The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Mutational and X-ray Crystallographic Studies on the Active-site Residues of Copper/topaquinone-containing Amine Oxidase from Arthrobacter globiformis
Author(s)	邱, 彦成
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44036
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	邱（きゅう）　彦成（げんせい）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　17543　号
学位授与年月日	平成 15 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	Mutational and X-ray Crystallographic Studies on the Active-site Residues of Copper/topaquinone-containing Amine Oxidase from *Arthrobacter globiformis* （部位特異的変異導入とＸ線結晶解析による *Arthrobacter globiformis* 由来銅/トパキノン含有アミン酸化酵素の活性部位アミノ酸残基の機能解析）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　谷澤　克行 （副査） 教　授　福山　恵一　　教　授　倉光　成紀　　助教授　岡島　俊英

論　文　内　容　の　要　旨

銅アミン酸化酵素（EC 1.4.3.6）は、微生物から哺乳動物に至る生物界に広く分布し、種々の生理活性アミン類の酸化的脱アミノ反応（$RCH_2NH_3^+ + O_2 + H_2O \rightarrow RCHO + NH_4^+ + H_2O_2$）を触媒する酵素である。本酵素は分子量約 70,000～95,000 のホモダイマー構造をもち、各サブユニットは、補欠金属の２価銅イオンとキノン補酵素の一種、トパキノン（2,4,5-tryhydroxyphenylalanine quinone ; TPQ と略称）を含有している。この TPQ 補酵素は、タンパク質の翻訳後修飾により生成するペプチド・ビルトイン型補酵素で、アポタンパク質中の前駆体チロシン残基が銅イオンの存在下で自動的に酸化修飾されて生成する。本研究では、土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* 由来の銅アミン酸化酵素（AGAO）の活性部位アミノ酸残基に変異を導入し、詳細な反応速度論的解析とＸ線結晶解析を行うことにより、本酵素の精密な触媒反応機構を解明することを目的としている。

１．Asp298 の機能解析とシッフ塩基中間体のＸ線結晶構造解析

本酵素の触媒過程の還元的半反応においては、基質アミンは先ず TPQ の C5 位カルボニル基と反応し、基質シッフ塩基（SSB）を生成する。次いで、触媒塩基（Asp298）によりα位プロトンが引き抜かれ、生成物シッフ塩基（PSB）に変換される。この Asp298 残基の触媒塩基としての機能をさらに詳細に明らかにするため、Ala に置換した変異型酵素 D298A を作製した。D298A における TPQ 生成速度は野生型酵素の約 1/2 に低下していたが、Asp298 は TPQ 生成には必須ではないことが判明した。しかし、触媒反応における k_{cat} は野生型酵素の約 10^6 分の１に低下しており、触媒塩基としての必須性を裏付けた。すなわち Asp298 はオーバーオールの k_{cat} を 10^6 倍に加速する。この反応加速率がプロトン引き抜き過程のみに由来するか否かを確かめるため、還元的半反応における D298A の分光学的解析を行った。嫌気条件下で基質フェニルエチルアミン（PEA）を加え、TPQ の吸収スペクトルの変化を追跡した結果、310 nm に吸収を示す分子種がゆっくりと生成（k_{obs}＝～$1.6\times10^{-3}\ s^{-1}$; 野生型酵素では＞$1000\ s^{-1}$）し、その後、さらに遅い速度で 375 nm に吸収を示す分子種が蓄積することが判明した。野生型酵素や TPQ モデル化合物のスペ

クトルとの比較から、前者はSSB、後者はPSBの吸収に対応すると考えられた。これらの結果は、Asp298がSSBからのプロトンの引き抜きだけでなく、SSBの形成やPSBの加水分解にも関与することを示している。SSBの生成速度の低下は、阻害剤フェニルヒドラジンとの反応速度の低下とも一致する。恐らく、Asp298はミカエリス複合体を形成する前の基質アミンの脱プロトン化やPSB形成後の加水分解過程におけるプロトン授受にも直接的な役割を果たしていると推定される。次に、SSBとPSBの化学構造を明らかにするため、D298Aの結晶にPEAを加えて複合体を形成させた後、X線結晶解析を行った。基質導入1時間後と7日後の結晶の回折データを解析した結果、ともにPEA-TPQ複合体が形成されていることが判明した。電子密度図（$2F_o$-F_c）において、シッフ塩基二重結合に対する基質N-Cα-Cβ間の結合角度の違いに基づいてモデルをあてはめることにより、1時間後の結晶ではSSBの構造、7日後の結晶ではPSBの構造が決定できた。興味深いことに、SSBにおける基質のα位*pro-S*水素原子（モデルから自動的に発生させた）はTPQ-シッフ塩基平面に対してほぼ垂直に配向しており、σ-π電子相互作用が増大してプロトンが脱離しやすい構造をとっていた。これは、D298Aにおけるプロトン引き抜きの立体化学的解析の結果とも一致する。

2．活性部位近傍の疎水性領域の役割

AGAOの活性部位近傍には、Ala400、Ala402、およびMet602などの残基で構成される疎水性ポケットが存在し、分子状酸素の結合部位（または通路）と推定されている。A400L、A402L、およびM602Qなどの変異型酵素を作製し、TPQ生成反応速度を調べたところ、大気圧酸素濃度においては、A400LおよびM602QのTPQ生成反応の速度はそれぞれ野生型酵素の1/2および1/100に低下しており、酸素飽和条件下においては、すべての変異型酵素において野生型酵素との差が拡大した。これより、この疎水性ポケットはTPQ生成反応において分子状酸素の一時的な貯蔵部位または通路として機能していると考えられる。しかし、TPQ含有ホロ型変異型酵素（A402Wを除く）では、k_{cat}と基質（PEA、O_2）に対するK_mは、野生型酵素と比較して顕著な変化は見られず、この疎水性ポケットはO_2に対する充分低いK_m値には直接的な影響を及ぼさないことが分かった。なお、A402Wのk_{cat}が著しく低下した原因は構造変化によることがX線結晶解析から判明した。

論文審査の結果の要旨

邱　彦成君は、グラム陽性土壌細菌*Arthrobacter globiformis*由来の銅/トパキノン含有アミン酸化酵素の活性部位アミノ酸残基の機能を、部位特異的変異導入と変異型酵素のX線結晶構造や反応速度論的・分光学的性質に基づいて解析し、①活性部位のAsp298残基が基質－補酵素間シッフ塩基のα-プロトンを引き抜く触媒塩基であるとともに、同反応中間体の形成や生成物シッフ塩基の加水分解にも関与することを証明し、②還元的半反応における反応中間体のX線結晶構造を銅含有アミン酸化酵素で初めて決定し、基質のα-プロトン引き抜きの立体特異性を反応中間体の構造から説明できることを明らかにした。さらに、③活性部位近傍の疎水性ポケットを構成するアミノ酸残基への変異導入によりトパキノン補酵素の自己触媒的生成の反応速度が低下し、この領域は酸素チャンネルとして機能していると推定するとともに、④触媒反応における酸素に対するK_m値は十分低く、疎水性領域のアミノ酸残基に変異を導入しても大きな影響を受けないことを明らかにした。

これらの成果は、最近注目されているペプチド・ビルトイン型キノン補酵素を含有する酵素の構造と触媒機能の解明に大きな寄与を果たすものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。