

平成 22 年 5 月 11 日現在

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 Built-in 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

研究成果の概要 (和文)：本研究は、水溶性ビタミンに由来する従来の補酵素と異なり、タンパク質の翻訳後修飾反応により形成されるビルトイン型キノン補酵素に焦点を当て、チロシン残基から生成するトパキノン (TPQ) 補酵素と銅イオンとを活性部位に含む銅アミン酸化酵素の触媒機能、並びにキノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素 (QHNDH) における新規キノン補酵素、システイントリプトフィルキノン (CTQ) の生合成機構の解明を目的とした。銅アミン酸化酵素の触媒機構に関しては、トパキノンの構造変化を伴う前半の還元的半反応機構の詳細を明らかにした。QHNDH の生合成に関しては、酵素サブユニット遺伝子の近傍にコードされている [Fe-S] クラスター含有タンパク質とズブチリシン様プロテアーゼが必須の役割を担うことを証明した。

研究成果の概要 (英文)：Peptidyl built-in cofactors are produced by posttranslational modification of the cognate enzyme proteins, unlike ordinary cofactors which are mostly bio-synthesized from water soluble vitamins. In this study, we focused on two built-in quinone cofactor-containing enzymes, copper amine oxidase and quinohemoprotein amine dehydrogenase (QHNDH) that contain topa quinone (TPQ) and cysteine tryptophyl quinone (CTQ), respectively. For the reaction mechanism of copper amine oxidase, it has been demonstrated that the former reductive half-reaction is accompanied with the conformational change of TPQ. On the other hand, two proteins encoded close to the QHNDH genes, an [Fe-S]-cluster and S-adenosylmethionine-binding protein and a subtilisin-like protease, have been found to play essential roles for QHNDH biogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

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. 研究開始当初の背景

ペプチド鎖に直接結合したかたちで存在する一連の補酵素（ビルトイン型補酵素と呼ぶ）が、1990年代以降に、酸化還元酵素を始めとするさまざまな酵素中に相次いで発見されてきた。すなわち、銅アミン酸化酵素のトパキノン（TPQ）やガラクトース酸化酵素のチロシルチオエーテルなどに代表される新規な共有結合型補酵素である。ビルトイン型補酵素は、各酵素の遺伝子中では通常のアミノ酸残基あるいは翻訳終止コドンとしてコードされており、前駆体アミノ酸残基が何らかのタンパク質の翻訳後修飾を受けたり、終止コドンが特異的機構により新奇なアミノ酸として読み取られたりすることで、触媒反応に必須のビルトイン型補酵素に変換される。しかし、ビルトイン型補酵素に関しては、発見と構造決定から日が浅いこともあって、その触媒機能や生合成機構の多くが未解明に残されていた。私たちのグループは、約15年前に、銅アミン酸化酵素のTPQ補酵素は、前駆体タンパク質中のチロシン残基が銅イオンの存在下で自己触媒的に酸化されて生成することを世界で初めて明らかにし、金属イオンによる新しいタイプのタンパク質の翻訳後修飾機構として注目を浴びた。その後、TPQ生成過程の活性部位構造変化と反応機構の解明、TPQ生合成反応や触媒機能における結合銅イオンの役割の解析、触媒反応中間体のX線結晶構造解析など、精力的に研究を進めてきた。一方、2種類の細菌に由来するキノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素（QHNDH）の立体構造解析を行い、新規キノ補酵素CTQを同定することに成功した。さらに、ヘテロ3量体構造をもつ同酵素は、そのサブユニットのひとつが、CTQ以外にシステイン残基のイオウ原子とアスパラギン酸やグルタミン酸残基のメチレン炭素との間に新規な分子内チオエーテル架橋構造を3ヶ所も含む極めて特異なタンパク質構造を有することを明らかにしたが、これらの構造の生成機構は未解明に残されていた。

2. 研究の目的

酵素の触媒機能を助ける補酵素の多くは、水溶性B群ビタミンなどから生合成された後、翻訳された前駆体酵素タンパク質（アポ酵素）に取り込まれる。しかし、このような遊離の低分子有機化合物の補酵素とは異なり、ペプチド鎖に直接結合したかたちで存在する一連の補酵素（ペプチド・ビルトイン型補酵素と呼ぶ）が知られている。すなわち、銅

