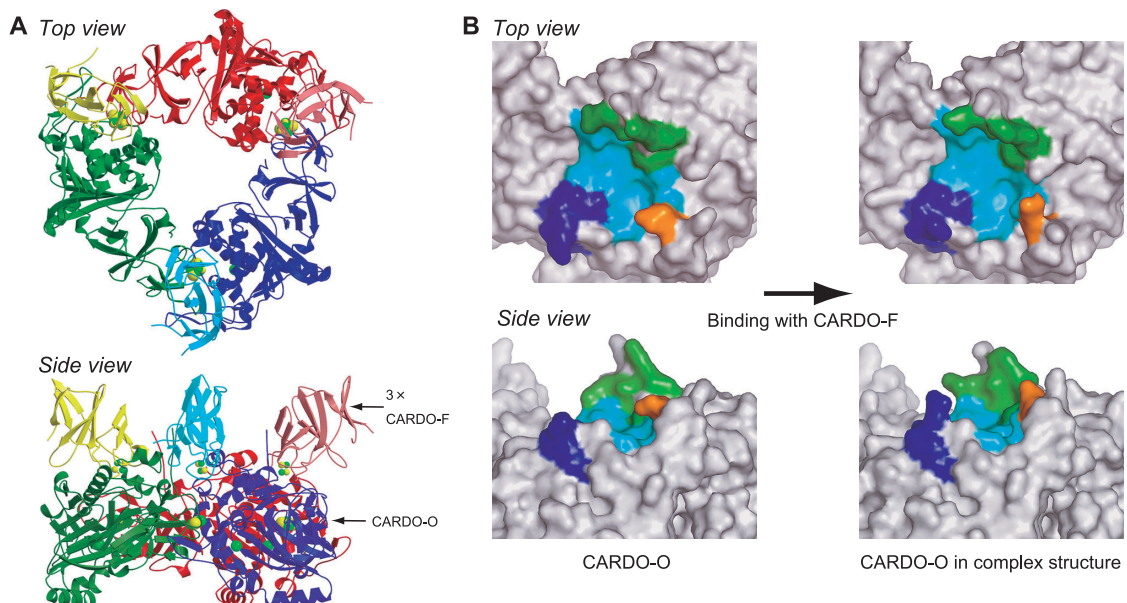


図5. CARDO-O:CARDO-F 複合体の結晶構造解析

CARDO-O:CARDO-F 複合体全体の結晶構造 (A) とそれから明らかになった CARDO-O の CARDO-F との結合領域 (B)。全体構造 (A) から、三量体構造を取る 1 分子の CARDO-O に 3 分子の CARDO-F が結合し (酸化酵素中の 1 カ所の活性中心に 1 分子の CARDO-F が結合し), それぞれ電子を渡すことが確認された。(B) の左図では, CARDO-O 単体結晶の分子表面のうち CARDO-F との結合に与る部分 (①Arg11-Trp15, ②Gln115-Gln119, ③Arg210, ④Trp350-Val363) をそれぞれ緑, 紫, オレンジ, 淡青で示した。一方, (B) の右図は CARDO-O:CARDO-F の結合に与る部分を, 複合体結晶の中での CARDO-O 分子で示したものである。CARDO-F との結合によって, 結合に関与した部分の構造が変化することがわかる。

告されているにすぎない。我々は、最近 *P. resinovorans* CA10 株由来の CARDO-F と *Janthinobacterium* sp. J3 株由来の CARDO-O を用いて TO:Fdx 複合体を分解能 1.90 Å で構造解析することに成功した¹²⁾。先に述べたように、これらの二つの株由来の CARDO は共に Batie の class III 型の CARDO であり CA10 株由来の Fdx は J3 株由来の酸化酵素に十分な電子伝達能を有することが示されている（それぞれの株由来の電子伝達パートナーと大きな機能的な違いは認められないことが実験的に証明されている）。この複合体の結晶構造をもとに、class III CARDO の TO-Fdx 間にどのような特徴的な相互作用があるのかについて明らかにすることができた。

