

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18370043
 研究課題名 (和文) ペプチド・ビルトイン型キノン補酵素の生合成機構と触媒機能
 研究課題名 (英文) Mechanism of biogenesis and catalytic function of peptidyl quinone cofactors
 研究代表者
 谷澤 克行 (TANIZAWA KATSUYUKI)
 大阪大学・産業科学研究所・教授
 研究者番号：20133134

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：銅アミン酸化酵素, トパキノン, ビルトイン型キノン補酵素, キノヘムプロテイン, 分子内チオエーテル架橋, 翻訳後修飾, X線結晶解析, 酵素触媒機構

1. 研究計画の概要

本研究では、酵素タンパク質中の芳香族アミノ酸残基がキノン化合物に酸化修飾されて生成するペプチド・ビルトイン型補酵素に焦点を当て、それらを含む酵素の精密構造や触媒機能、並びにタンパク質の翻訳後にどのような機構で生合成されるか (cofactor biogenesis) を立体構造に立脚して明らかにすることを主な目的としている。

(1) トパキノン補酵素の触媒機能解析

トパキノン補酵素を含有する銅アミン酸化酵素の触媒反応機構の詳細を明らかにするため、立体特異的に安定同位体標識したアミン基質を用いた還元的半反応の立体化学的解析、微量ストップフロー分光光度計を用いた前定常状態の反応速度論的解析、各種の変異型酵素の機能解析、反応中間体の精密立体構造解析などを行う。

(2) キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の補酵素生成機構の解析

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素に含まれるビルトイン型キノン補酵素、システイントリプトフィルキノン (CTQ) 並びに分子内チオエーテル架橋構造の形成機構を解明するため、オペロン中に含まれる各遺伝子の破壊とプラスミド導入による機能回復、各種変異型酵素の作製と質量分析計を用いる各サブユニット・ポリペプチドの翻訳後修飾の解析などを行う。

2. 研究の進捗状況

(1) トパキノン補酵素の触媒機能解析

①活性部位の Asp298 残基が基質-補酵素間シ

ッフ塩基の ζ -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明らかにした。

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 ζ -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。

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の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した。

④D298K 変異型酵素における補酵素生成を解析し、ペプチジルリジン酸化酵素に含まれるトパキノンと類似のキノン型補酵素 (リジルチロシルキノン) が生成することを見出し、共通の補酵素生成反応中間体としてトパキノンを經由することを明らかにした。

⑤立体特異的に重水素標識したエチルアミンを用いた解析から、銅アミン酸化酵素による α -水素の引き抜きの立体選択性は、基質シッフ塩基のコンフォメーションにより一義的に決定されることを明らかにした。

(2) キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の補酵素生成機構の解析

①オペロンの第2番目にコードされる鉄-硫黄タンパク質が \odot -サブユニットの翻訳後修飾 (恐らく γ -サブユニット内チオエーテル架橋構造の形成) に必須の役割を果たしていることを明らかにした。また、このタンパク質が欠損すると \odot -サブユニットは全く翻訳後

修飾を受けないことが明らかになった。

②翻訳直後の γ -サブユニットには成熟型酵素には見られないリーダー配列が存在し、恐らくチオエーテル架橋構造の形成反応においてプライマーとして必須の役割を担うことが示唆された。

③オペロンの第5番目にコードされるサチライシン様タンパク質は、 γ -サブユニットのリーダー配列の切断を行う特異的プロテアーゼであることを明らかにした。

④ α -サブユニット及び γ -サブユニット内の多くの部位に変異導入を行い、キノン型補酵素形成への影響を中心に解析を進めている。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由)

銅アミン酸化酵素に含まれるトパキノン補酵素の触媒機能解析に関しても、CTQと特異な分子内チオエーテル架橋構造を含有するキノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の補酵素生成機構の解析に関しても、年度当初の研究実施計画はすべて達成し、それらの研究成果を国際会議や学術論文に発表しているだけでなく、その他の成果として、トパキノン補酵素のコンフォメーションのフレキシビリティの制御機構やキノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の α -サブユニットへのヘム分子挿入とCTQ形成との相関などに関する知見も多く得られているため。

4. 今後の研究の推進方策

(1) トパキノン補酵素の触媒機能解析

銅アミン酸化酵素の触媒機構をさらに詳細に解明するため、トパキノンに変換される前駆体 Tyr 残基前後のコンセンサス配列中やその他の活性部位アミノ酸残基に部位特異的変異を導入し、変異型酵素のX線結晶解析とストップフロー分光光度計を用いる前定常状態の反応速度論的解析を行う。また、還元的半反応中間体(特に還元型トパキノン中間体)の精密立体構造を決定し、セミキノンラジカル経由の反応経路を検証する。

(2) キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の補酵素生成機構の解析

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素は、グラム陰性細菌のペリプラズム画分に誘導生成される。各サブユニットのペリプラズムへの輸送機構を明らかにするため、これまでの研究により構築した *Paracoccus denitrificans* を宿主とする発現系を利用して、 α 及び β -サブユニットのシグナルペプチドへ変異を導入し、ペリプラズムへ輸送されるかどうか調べる。また、 γ -サブユニットへの変異導入により、CTQと架橋構造の形成や膜輸送とヘテロ三量体の形成が影響を受けるか否かを調べる。膜画分中の酵素活性

を測定し、ペリプラズムと細胞質画分のサブユニット存在比率を調べる。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Taki, M., Murakawa, T., Nakamoto, T., Uchida, M., Hayashi, H., Tanizawa, K., Yamamoto, Y., Okajima, T. Further Insight into the Mechanism of Stereoselective Proton Abstraction by Bacterial Copper Amine Oxidase. *Biochemistry* **47**, 7726-7733 (2008). 査読有
- ② Moore, R. H., Spies, M. A., Culpepper, M. B., Murakawa, T., Hirota, S., Okajima, T., Tanizawa, K., Mure, M. Trapping of a Dopaquinone Intermediate in the TPQ Cofactor Biogenesis in a Copper-containing Amine Oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 11524-11534 (2007). 査読有
- ③ Ono, K., Okajima, T., Tani, M., Kuroda, S., Sun, D., Davidson, V.L., Tanizawa, K. Involvement of a Putative [Fe-S]-Cluster-Binding Protein in the Biogenesis of Quinohemoprotein Amine Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **281**, 13672-13684 (2006). 査読有
- ④ Chiu, Y.-C., Okajima, T., Murakawa, T., Uchida, M., Taki, M., Hirota, S., Kim, M., Hayashi, H., Yamamoto, Y., Tanizawa, K. Kinetic and Structural Studies on the Catalytic Role of the Aspartic Acid Residue Conserved in Copper Amine Oxidase. *Biochemistry* **45**, 4105-4120 (2006). 査読有

[学会発表] (計18件)

[図書] (計1件)

- ① Okajima, T., Tanizawa, K. Taylor & Francis Group, LLC. Copper amine Oxidases: Structure, Catalytic Mechanism and Role in Physiopathology. 2009, 共著 (印刷中)

[その他]

ホームページ

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/smb/tpq2.htm>

http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/smb/new_page_9.htm