The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structural and Enzymological Studies on the Role of Metal Ions in Bacterial Copper/Topa Quinone-Containing Amine Oxidase
Author(s)	岸下, 誠一郎
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42491
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名	岸　下　誠一郎（きし　した　せいいちろう）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　15981　号
学位授与年月日	平成13年3月23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 and Enzymological Studies on the Role of Metal Ions in Bacterial Copper／Topa Quinone-Containing Amine Oxidase （銅／トパキノン含有アミン酸化酵素の金属イオンの役割に関する構造生物学的・酵素科学的研究）
論文審査委員	（主査） 教　授　谷澤　克行 （副査） 教　授　倉光　成紀　　教　授　福山　恵一

論文内容の要旨

銅アミン酸化酵素（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あり、2価銅イオンと補酵素トパキノン（2,4,5－trihydroxyphenylalanine quinone；TPQと略称）を含有する。Cu（II）はTPQの生成反応において必須であるとともに、触媒反応においても必須であることが判明しているが、その役割については不明な部分が多く残されている。本研究では触媒過程とTPQ生成過程におけるCu（II）の役割を解明するため、各種金属で置換した*Arthrobacter globiformis*由来アミン酸化酵素（AGAO）を調製し、酵素科学的・分光学的解析を行うとともにX線結晶構造解析も行った。

(1) 銅イオンと補酵素を含む野生型酵素を嫌気条件下、亜ジチオン酸ナトリウムとKCNを含む緩衝液に対して透析することにより銅除去型（TPQ還元型）酵素を調製し、さらに各種2価金属イオンを添加することにより、金属置換型AGAOを調製した。その結果、Cu（II）以外にもCo（II）およびNi（II）が本酵素に結合し、TPQを再酸化した。これらCo（II）およびNi（II）置換型酵素は、野生型酵素と比較して1／100程度の触媒活性を示した。また、嫌気条件下での基質添加により、野生型酵素で生成するセミキノンラジカルは、Co（II）およびNi（II）置換型酵素において観察されなかった。さらに、X線結晶解析において、これら金属置換型酵素では、金属配位子の一つであるHis592のコンフォメーション変化により、野生型酵素のCu（II）結合部位で見られる変形四角錐型から8面体型配位構造へと変化していることが明らかになった。これらの結果は、触媒過程における金属イオンの配位構造の重要性を示唆し、Cu（II）は触媒過程において、反応に関与する酸素分子や水分子を活性部位内で適切な位置に配置し、同時に酸素分子の活性化にルイス酸として機能すると推定された。

(2) 補酵素TPQの生成過程におけるCu（II）の役割の解明を目的として、銅以外の各種2価金属イオンを、TPQとCu（II）を含まないアポ型酵素に添加し、分光学的、酵素学的研究を行った。ラマン分光測定とヒドラジン滴定の結果、Co（II）とNi（II）型酵素においても野生型と同程度のTPQ含量が確認された。これまでTPQ生成反応はCu（II）に特異的と考えられてきたが、Co（II）とNi（II）もTPQ生成反応を促進することが初めて明らかにされた。しかし、Co（II）とNi（II）によるTPQの生成速度は大気条件下では極めて遅く、溶存酸素の飽和条件下でのみ分光学的なTPQ生成過程の解析が可能であった。このため、Co（II）の存在下でアポ酵素のX線結晶構造解析を行ったところ、前駆体Tyr残基がCo（II）に配向した構造が明らかになった。この構造はTyr残基がTPQへと酸化される前の補酵素生成の最初の段階を反映していると推定された。

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アミン酸化酵素には、トパキノンと呼ばれるビルトイン型キノン補酵素と補欠金属としての銅イオンが含まれている。これまでの研究によりトパキノン補酵素は基質アミンと直接反応することが明らかになっているが、銅イオンの役割は不明に残されてきた。岸下誠一郎君は、本論文において、土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* のフェニルエチルアミン酸化酵素の触媒反応及びトパキノン生成反応における2価銅イオンの役割を明らかにするため、各種金属置換型酵素を作製し、分光学的及びX線結晶学的解析を行った。その結果、銅イオンは触媒反応においてもトパキノン生成反応においても酸素原子を活性化するルイス酸として機能することを明らかにするとともに、酵素タンパク質中での金属イオンの配位構造がその機能発現に重要であることを指摘した。また、銅イオン以外にもコバルトやニッケルイオンもトパキノン生成反応に有効であることを初めて明らかにした。

これらの成果は、金属イオンとタンパク質の相互作用とそれにより発現されるタンパク質の機能を理解する上で極めて重要な知見を提供するものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。