得られた構造から、三量体の CARDO-O の各サブユニットに存在する R 型クラスタ周辺に、3 分子の CARDO-F が突き刺さるような形で結合することが示された（図 5A）。CARDO-F 分子は単量体構造ということもあり酸化酵素に比べてかなり小さいが、その「やじり」の様な構造のうち電子伝達に関わる R 型クラスタを含むやじり先端の「cluster-binding domain」のほぼ全体が CARDO-O との結合に関わっていた。一方、CARDO-O 側の結合表面は、①Arg11-Trp15, ②Gln115-Gln119, ③Arg210, ④Trp350-Val363 の 4 つの領域で構成されていた（図 5B 左）。CARDO-O 単体³⁹⁾での結合表面の構造と複合体中での CARDO-O の当該部位の構造を比較したところ、図 5B に示すような CARDO-F の結合に伴う明確な構造変化が起きていることが示された。詳細は原著論文²⁾を参照されたいが、CARDO-O では特に上記の①、④の領域中で主鎖の構造の変化を伴うような大きな構造変化が起っていた。また、CARDO-F についても同様の比較を行うと、単体の構造³⁷⁾と比較して Pro66-Gly70 の領域で大きな構造変化が認められた。CARDO-O と CARDO-F の結合領域における構造変化の結果、二つの分子の間には多くの塩橋、水素結合、疎水性相互作用が形成され、安定な複合体が形成されていた。その結果、水素結合のネットワークとタンパク質内の結合ネット

ワークを介する 2 つの電子伝達経路が予想された（図 6）。

6. CARDO における電子伝達様式の多様性は何かから生まれるのか？

セクション 2 の最後でも述べたように、Batie の分類における異なるクラスに属する CARDO が取得されている。Class IIA 型の *Sphingomonas* sp. KA1 株由来の CARDO_{KA1}, class IIB 型の *N. aromaticivorans* IC177 株由来の CARDO_{IC177} のいずれの場合も、相同性の高さから酸化酵素 CARDO-O は J3 株由来のものと同様の構造を有し、類似の酸化反応触媒機構を有すると予想できる。我々のグループでは、類似の 3 つの酸化酵素が異なる Fdx から各々電子を受け取れる理由を解明するために、生化学的・電気化学的な性状の比較に加えてタンパク質構造の比較を試みている。現在までに、P 型クラスタを有する putidaredoxin と類似な Fdx から電子を受け取る CARDO-OII_{KA1}, biphenyl dioxygenase や toluene dioxygenase に含まれることが多い Rieske フェレドキシン (R 型クラスタを有するが、naphthalene dioxygenase に代表される class III 型 ROS に含まれる Rieske フェレドキシンとは明らかに分子系統的に異なる) から電子を受け取る CARDO-O_{IC177} の構造解析を終了している。未だ、電子伝達パートナーである各々の CARDO-F と、CARDO-O: CARDO-F 複合体構造の構造解析には成功していないため、現段階では推測の域を出ないが、酸化酵素の構造比較から電子伝達様式の違いを考察することができる。図 7 は、先述した class III 型での CARDO-O_{J3} の Fdx 結合部位を形成するアミノ酸残基と、アラインメント上でそれらと相当する CARDO-OII_{KA1}, CARDO-O_{IC177} のアミノ酸残基を、各 CARDO-O 分子表面上で示したものである。図からわかるように、class III 型では結合領域を構成する凹み周辺に CARDO-F との結合に関与するアミノ酸残基が集中していた。一方、アラインメント上で