アミン酸化酵素のトパキノン、アミン脱水素酵素のトリプトファントリプトフィルキノン、ガラクトース酸化酵素のチロシルチオエーテルなどに代表される新規な共有結合型補酵素であり、1990年代以降に酸化還元酵素を始めとするさまざまな酵素中に相次いで発見されてきた。しかし、これらのペプチド・ビルトイン型補酵素の触媒機能や生合成機構の多くが未解明に残されている。そこで、本研究では、これらペプチド・ビルトイン型補酵素のうち特に芳香族アミノ酸残基がキノ化合物に酸化修飾されて生成する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どのような機構で生合成されるか（cofactor biogenesis）をタンパク質の立体構造に立脚して明らかにすることを主な目的とした。

3. 研究の方法

(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作製と機能解析、時間分割X線結晶解析による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。

4. 研究成果

(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 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 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(図1)。

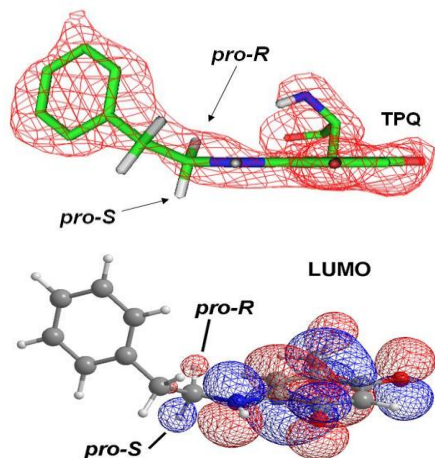


図1. TPQ-基質 Schiff 塩基中間体の立体構造(上)とプロトン引き抜き過程の立体選択性に関わる電子軌道(LUMO)(下)

- 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した。
- ④ D298K 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, LTQ)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(図2)。

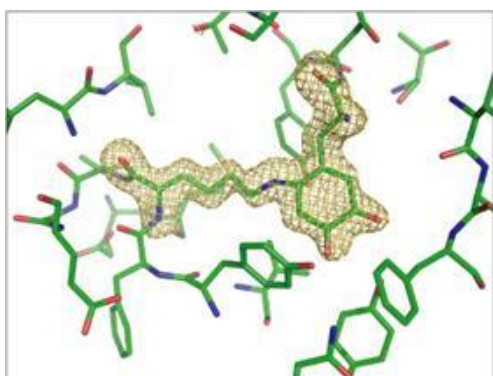


図2. 銅アミン酸化酵素におけるLTQの形成

- 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 Schiff 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。

- ⑥ TPQに隣接するAsn381の変異型酵素を作成してその性質を調べることにより、Asn381の側鎖の立体的大きさと電子的性質により、触媒過程においてTPQを反応の進行に有利なコンフォメーションに保つと推定した。
- ⑦ ハロゲンイオンによる阻害機構を解析し、同イオンは Cu^{2+} に配位して $\text{TPQ}_{\text{sq}}/\text{Cu}^{1+}$ と $\text{TPQ}_{\text{red}}/\text{Cu}^{2+}$ の平衡を $\text{TPQ}_{\text{red}}/\text{Cu}^{2+}$ 側にシフトさせるため、 TPQ_{sq} 形成量を低下させ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 本酵素サブユニット遺伝子を含むオペロンの第2番目にコードされる鉄-硫黄タンパク質(ORF2タンパク質)が C -サブユニットの翻訳後修飾(分子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 C -サブユニットは全く翻訳後修飾を受けないことが判明した。
- 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(ORF5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(図3)。

