

| | |
|--------------|--|
| Title | Biosynthesis of Topa Quinone Cofactor in Bacterial Amine Oxidase |
| Author(s) | 松崎, 隆一 |
| Citation | 大阪大学, 1998, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/40832 |
| 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。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

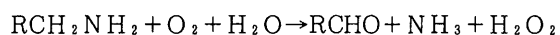
<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

| | |
|------------|--|
| 氏名 | まつ さま りゅう いち 松 崎 隆 一 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (理 学) |
| 学位記番号 | 第 13654 号 |
| 学位授与年月日 | 平成10年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物化学専攻 |
| 学位論文名 | Biosynthesis of Topa Quinone Cofactor in Bacterial Amine Oxidase (細菌由来銅アミノキシダーゼにおけるトパキノン補酵素の生成機構) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 谷澤 克行 (副査) 教授 倉光 成紀 教授 長谷 俊治 |

論 文 内 容 の 要 旨

2価銅イオンを補欠金属として含有する銅アミノキシダーゼ (EC 1.4.3.6) は、種々の生理活性アミン類の酸化的脱アミノ反応:



を触媒する酵素で、動植物、微生物に広く存在している。本酵素には、カルボニル性有機補酵素としてトパキノン (3-(2,4,5-trihydroxyphenyl)-L-alanine quinone; TPQ と略称) を含んでおり、TPQ は酵素タンパク質の翻訳後 (または翻訳過程) の修飾反応によって生成すると推定されたが、その機構は未解明に残されてきた。

本研究では、銅アミノキシダーゼにおける TPQ 補酵素の生成機構を明らかにすることを目的として、まず、グラム陽性のコリネ型土壌細菌の一種、*Arthrobacter globiformis* 由来のフェニルエチルアミノキシダーゼの遺伝子をクローニングした。得られた酵素の構造遺伝子は、1914塩基対で構成されており、638個のアミノ酸残基をコードしていた。次いで、同酵素の大腸菌内高発現系を作製し、銅イオンの強力なキレート剤であるジエチルジチオカルバミン酸の存在下で精製を行うことにより、銅イオンをほとんど含まずほぼ無色透明で不活性なアポ型酵素を得た。精製アポ型酵素を過剰の銅イオンとインキュベートすると、顕著な酵素活性が出現すると同時に、480nm付近の吸収ピークが増大して酵素溶液はピンク色に着色した。この発色団を含むペプチド断片を単離して共鳴ラマン分光法などを用いて解析することにより、発色団は TPQ であることを確かめた。一方、嫌気条件下や Tyr382 の Phe への変異型酵素では、銅イオンによる活性化も480nm付近の吸収の増加も観察されなかった。以上の結果より、TPQ は他の酵素 (系) を介して生成するのではなく、銅イオンの存在下で Tyr382 が自動酸化されて生成すると結論された。

引き続き、TPQ の自動生成機構における銅イオンの役割を明らかにするため、ESR や CD などの各種分光学的方法を用いて TPQ 生成過程を詳細に解析した。その結果、まず 2 価銅イオンがアポ酵素と結合することによって 1 価に還元され、これによって分子状酸素が活性化され、前駆体チロシン残基を TPQ に酸化するという機構が推定された。また、その過程で特異な、酵素タンパク質由来の窒素原子が関与していると考えられるセミキノラジカル中間体が形成されることも明らかになった。さらに、本酵素の結晶解析により基質や銅イオンが溶媒から分子内部の活性部位に入るためのチャンネルと推定される領域が存在することが明らかにされたが、このチャンネルの入口に存在する 2 個のリシン残基を化学修飾法を用いて同定した。

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銅アミノキシダーゼには、トパキノンと呼ばれる共有結合型キノイド補酵素が含まれている。松崎隆一君は、本論文において、コリネ型土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* よりフェニルエチルアミン酸化酵素の遺伝子をクローニングして全塩基配列を決定するとともに、大腸菌内高発現系を構築して本酵素タンパク質を大量に精製し、その結合補酵素をトパキノンと同定した。また、銅とトパキノンを含まない前駆体型アポ酵素を用い、銅イオンの存在下で特定のチロシン残基が自動的に酸化されてトパキノンが生成することを初めて明らかにした。さらに、各種の分光学的方法や部位特異的変異導入法を用い、トパキノン生成過程を詳細に解析してセミキノンラジカル中間体の形成や活性部位アミノ酸残基の役割を解明した。

これらの成果は、金属イオンによる新しいタイプのタンパク質翻訳後修飾機構の存在を実証するだけでなく、その分子機構を明らかにするものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。