

Title	Structural Studies on the Mechanism of Topa Quinone Biogenesis in Bacterial Copper Amine Oxidase
Author(s)	松波, 秀行
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41559
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 松 なみ 波 ひで 秀 ゆき 行
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 14412 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Structural Studies on the Mechanism of Topa Quinone Biogenesis in Bacterial Copper Amine Oxidase (銅アミン酸化酵素におけるトパキノン補酵素の生成機構に関する構造生物学的研究)
論文審査委員	(主査) 教授 谷澤 克行 (副査) 教授 長谷 俊治 教授 福山 恵一

論文内容の要旨

銅含有アミン酸化酵素 (EC 1.4.3.6) は生理活性アミン類の代謝に重要な役割を果たす酵素で、微生物や動・植物に広く分布している。本酵素は2価銅イオンを補欠金属として含有するだけでなく、新しいタイプの共有結合型酸化還元補酵素として、トパキノン (TPQ) を含んでいる。この TPQ 補酵素は、酵素タンパク質中の特定のチロシン残基が翻訳後修飾を受けて生成する。これまでに、TPQ の生成が銅イオンと酸素の存在下で起こる自触的反応であることが当研究室の研究により明らかにされている。

本研究では、この TPQ 生成機構を酵素の立体構造の立場から解明することを目的として、グラム陽性細菌 *Arthrobacter globiformis* 由来フェニルエチルアミン酸化酵素の X 線結晶構造解析を行った。同酵素は遺伝子組み換え大腸菌による高発現系を利用して銅イオンと TPQ をともに含まない前駆体型アポ酵素として均一に精製した。TPQ 含有活性型ホロ酵素の X 線結晶構造解析も、オーストラリア・シドニー大学 Hans Freeman 教授らとの共同研究により行った。両酵素に構造上の大きな違いはほとんど観察されなかったが、アミノ酸側鎖の位置を詳細に調べてみると、アポ酵素における前駆体チロシン残基 (Tyr-382) とホロ酵素における TPQ 残基の位置が大きく異なることが判明した。さらに、銅リガンドの一つであるヒスチジン残基 (His-592) のイミダゾール環の向きが大きく異なっていた。従って、TPQ 生成過程では、これらの銅イオンリガンドと前駆体チロシン残基、TPQ 残基の相対的な位置と芳香環の回転を含むその動きが、TPQ 生成過程で重要な役割をもつと推定された。

次に、この TPQ 生成過程での銅イオンの役割を明らかにするため、銅リガンドとして機能している3個の銅結合ヒスチジン残基について部位特異的変異を導入し、各変異型酵素 (His 431→Ala, His 433→Ala, His 592→Ala) を TPQ を含まないアポ酵素として精製した。好気条件下で銅イオンを添加したところ、これらの変異型酵素では TPQ の生成はほとんど観察できなかった。しかし、TPQ 生成反応をイミダゾール存在下で行うと His 592→Ala 変異型酵素では TPQ の生成は著しく促進された。また、イミダゾール存在下で His 592→Ala 変異型酵素に結合した銅イオンは野生型酵素に類似したタイプ II 銅の EPR スペクトルを示すとともに、共鳴ラマンスペクトルから TPQ が生成していることが確認された。このようなイミダゾールの添加効果は、野生型酵素や他の2種の変異型酵素では全く認められなかった。従って、His 592→Ala 変異型酵素では、銅イオンはイミダゾールの存在によって Tyr-382 を TPQ へと酸化修飾するのに適切な位置に保持されると推察された。一方 His 433→Ala 変異型酵素では銅イオン添加に伴う電荷移動複合体 (tyrosinate-Cu²⁺) の形成が共鳴ラマンスペクトルの測定により観察された。以上の結果から、

銅リガンドの3個のヒスチジン残基は構造的にも機能的にも等価ではなく、またTPQの生成過程で銅イオンの配位構造変化が重要な役割を担うと考えられた。

論文審査の結果の要旨

蛋白質の翻訳後修飾により特定のアミノ酸残基から生成する共有結合型の補酵素をもつ酵素が近年相次いで見いだされている。本研究では、チロシン残基由来のトパキノン補酵素を含有する銅アミン酸化酵素の前駆体型アポ酵素のX線結晶構造を決定することに世界で初めて成功し、銅イオンに依存した自己触媒的なトパキノン補酵素の生成機構を活性部位の特異な構造変化から解明する手掛かりを得ただけでなく、銅イオンを結合する3個のヒスチジン残基の機能的な非等価性を明らかにした。これらの研究成果は、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。