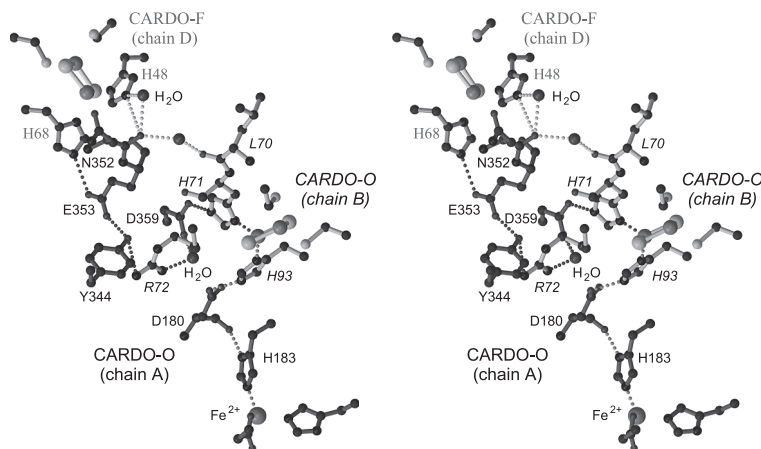


図 6. Class III 型 CARDO におけるフェレドキシン (CARDO-F) から酸化酵素 (CARDO-O) 間の推定電子伝達経路

CARDO-F の R 型クラスタ (左上) から CARDO-O (chain B) の R 型クラスタ (中央) を経由して CARDO-O (chain A) の活性中心 (Fe^{2+} , 下) までの推定電子伝達経路を示す。主鎖ネットワークと、水分子をも含めた水素結合ネットワーク (破線) により、二つの電子伝達経路が考えられる。CARDO-O の R 型クラスタと活性中心はそれぞれ異なるサブユニット上に存在しており、異サブユニット間で電子伝達が起こる。CARDO-F のアミノ酸残基は灰色で、CARDO-O のアミノ酸残基は chain B のものを斜体で示す。

