



Title	Gene Cloning and Structural Studies of Quinohemoprotein Amine Dehydrogenase from <i>Pseudomonas putida</i>
Author(s)	金, 鐘根
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43592">https://hdl.handle.net/11094/43592</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	金鐘根
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第16784号
学位授与年月日	平成14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	Gene Cloning and Structural studies of Quinohemoprotein Amine Dehydrogenase from <i>Pseudomonas putida</i> ( <i>Pseudomonas putida</i> の新規キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の遺伝子クローニングとタンパク質構造解析)
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

様々な生物種に普遍的に存在する酸化還元酵素は各種の補酵素を含み、それらを利用することによって温和な条件下でも効率の良い反応を可能としている。そのような補酵素の多くは水溶性ビタミンから生合成される。しかし、ある種のアミン酸化酵素やアミン脱水素酵素中にはポリペプチド鎖に共有結合したトパキノンやトリプトファントリプロトフィルキノン(TTQ)が含まれており、いわゆる“ビルトイン”型補酵素として機能している。

アミン脱水素酵素は、一級アミンを酸化してアルデヒドとアンモニアを生成する反応(式1)を触媒する酵素であり、メタノール資化性菌などの一部のグラム陰性細菌に存在している。



グラム陰性菌 *Pseudomonas putida* では、*n*-ブチルアミンまたはベンジルアミンの添加によって、キノン補酵素とヘムを含むキノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素(Qh-AmDH)が誘導されることが報告されている。本酵素は、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、及び $\gamma$ サブユニット(それぞれ60、40、及び20kDa)からなるヘテロ三量体構造を有しており、未知のビルトイン型キノン補酵素が $\gamma$ サブユニットに、 $c$ 型ヘムが $\alpha$ サブユニット内に含まれている。しかし、酵素タンパク質の構造と遺伝子構造は未解明であり、そのキノン補酵素が既知のTTQと同一であるか否かの検証もなされていない。本研究では、Qh-AmDHの遺伝子構造およびキノン補酵素とタンパク質構造を明らかにすることを目的としている。

遺伝子配列を解析した結果、本酵素遺伝子は4つのORF(計算分子質量: 54,53,9,39kDa)が存在する領域に含まれており、ORF1、ORF3、及びORF4がそれぞれ $\alpha$ 、 $\gamma$ 、及び $\beta$ サブユニットをコードしていた。この領域の両端には塩基配列決定が困難な2次構造が存在しており、4つのORFはひとつのオペロンを形成していると推定された。本酵素サブユニットに対応しないORF2は2カ所の鉄-硫黄クラスター結合配列を含む機能未知のタンパク質をコードしており、キノン補酵素の生成に関与する可能性が示唆された。

さらに、*Ps. putida*より精製した酵素を用いてX線結晶構造解析を行い、三量体構造を得た(1.9Å分解能、 $R=0.211$ 、 $R_{\text{free}}=0.245$ )。全体的に馬蹄形の構造をもつ $\alpha$ サブユニットは大きく4個のドメインに分けられ、そのうちN末端側ドメインはそれぞれ1分子ずつヘム $c$ を結合する2個のサブドメインから構成されていた。 $\beta$ サブユニットは7枚羽根の $\beta$ -プロペラ構造からなり、TTQを補酵素とするメチルアミン脱水素酵素と同様な超二次構造を有していた。

しかし、 $\gamma$ サブユニットにはほとんど明確な2次構造は含まれず、4本の分子内架橋によりその構造が維持されていることが判明した。

#### 論文審査の結果の要旨

金 鍾根君は、グラム陰性細菌 *Pseudomonas putida* が誘導生成する新規キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の遺伝子構造とX線結晶構造を解明した。分子サイズがあい異なる3つのサブユニットで構成される本酵素には、2分子のヘムと構造未知のキノン補酵素が含まれていることが知られていたが、本論文において、新規なキノン補酵素、システィニルトリプトファンキノン (CTQ) が含まれていることを明らかにするとともに、基質アミンは CTQ の C6位カルボニル基と反応することを示した。これらの業績は、最近注目を浴びているキノプロテイン酵素の研究分野に顕著な貢献をするものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。