

Title	Structural and Kinetic Studies on the Catalytic Mechanism of Copper/Topa Quinone-containing Amine Oxidase
Author(s)	村川, 武志
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46448
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	むら かわ たけ し 村 川 武 志
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 20041 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 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 Kinetic Studies on the Catalytic Mechanism of Copper/Topa Quinone-containing Amine Oxidase (銅/トパキノン含有アミン酸化酵素の触媒機構に関する構造学的・反応 速度論的研究)
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

銅含有アミン酸化酵素は、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を触媒する酵素である。本酵素の触媒過程は、TPQ の酸化還元状態により、還元的半反応と酸化的半反応の 2 つに大きく分けられる。前半の還元的半反応では、酸化型 TPQ が基質により還元され還元型 TPQ と第一生成物のアルデヒドが生成し、後半の酸化的半反応では、還元型 TPQ が分子状酸素により再酸化されアンモニアと過酸化水素が生じる。本研究では、土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* 由来の銅アミン酸化酵素 (AGAO) について、前定常状態の詳細な速度論的解析を行うとともに、反応中間体の X 線結晶解析を行うことにより、還元的半反応の精密触媒機構の解明を目指した。

1. 還元的半反応におけるプロトン引き抜き機構の解析

本酵素の還元的半反応におけるプロトン引き抜き機構の詳細を解明することを目的として、野生型 AGAO と α 位水素を重水素置換した基質とのストップフロー実験を行った。得られた吸収スペクトル変化より各素反応の速度を算出した結果、両基質ともプロトン引き抜き過程が量子力学的理論に基づくプロトントンネリングにより支配されていることを示した。しかし、チラミンを基質とした場合、タンパク質の熱的振動による活性部位環境の微調整により水素移動効率を高める 'passive dynamics' で反応が進行するのに対し、PEA を基質とした場合には、振動がプロトン移動距離を直接減少させる 'active dynamics' で反応が進行することが示唆された。反応中間体の構造解析の結果、基質結合ポケット内において、PEA と TPQ の複合体は疎水結合のみで緩く結合しているのに対し、チラミンとの複合体は、疎水結合と水素結合ネットワークの両者でより強く結合しており、この結合様式の違いが 2 つの異なるトンネリングモードの原因と考えられた。この結果は最適化された位置に存在する Asp298 がトンネリングに重要な役割を果たしていることを示している。

2. 基質アナログ複合体構造に基づく触媒機構の解析

銅含有アミン酸化酵素の反応阻害剤であるヒドラジン類は、基質アミンと同様の機構で TPQ に結合するが、以降

の反応が進行せず安定な複合体を形成する。AGAOの構造に基づく触媒機構を解明するため、3種類のヒドラジン誘導体、ベンジルヒドラジン (BH)、4-ヒドロキシベンジルヒドラジン (4HBH)、及びフェニルヒドラジン (PH) と AGAO の複合体の結晶を調製した。回折データを解析し、阻害剤複合体がヒドラゾン型であることを明らかにした。また、これらの阻害剤に対応するアミン基質について、前定常状態の速度解析を行った結果、プロトン引き抜き過程において、PHに対応するベンジルアミンの速度定数は、BH および 4HBH に対応する PEA およびチラミンに比べ、約 1/1000 の値を示した。Asp298 はプロトン引き抜き以外にも還元的半反の様々なステップにおいて重要な役割を果たしていることから、ヒドラジン複合体構造における Asp298 の位置は、対応するアミンの反応性の違いを矛盾なく説明できるように思われた。

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ピ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。これまでに触媒反応機構の概要は解明されているが、触媒反応の重要なステップであるプロトン引き抜き過程をはじめとする個々の素過程はまだ十分に解明されているとはいえず、構造学的な証拠も得られていなかった。そこで、村川武志君は、土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* 由来の銅アミン酸化酵素について、前定常状態の詳細な速度論的解析を行うとともに、反応中間体の X 線結晶解析を行うことにより、精密触媒機構の解明を目指した。その結果、本酵素のプロトン引き抜き過程が量子力学的理論に基づくプロトントンネリングにより支配されていることを明らかにした。さらに、反応中間体および阻害剤との X 線結晶解析を行うことによって、アミン基質と酵素の相互作用がプロトントンネリングの様式に強く影響する機構を解明した。

これらの成果は、酵素が触媒反応を駆動する機構を理解する上で極めて重要な知見を提供するものである。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。