



|              |                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Biochemical and Molecular Biological Studies on the Role of an Iron-Sulfur Protein in Posttranslational Modification of Quinohemoprotein Amine Dehydrogenase                                                       |
| Author(s)    | 小野, 和利                                                                                                                                                                                                             |
| Citation     | 大阪大学, 2006, 博士論文                                                                                                                                                                                                   |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                    |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/47691">https://hdl.handle.net/11094/47691</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照ください</a> 。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | お 小 野 かず とし 利                                                                                                                                                                                                              |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (理 学)                                                                                                                                                                                                                  |
| 学 位 記 番 号     | 第 2 0 6 0 5 号                                                                                                                                                                                                              |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 18 年 6 月 16 日                                                                                                                                                                                                           |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>理学研究科生物科学専攻                                                                                                                                                                                            |
| 学 位 論 文 名     | Biochemical and Molecular Biological Studies on the Role of an Iron-Sulfur Protein in Posttranslational Modification of Quinohemoprotein Amine Dehydrogenase<br>(キノヘムタンパク質・アミン脱水素酵素の翻訳後修飾における鉄硫黄タンパク質の役割に関する生化学的・分子生物学的研究) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 谷澤 克行<br>(副査)<br>教 授 倉光 成紀    教 授 福山 恵一    助教授 岡島 俊英                                                                                                                                                           |

### 論 文 内 容 の 要 旨

キノヘムタンパク質・アミン脱水素酵素 (QHNDH) は、培地中の *n*-ブチルアミンやベンジルアミンなどの一級アミンを資化するために、*Paracoccus denitrificans* などのグラム陰性菌のペリプラズムに誘導生成される。本酵素は  $\alpha, \beta, \gamma$ -サブユニットからなるヘテロ三量体構造を有し、最も小さな  $\gamma$ -サブユニットは、新規キノン補酵素、システイントリプトフィルキノン (CTQ) を含有する。さらに興味深いことに、 $\gamma$ -サブユニット内では CTQ を形成しているシステイン残基以外の全てのシステイン残基が、近傍のアスパラギン酸残基あるいはグルタミン酸残基のメチレン炭素原子とチオエーテル結合を形成している。このような分子内架橋は明確な二次構造含量が少ない  $\gamma$ -サブユニットの構造維持に必要であると考えられるが、酵素機能における役割や翻訳後修飾による生成機構は未解明である。一方、QHNDH 遺伝子はゲノム上でオペロンを形成していると考えられ、その第 2 番目の ORF (ORF2) は、本酵素のどのサブユニットとも対応していない約 55 kDa の未知タンパク質をコードしている。配列比較に基づく、このタンパク質は、ビタミン類の生合成に関わる酵素や種々の酵素活性化因子を含むラジカル SAM スーパーファミリーに属すると考えられるが、QHNDH との関係は未解明に残されている。本研究では、*P. denitrificans* の ORF2 タンパク質に着目し、QHNDH の生合成過程、特に  $\gamma$ -サブユニット内の CTQ 生成やチオエーテル架橋構造の形成に果たす役割を解明することを目的とした。

ORF2 タンパク質の機能について解析するため、まず suicide vector を用いた相同組換えによって *P. denitrificans* の ORF2 遺伝子破壊株 ( $\Delta$ ORF2 株) を得た。 $\Delta$ ORF2 株は *n*-ブチルアミンを唯一の C/N 源として含有する最小培地において、増殖能を失っており QHNDH 活性を示さなかった。培地中に炭素源としてコリンを追加したところ、菌体の増殖は回復したが QHNDH 活性は誘導されなかった。ウェスタンブロットにより ORF2 タンパク質の発現を検討した結果、野生株において細胞質画分に著量発現していた ORF2 は、 $\Delta$ ORF2 株において、全く発現していないことが確認できた。また、ORF2 タンパク質は最小培地に *n*-ブチルアミンを添加した QHNDH 誘導条件下にその発現が検出されたことから、QHNDH 遺伝子と同一のプロモーターに支配されていることがわかった。 $\Delta$ ORF2 株の最小培地における増殖能と QHNDH 活性は、広宿主域ベクターを用いて構築した ORF2 タンパク質発現プラスミドを

$\Delta$ ORF2 株に導入することによって回復させることができた。しかし、鉄硫黄クラスターおよび S-アデノシルメチオニン (SAM) 結合と推定される配列に変異を導入した ORF2 遺伝子を持つ発現プラスミドでは、 $\Delta$ ORF2 株の同培地での増殖能力を回復しなかった。以上の結果から、ORF2 タンパク質がラジカル SAM タンパク質として QHNDH 生合成に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。QHNDH の各サブユニットの細胞内局在について調べたところ、 $\alpha$ -および  $\beta$ -サブユニットは野生株と同様に  $\Delta$ ORF2 株においてもペリプラズム分画に存在していたが、 $\gamma$ -サブユニットは細胞質画分に蓄積していた。この  $\gamma$ -サブユニットはキノン染色に反応しなかったため、CTQ 補酵素は形成されていないことがわかった。

質量分析の結果、成熟型  $\gamma$ -サブユニットとは対比的に、細胞質内蓄積  $\gamma$ -サブユニットは、補酵素生成とチオエーテル結合形成のいずれの翻訳後修飾も受けていないことが明らかになった。さらに、成熟型  $\gamma$ -サブユニットにはない 28 残基のプレ配列が N 末端に存在することが明らかになった。また、 $\gamma$ -サブユニット遺伝子欠失株において、このプレ配列を除去した  $\gamma$ -サブユニットはペリプラズムに輸送されず、QHNDH 活性も検出されなかった。以上の結果から、 $\gamma$ -サブユニットは極めて複雑な翻訳後修飾機構とペリプラズムへの輸送機構をもつと考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

グラム陰性細菌 *Paracoccus denitrificans* 由来のキノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素は、ヘテロ三量体構造を有し、最も小さな  $\gamma$ -サブユニット中に新規キノン補酵素のシステイントリプトフィルキノン及びシステイン残基とアスパラギン酸残基あるいはグルタミン酸残基間の分子内チオエーテル結合を含んでおり、これらの複雑な構造はタンパク質の翻訳後修飾により生成する。しかし、それらの生成機構は不明に残されている。申請者の小野和利君は、これらの翻訳後修飾に関与すると考えられる新規な鉄硫黄タンパク質に着目し、その役割について生化学的・分子生物学的な方法を用いて検討を加えた。その結果、ラジカル・SAM タンパク質に属するこの鉄硫黄タンパク質が  $\gamma$ -サブユニットの翻訳後修飾に必須の役割を果たしていることを明らかにした。また、詳細な質量分析の結果から、このタンパク質が欠損すると  $\gamma$ -サブユニットは全く翻訳後修飾を受けないことを明らかにした。これらの成果は、遺伝子配列からは明確ではない新規なタンパク質の機能発現の分子機構を解明したという観点から、ポストゲノム研究として高く評価されるものである。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。