



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Structure of Copper-containing Histamine Oxidase from <i>Arthrobacter globiformis</i> and Biogenesis of Its Topa Quinone Cofactor               |
| Author(s)    | 崔, 允豪                                                                                                                                           |
| Citation     | 大阪大学, 1996, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/39930">https://hdl.handle.net/11094/39930</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                                                          |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 崔 允 豪                                                                                                                                                                    |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (理 学)                                                                                                                                                                |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 2 3 3 3 号                                                                                                                                                            |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 8 年 3 月 25 日                                                                                                                                                          |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>理学研究科生物化学専攻                                                                                                                                          |
| 学 位 論 文 名     | Structure of Copper-containing Histamine Oxidase from <i>Arthrobacter globiformis</i> and Biogenesis of Its Topa Quinone Cofactor<br>(銅含有ヒスタミン酸化酵素の構造と共有結合キノノイド補酵素の生成機構) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 谷 澤 克 行<br><br>(副査)<br>教 授 二 井 將 光    教 授 福 山 恵 一                                                                                                            |

### 論 文 内 容 の 要 旨

銅アミン酸化酵素は種々の生理活性アミン類の酸化的脱アミノ反応を触媒し、動植物や微生物などに広く存在している。本酵素中には補欠金属としての銅イオン以外に共有結合型キノノイド補酵素が含まれており、最近チロシン誘導体のトパキノンと構造決定された。本研究では、銅アミン酸化酵素の一種として考えられる *A. globiformis* 由来のヒスタミン酸化酵素の構造遺伝子のクローニングを行い、その全塩基配列を決定した。その結果、本酵素の構造遺伝子は2045塩基対からなり、推定アミノ酸配列(684残基)から計算される分子量は、75,109であることが判明した。また、他の生物起源のアミン酸化酵素中のトパキノン結合部位である Asn-Tyr-Asp/Glu の保存配列が本酵素の推定アミノ酸配列中にも見いだされた。このことから、本酵素もトパキノン補酵素を含有し、トパキノンに翻訳後修飾されるのは Tyr-402 であると予想された。

次いで、本酵素の大腸菌内高発現系を確立し、各種のカラムクロマトグラフィー操作により本酵素を均一に精製した。次いで、精製酵素を p-ニトロフェニルヒドラジンにより誘導体化した後、プロテアーゼで消化し、キノン含有ペプチドを単離した。その可視吸収スペクトルの pH に対する挙動や共鳴ラマンスペクトルを解析することにより、トパキノンを同定した。一方、本酵素遺伝子を導入した大腸菌高発現株を銅イオン無添加培地で培養し、銅イオンのキレート剤存在下で本酵素を精製することにより、トパキノンと銅イオンとを含まない不活性な前駆体タンパク質を調製した。前駆体タンパク質を銅イオンとインキュベートすることにより、酵素は顕著に活性化され、同時にトパキノンに由来する490nm付近の吸収ピークが増大した。これらの結果により、トパキノンは銅イオンを介する特定のチロシン残基の自動酸化によって生成すると結論された。

さらに、Asn-Tyr-Asp/Glu の保存配列、及びその C 末端側に隣接し他のアミン酸化酵素配列中でもかなり保存性の高い Tyr の役割を明らかにするため、部位特異的変異導入によりこれらの残基を他のアミノ酸残基に置換した。いずれの変異型酵素も銅イオンを含まない前駆体型タンパク質として精製し、銅イオンの添加によるトパキノン生成速度や生成量を比較するとともに、活性型酵素については触媒反応の速度論的解析を行った。その結果、どの変異型酵素においても銅イオンの結合能は野生型酵素と比べ変化していなかったが、その多くはトパキノンの生成速度(量)と触媒活性において顕著に低下していた。トパキノン前駆体の Tyr-402 は必須であることが確認されたが、その前の Asn-401 もトパキノン生成に関して非常に重要であり、これを他のアミノ酸で置換するとトパキノン生成速度は極端に遅くなった。一方、後ろの Asp-403 は他の酸性残基(Glu)で置換しても影響が無いが、アミド型にす

るとトパキノン生成速度が大きく低下した。また、Tyr-404はトパキノン生成には関与しないが、これをPheに置換すると基質特異性が大きく変化し、フェニルエチルアミンによる基質阻害も受けなくなっていた。最近明らかにされた大腸菌のアミン酸化酵素の立体構造に基づくと、トパキノン周辺の保存配列中の残基は活性部位周辺の他の残基と密な水素結合ネットワークを形成しており、以上の結果は、前駆体チロシン残基を含むこれらの残基がトパキノン生成過程において活性部位の構造維持（形成）に極めて重要な役割を担っていることを示唆するものである。

#### 論文審査の結果の要旨

種々の生理活性アミン類の酸化的脱アミノ反応を触媒するアミン酸化酵素は、補欠金属としての銅イオン以外に、共有結合型新規キノイド補酵素、トパキノンを含有している。崔允豪君は、本論文において、コリネ型細菌 *Arthrobacter globiformis* よりヒスタミン酸化酵素の遺伝子クローニングと全塩基配列の決定を行うとともに、大腸菌内での高発現系を構築して酵素を大量に精製し、その結合補酵素をトパキノンと構造決定した。また、不活性な前駆体酵素を用い、トパキノンが銅イオンを介する特定のチロシン残基の自動酸化によって生成することを明らかにした。さらに、部位特異的変異導入法によりトパキノン結合部位周辺の保存性アミノ酸残基のトパキノン生成過程や本酵素の触媒機能における役割を解明した。

これらの成果は、新しいタイプのタンパク質翻訳後修飾機構の存在を明確にするだけでなく、その分子機構解明への道を拓くものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。