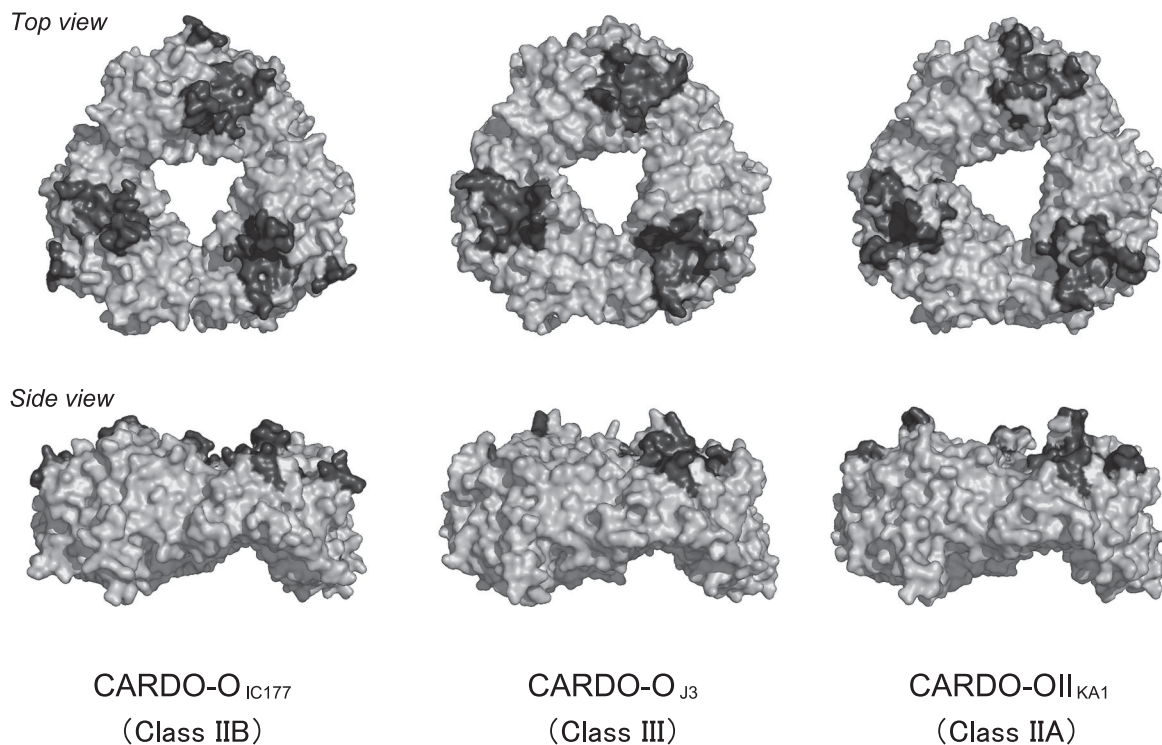


図7. Class III型 CARDO-O の Fdx 結合部位を形成するアミノ酸残基と、アラインメント上でそれらと相当する class IIA 型, IIB 型 CARDO-O のアミノ酸残基の分子表面上での分布
 CARDO-O: CARDO-F 複合体の結晶構造解析²⁾から明らかにされた CARDO-O_{J3} の CARDO-F 結合表面 (分子表面中で濃く色をつけてある部分) を中央の図に示す。Clustal W³⁾ を用いたアラインメントの結果, class III 型での CARDO-F 結合に関与するアミノ酸残基に相当するとされたアミノ酸残基の位置を, class IIA 型, class IIB 型 CARDO-O の分子表面において各々濃色で示した。CARDO-O_{IC177} 及び CARDO-OII_{KA1} は, それぞれ 2.3 Å, 2.1 Å の解像度で結晶構造が明らかにされている (それぞれ, 井上ら未発表データ, 香月ら未発表データ)。

それらに相当するアミノ酸残基は, 他の class の CARDO-O ではほぼ同じ位置にあるものの集中度合いが悪く, いくつかのアミノ酸は分子表面中で離れた位置に存在した。すなわち, class III での CARDO-O の結合領域に相当する位置には class IIA, IIB の CARDO-O でも凹みが観察されるが, 凹みの形状は異なり, かつ構成するアミノ酸残基は一部異なることが示された。また, 詳細は示さないが, 図6で示した class III における電子伝達経路を構成する酸化酵素内のアミノ酸残基は IIA, IIB の CARDO-O においても良く保存されており, 同様の位置に CARDO-F が結合して電子を CARDO-O に渡すと仮定すれば, CARDO-O 内では類似の電子伝達経路が構成される可能性が高いこともわかっている。上記の情報から, 三つの class の CARDO-O は共通の領域で CARDO-F と結合し, 結合領域の分子表面の違いが Fdx の選択性を生んでいる可能性がある。現在, 我々の研究チームでは, class IIA や IIB に属する CARDO を構成する CARDO-F 単体や CARDO-O: CARDO-F 複合体の構造解析も行っており, 酸化還元電位の測定や, 電子伝達能の評価, 結合物物理定数の測定などの結果とも合わせて, 上記考察の実験的な証明を行いたいと考えている。

さて, 上の話題は CARDO に限ったものであるが, ROS の大部分を構成する $\alpha_3\beta_3$ 型の 4 次構造を有する酸

化酵素での電子受容様式が α_3 型の CARDO-O と類似なのか, 異なるのかについても興味もたれる。Class III 型の CARDO ではドーナツ型の CARDO-O 分子の上部に CARDO-F が結合し電子を渡していたが, Iowa 大の Ramaswamy 博士の研究グループが行ったドッキングシミュレーションでは NDO-F はマッシュルームの様な形をした $\alpha_3\beta_3$ 型の NDO-O の側面 (マッシュルームの傘と石づきの境界面付近) に結合する可能性が示されている^{脚注1)}。今後, 他の ROS においても電子伝達複合体構造の解明が進めば, 先に述べた **Batie** の分類⁴⁾ を裏打ちする電子伝達メカニズムの多様性が明らかになるものと期待される。