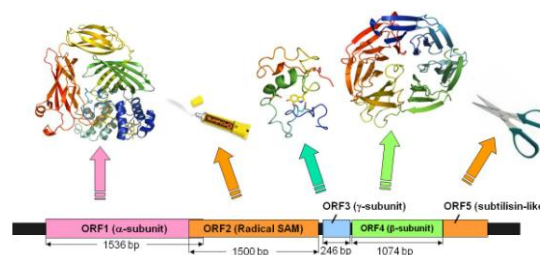


図3. QHNDHの生合成に必須の役割を担うORF2タンパク質とORF5タンパク質

- 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た結果、 α -サブユニット中のヘム結合に関わるアミノ酸残基に変異を導入するとCTQが形成されることが判明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① 岡島俊英, 谷澤克行. 分子内架橋構造をもちトリプトファン残基に由来するキノン補酵素の生合成機構. *化学と生物*, **47**, 522-524 (2009). 査読無
- ② 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
- ③ Moore, R. H., Spies, M. A., Culpepper, M. B., Murakawa, T., Hirota, S., Okajima, T., Tanizawa, K., Mure, M. Trapping of a Dopaoquinone 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
- ④ 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
- ⑤ 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
- ⑥ Murakawa, T., Okajima, T., Kuroda, S., Nakamoto, T., Taki, M., Yamamoto, Y., Hayashi, H., and Tanizawa, K. Quantum Mechanical Hydrogen Tunneling in Bacterial Copper Amine Oxidase Reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 414-423 (2006). 査読有
- ⑦ 谷澤克行. 新しいビルトイン型キノン補酵素 CTQ と分子内チオエーテル架橋構造—その特異な構造形成機構の解明に向けて—. *酵素工学ニュース* **56**, 5-9 (2006). 査読無
- ⑧ 岡島俊英, 谷澤克行. X 線結晶解析と反応速度論的解析に基づく銅アミン酸化酵素の触媒機構. *日本応用酵素協会誌* **41**, 1-7 (2006). 査読無

[学会発表] (計 5 件)

- ① Hamaguchi, A., Okajima, T., Nakai, T.

Tanizawa, K., Murakawa, T., Hayashi, H., X-ray Crystallographic Evidence for Conformational Change of Topaquinone in the Reductive Half-reaction of Copper Amine Oxidase from *Arthrobacter globiformis*, Gordon Research Conference on Protein Cofactors, Radicals and Quinones, January 24-29, 2010, Ventura, CA, USA

- ② Murakawa, T., Hayashi, H., Okajima, T., Tanizawa, K., Acid-Base Chemistry in the Reductive Half-Reaction of Copper Amine Oxidase from *Arthrobacter globiformis*, Gordon Research Conference on Protein Cofactors, Radicals and Quinones, January 24-29, 2010, Ventura, CA, USA
- ③ 元山 暁仁、中西 将太、黒田 俊一、岡島俊英、谷澤 克行、銅含有アミン酸化酵素のトバキノン補酵素生成におけるコンセンサス配列中のアスパラギン残基の役割、第 31 回日本分子生物学会年会／第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)、2008 年 12 月 9-12 日、神戸国際会議場・神戸国際展示場 (兵庫県)
- ④ Okajima, T., Ono, K., Tanizawa, K., Involvement of an Iron Sulfur Protein and a Subtilisin-like Protease in the Biogenesis of Quinohemoprotein Amine Dehydrogenase, Japan-Holland Joint Seminar on New Aspects in Enzyme Science and Biotechnology, Sept. 28-30, 2008, 九州大学西新プラザホール (福岡県)
- ⑤ Okajima, T., Nakanishi, S., Murakawa, T., Hayashi, H., Tanizawa, K., Conformational Flexibility of the TPQ Cofactor in Bacterial Copper Amine Oxidase, Gordon Research Conference on Protein Cofactors, Radicals and Quinones, January 20-25, 2008, Ventura, CA, USA

[図書] (計 2 件)

- ① Suzuki, S., Okajima, T., Tanizawa, K., Mure, M. Cofactors of Amine Oxidases: Copper Ion and Its Substitution and the 2,4,5-Trihydroxyphenylalanine Quinone (Chapter 3). In 'Copper Amine Oxidases: Structures, Catalytic Mechanisms, and Role in Pathophysiology', CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, pp. 19-38 (2009).
- ② Okajima, T., Tanizawa, K. Mechanism of TPQ Biogenesis in Prokaryotic Copper Amine Oxidase (Chapter 8). In 'Copper

Amine Oxidases: Structures, Catalytic Mechanisms, and Role in Pathophysiology', CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, pp. 103-118 (2009).

[その他]

ホームページ等

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/smb/project.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

岡島 俊英 (OKAJIMA TOSHIHIDE)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：10247968

(3) 連携研究者

該当なし