

新規な酵素補欠分子 TOPA キノンの生合成機構

京都大学農学部食品工学科 玉置尚徳

アミン酸化酵素(AO)は、アミン類の酸化的脱アミノ反応によって生体内アミンの調節に関与する酵素であり、銅あるいはFADを含むものに大別される。銅を含有するAOにおいては、以前より本酵素がフェニルヒドラジンと反応してクロモフォアを生成することより、その活性中心には反応性の高いカルボニル基の存在が示唆されてきた。ピリドキサルリン酸やPQQが候補にあがったものの同定までは至らなかった。

1990年にKlinmannらのグループはウシ血漿由来のAOについて活性中心を含むペプチドを分離し解析した結果、その補欠分子がこれまでに報告されていないまったく新しいタイプのキノン化合物TOPAキノン; 3-(2,4,5-trihydroxyphenyl)-L-alanineキノンであると報告した。¹⁾その後、大腸菌、酵母、カビなどの微生物から高等動植物に至る多くのAOがクローニングされそのDNAシーケンスが比較された。その結果、TOPAキノンは-Asn-Tyr-(AspまたはGlu)-Tyr-よりなるコンセンサス配列の2番目のTyr残基(下線)が翻訳後修飾を受けて形成されることが示唆された。²⁾

TOPAキノンの生合成機構については、二つの可能性が示唆されている。すなわち、翻訳されたAOが他の因子の介在によりTOPAキノンへ変換されるとする考えと、AOが翻訳された段階で自動的(自己触媒的)にTOPAキノンへ変換されるというものである。谷澤らは、*Arthrobacter globiformis*のAOをクローニングし、コンセンサス配列のTOPAキノンに変換されると考えられるTyr残基をPhe残基に変えた変異酵素を大腸菌で高発現させたところ、TOPAキノンの生成およびAOの酵素活性は認められないと報告した。³⁾また、AO発現株を培養する際に培地中の銅を除いておくと、発現したAOにはTOPAキノンの生成もAO活性も認められないが、このAOに溶存酸素存在下 *in vitro* で銅を添加するとTOPAキノンの生成と酵素活性の回復が認められている。

さらに、銅非存在下の培養菌体より精製したAOをネイティブのポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、PVDF膜に転写後同様の実験を行ったところ、キノン染色の結果より膜に転写されたAOでもTOPAキノンの生成が認められることを示した。⁴⁾

また、Klinmannらは酵母 *Hansenula polymorpha* 由来のAO遺伝子を *Saccharomyces cerevisiae* において発現させたところTOPAキノンを持つアクティブなAOが得られたと報告している。⁵⁾ 現在までのところ *S. cerevisiae* には、AOの存在は認められておらず、それにもかかわらず発現したAOがTOPAキノンを有するアクティブな酵素であったことは、AOにおけるTOPAキノンの生合成機構が他の因子によって行われるのではないことを示唆している。

AOにおけるTOPAキノンの生成には分子内に結合している銅原子の存在が必須であることが示されてきたが、AOにおける銅原子の分子内リガンドについての研究も進んでいる。

AOにおいては、以前より三つのHis残基が銅のリガンドとなっている可能性が分光光学的解析により示唆されていた。酵母 *H. polymorpha* 由来AOの一時構造の比較により、よく保存されたHis残基のなかでTOPAキノンに変換されるTyr残基からの距離が一定である三つのHis残基が認められた。このうちのひとつをAsp残基に変換した変異酵素は、銅存在下で発現させたにもかかわらず、AO活性およびTOPAキノンの生成は認められず、またAOに特有の472 nmにおける吸光度が減少していた。この変異酵素の銅含量は野生型のそれに比べて約4%しか検出されなかった。⁶⁾

これらの結果は、このHis残基が分子内銅リガンドの一つであることを示すとともに、分子内の銅の存在がTOPAキノン生成に重要な役割を果たしていることを示している。

TOPAキノンがどのようなメカニズムで生成されるのかは解明されていないが、AO分子内に結合している二価の銅原子により特異的なTyr残基が酸化されて最終的にTOPAキノンとなるのではないかと考えられている。このような酵素の活性発現機構は今までにないまったく新しい機構であり、さらなる研究成果が待たれる。

- 1) Janes, S. M. *et al.*: *Science*, **248**, 981 (1990).
- 2) Janes, S. M. *et al.*: *Biochemistry*, **31**, 12147 (1992).
- 3) Tanizawa, K. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 1096 (1994).
- 4) Matsuzaki, R. *et al.*: *FEBS Lett.*, **351**, 360 (1994).
- 5) Cai, D. *et al.*: *Biochemistry*, **33**, 7647 (1994).
- 6) Cai, D. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **269**, 32039 (1994).