7. おわりに

ROS が環境汚染物質の分解酵素であるという事実から考えれば当然とも言えるが, 過去の研究の多くで反応特性や基質特異性について精力的・集中的に研究が行われ, 電子伝達系に焦点を当てた研究は驚くほど少なかったように思える。本稿で示したように, 基質特異性研究では, 構造理解に基づいて基質特異性決定のメカニズムや変異導入による基質特異性の変化の解釈が精力的に試みられており, ROS の基質特異性の制御が可能になる

¹⁾ S. Ramaswamy. The 14th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience 「The 50th anniversary of oxygenases. Advances and Reflections」 (2006年4月京都) にて発表。

日も近いかもしれない。一方、電子伝達機能研究については構造解析による体系化と多様化のメカニズム解明を目指すフェーズに入りつつあると言える。多くの細菌ゲノムの塩基配列情報が蓄積することで比較ゲノムの解析が可能になったように、ROSのコンポーネント間相互作用や電子伝達系についてもより多くの構造情報の蓄積によって、今まで見えなかった研究の切り口が見えてくるだろう。今後の、この分野の研究の展開に大いに期待したい。

謝 辞

本研究は大森俊雄東京大学名誉教授（現芝浦工業大学大学院教授）のもとで開始されたものです。大森先生と、現在の筆者らの所属研究室の担当教授である山根久和先生には、本研究の遂行にあたり多大なるご指導を賜りました。さらに、X線結晶構造解析を行うにあたっては、（独）農業生物資源研究所 藤本瑞博士、東京大学大学院農学生命科学研究科 伏信進矢博士にご指導を賜りました。大森先生はじめ、全ての皆さんにこの場を借りて感謝いたします。また、本研究は生研センター、武田科学振興財団科学研究費補助金による支援を受け行われたものであり、ここに感謝いたします。

文 献

- Ashikawa, Y., Z. Fujimoto, H. Noguchi, H. Habe, T. Omori, H. Yamane, and H. Nojiri. 2005. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the electron-transfer complex between the terminal oxygenase component and ferredoxin in the Rieske non-haem iron oxygenase system carbazole 1,9a-dioxygenase. *Acta Crystallogr. sect. F* 61: 577–580.
- Ashikawa, Y., Z. Fujimoto, H. Noguchi, H. Habe, T. Omori, H. Yamane, and H. Nojiri. Electron transfer complex formation between oxygenase and ferredoxin components in Rieske non-heme iron oxygenase system. Structure in press.
- Axcell, B.C., and P.J. Geary. 1975. Purification and some properties of a soluble benzene-oxidizing system from a strain of *Pseudomonas*. *Biochem. J.* 146: 173–183.
- Batie, C.J., D.P. Ballou, and C.C. Correll. 1991. Phthalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur containing electron transferases, pp. 543–556. In F. Muller (ed.), *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes volume 3*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dong, X., S. Fushinobu, E. Fukuda, T. Terada, S. Nakamura, K. Shimizu, H. Nojiri, T. Omori, H. Shoun, and T. Wakagi. 2005. Crystal structure of the terminal oxygenase component of cumene dioxygenase from *Pseudomonas fluorescens* IP01. *J. Bacteriol.* 187: 2483–2490.
- 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.
- 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.
- Fujii, T., M. Takeo, and Y. Maeda. 1997. Plasmid-encoded genes specifying aniline oxidation from *Acinetobacter* sp. strain YAA. *Microbiology* 143: 93–99.
- Fukumori, F., and C.P. Saint. 1997. Nucleotide sequences and regulational analysis of genes involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22(pTDN1). *J. Bacteriol.* 179: 399–408.
- Furukawa, K., H. Suenaga, and M. Goto. 2004. Biphenyl dioxygenases: functional versatility and directed evolution. *J. Bacteriol.* 186: 5189–5196.
- 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.
- 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.
- Gibson, D.T., G.E. Cardini, F.C. Maseles, and R.E. Kallio. 1970. Incorporation of oxygen-18 into benzene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* 9: 1631–1635.
- Gibson, D.T., M. Hensley, H. Yoshioka, and T.J. Mabry. 1970. Formation of (+)-*cis*-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* 9: 1626–1630.
- Gibson, D.T., J.R. Koch, and R.E. Kallio. 1968. Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene. *Biochemistry* 7: 2653–2662.
- Gibson, D.T., and R.E. Parales. 2000. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 236–243.
- Habe, H., and T. Omori. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 225–243.
- Imbeault, N.Y.R., J.B. Powlowski, C.L. Colbert, J.T. Bolin, and L.D. Eltis. 2000. Steady-state kinetic characterization and crystallization of a polychlorinated biphenyl-transforming dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 275: 12430–12437.
- Inoue, K., H. Habe, H. Yamane, and H. Nojiri. 2006. Characterization of novel carbazole catabolism genes from Gram-positive carbazole degrader *Nocardioideis aromaticivorans* IC177. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3321–3329.
- Inoue, K., H. Habe, H. Yamane, T. Omori, and H. Nojiri. 2005. Diversity of carbazole-degrading bacteria having the *car* gene cluster: isolation of a novel Gram-positive carbazole-degrading bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 245: 145–153.
- Inoue, K., J. Widada, S. Nakai, T. Endo, M. Urata, Y. Ashikawa, M. Shintani, Y. Saiki, T. Yoshida, H. Habe, T. Omori, and H. Nojiri. 2004. Divergent structures of carbazole degradative *car* operons isolated from Gram-negative bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 1467–1480.
- Jeffrey, A.M., H.J. Yeh, D.M. Jerina, T.R. Patel, J.F. Davey, and D.T. Gibson. 1975. Initial reactions in the oxidation of naphthalene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* 14: 575–584.
- Jerina, D.M., J.W. Daly, A.M. Jeffrey, and D.T. Gibson. 1971. *Cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene: a bacterial metabolite from naphthalene. *Arch. Biochem. Biophys.* 142: 394–396.
- Karlsson, A., Z.M. Beharry, E.D. Matthew, 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.
- 28) 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.
 - 29) 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.
 - 30) Kurisu, G., M. Kusunoki, E. Katoh, T. Yamazaki, K. Teshima, Y. Onda, Y. Kimata-Ariga, and T. Hase. 2001. Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP(+) reductase. *Nat. Struct. Biol.* 8: 117–121.
 - 31) Lee, K., R. Friemann, J.V. Parales, D.T. Gibson, and S. Ramaswamy. 2005. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the three components of the toluene 2,3-dioxygenase enzyme system. *Acta Crystallogr. Sec. F* 61: 669–672.
 - 32) Martins, B.M., T. Svetlitchnaia, and H. Dobbek. 2005. 2-Oxoquinoline 8-monoxygenase oxygenase component: active site modulation by Rieske-[2Fe-2S] center oxidation/reduction. *Structure* 13: 817–824.
 - 33) Mason, J.R., and R. Cammack. 1992. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 277–305.
 - 34) Morales, R., M.-H. Charon, G. Kachalova, L. Serre, M. Medina, C. Gómez-Moreno, and M. Frey. 2001. A redox-dependent interaction between two electron-transfer partners involved in photosynthesis. *EMBO Rep.* 1: 271–276.
 - 35) Müller, J.J., A. Lapko, G. Bourenkov, K. Ruckpaul, and U. Heinemann. 2001. Adrenodoxin Reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 276: 2786–2789.
 - 36) Murakami, S., T. Hayashi, T. Maeda, S. Takenaka, and K. Aoki. 2003. Cloning and functional analysis of aniline dioxygenase gene cluster, from *Frateriia* species ANA-18, that metabolizes aniline via an *ortho*-cleavage pathway of catechol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 2351–2358.
 - 37) 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.
 - 38) Nam, J.-W., H. Nojiri, H. Noguchi, H. Uchimura, T. Yoshida, H. Habe, H. Yamane, and T. Omori. 2002. Purification and characterization of carbazole 1,9a-dioxygenase, a three-component dioxygenase system of *Pseudomonas resinovorans* CA10. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5882–5890.
 - 39) 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.
 - 40) Nojiri, H., J.-W. Nam, M. Kosaka, K. Morii, T. Takemura, K. Furihata, H. Yamane, and T. Omori. 1999. Diverse oxygenations catalyzed by carbazole 1,9a-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* 181: 3105–3113.
 - 41) Nojiri, H., and T. Omori. 2002. Molecular bases of aerobic bacterial degradation of dioxins: involvement of angular dioxygenation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 2001–2016.
 - 42) Nojiri, H., and T. Omori. In press. Carbazole metabolism by pseudomonads. In J.-L. Ramos and A. Filloux (eds.), *Pseudomonas*, Volume 5, Springer, New York, New York, USA.
 - 43) Otaka, E., and T. Ooi. 1989. Examination of protein sequence homologies. 5. New perspectives on evolution between bacterial and chloroplast-type ferredoxins inferred from sequence evidence. *J. Mol. Evol.* 29: 246–254.
 - 44) Parales, R.E. 2003. The role of active-site residues in naphthalene dioxygenase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 271–278.
 - 45) Parales, R.E., and S.M. Resnick. 2006. Aromatic ring hydroxylating dioxygenases, pp. 287–340. In J.-L. Ramos and R.C. Levesque (eds.), *Pseudomonas*, Volume 4, Springer, New York, New York, USA.
 - 46) Resnick, S.M., K. Lee, and D.T. Gibson. 1996. Diverse reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. *J. Ind. Microbiol.* 17: 438–457.
 - 47) Rieske, J.S., D.H. MacLennan, and R. Coleman. 1964. Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrome C reductase complex of the respiratory chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15: 338–344.
 - 48) Rosche, B., B. Tshisuaka, S. Fetzner, and F. Lingens. 1995. 2-Oxo-1,2-dihydroquinoline 8-monoxygenase, a two-component enzyme system from *Pseudomonas putida* 86. *J. Biol. Chem.* 270: 17836–17842.
 - 49) Sato, S., J.-W. Nam, K. Kasuga, H. Nojiri, H. Yamane, and T. Omori. 1997. Identification and characterization of genes encoding carbazole 1,9a-dioxygenase in *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* 179: 4850–4858.
 - 50) Senda, T., T. Yamada, N. Sakurai, M. Kubota, T. Nishizaki, E. Masai, M. Fukuda, and Y. Mitsui. 2000. Crystal structure of NADH-dependent ferredoxin reductase component in biphenyl dioxygenase. *J. Mol. Biol.* 304: 397–410.
 - 51) Takagi, T., H. Nojiri, T. Yoshida, H. Habe, and T. Omori. 2002. Detailed comparison between the substrate specificities of two angular dioxygenases, dibenzofuran 4,4a-dioxygenase from *Terrabacter* sp. and carbazole 1,9a-dioxygenase from *Pseudomonas resinovorans*. *Biotechnol. Lett.* 24: 2099–2106.
 - 52) Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
 - 53) Urata, M., H. Uchimura, H. Noguchi, T. Sakaguchi, T. Takemura, K. Eto, H. Habe, T. Omori, H. Yamane, and H. Nojiri. 2006. Plasmid pCAR3 contains multiple gene sets involved in the conversion of carbazole to anthranilate. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3198–3205.
 - 54) Ziffer, H., D.M. Jerina, D.T. Gibson, and V.M. Kopal. 1973. Absolute stereochemistry of the (+)-*cis*-1,2-dihydroxy-3-methylcyclohexa-3,5-diene produced from toluene by *Pseudomonas putida*. *J. Am. Chem. Soc.* 95: 4048–4049.