



研究ノート

“ビルトイン”補酵素の形成反応

谷澤克行*

Biogenesis of “Built-in” Cofactors

Key Words : Quinone Cofactor, Quinoprotein, Post-translational Modification

1. はじめに

生体内でさまざまな反応を司っている酵素は、タンパク質でできた生体触媒である。しかし、単純タンパク質からなる酵素は意外と少なく、これまでに知られている3000種類以上の酵素の多くは、金属イオンなどの補欠分子や有機低分子化合物の補酵素を含んでいて、それらの助けを借りることによりはじめて多彩な反応を触媒することができる。このような補酵素は、酵素タンパク質の生合成とは別の経路で水溶性ビタミンなどから生合成されたのち、タンパク質に結合して触媒機能を発現する。ところで、生化学の分野で新しい補酵素が発見されその構造が決定されるのは近年では極めてめずらしいことである。しかし、1990年になって、2,4,5-トリヒドロキシフェニルアラニルキノン(以下TPQと略称)、およびトリプトファントリプトフィルキノン(TTQ)という2種類の新しいキノン型の補酵素が相次いで構造決定された。前者は動物血清中に存在し銅イオンを補欠金属として含む銅アミン酸化酵素の、後者はメタノール産化性細菌のメチルアミン脱水素酵素のそれぞれ触媒活性に必須の補酵素として見いだされたものである。さらに、動物の結合組織中のコラーゲンやエラスチンの分子間架橋反応を触媒するペプチジルリジン酸化酵素にも、新たな別のキノン型補

酵素(リジルチロシルキノン;LTQ)がごく最近見いだされた。1980年代の終わり頃に発見されたピロロキノリンキノン(PQQ)を含め、これらのキノン型補酵素を含む酵素は“キノプロテイン”と呼ばれるようになった¹⁾。

2. 共有結合型キノン補酵素

4種類のキノン型補酵素(図1)の構造を見れば明らかのように、PQQ以外はいずれもタンパク質中にアミノ酸残基の形で共有結合している。いわばタンパク質のポリペプチド鎖中に組み込まれた“ビルトイン”タイプの補酵素である。云うまでもなく、タンパク質は遺伝子のコドン表に対応する20種類のアミノ酸によって構成されており、これらの共有結合型キノン補酵素はどれも直接遺伝暗号としてコードされてはいない。しかし、構造的には、TPQはチロシン残基から、TTQは2個のトリプトファン残基から、LTQはリジン残基とチロシン残基とから、それぞれタンパク質の翻訳後修飾により生成すると推定される。事実、多くのキノプロテイン酵素の遺伝子が補酵素の構造決定と相前後して次々とクローニングされ、それらの全塩基配列が決定されるに及び、キノン補酵素に対応する部位はすべて通常のアミノ酸残基でコードされていることが明らかになった。タンパク質のリン酸化やアシル化など他の多くのタンパク質の翻訳後修飾に見られるように、これらのキノン補酵素も修飾反応を特異的に触媒す

*Tatsuyuki TANIZAWA

1948年10月19日生

1978年京都大学大学院農学研究科農芸化学専攻博士課程修了

現在、大阪大学産業科学研究所・生体応答科学部門・生体触媒科学研究分野、教授、農学博士(京都大学)、生化学

TEL 06-6879-8460

FAX 06-6879-8464

E-Mail tanizawa@sanken.osaka-u.ac.jp

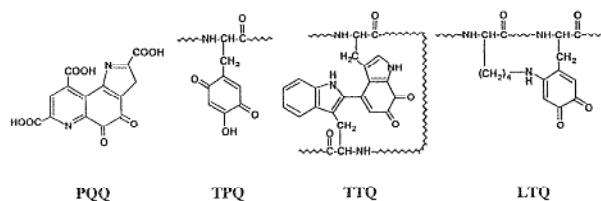


図1 PQQ, TPQ, TTQ, LTQの構造

る酵素(系)の働きにより生成するのであろうか?あるいは、グルタチオンペルオキシダーゼなどの酵素の活性中心に存在するセレンシステイン残基のように、特異なサブレッサー-tRNAを含む数種の遺伝子産物が関与する複雑な機構により生成するのであろうか?いずれにしても、アミノ酸残基に由来するキノン補酵素が翻訳後修飾により生成するためには、酵素タンパク質中のどのアミノ酸残基の修飾であってもよいのではなく、活性部位内の特定の残基のみが修飾される機構が存在しなければならない。また、TTQとLTQの場合には酸化修飾だけでなく同一ポリペプチド鎖内の別のアミノ酸残基との分子内架橋という修飾反応も起こる必要がある。構造決定からまだ日も浅いこともあって、これらキノン型補酵素の生成機構についてはほとんど未解明といっても過言ではない。しかし以下に述べるように、銅アミン酸化酵素のTPQ補酵素に関しては、私たちのグループを中心とする最近の研究によりその生成機構が分子レベルで明らかにされつつある^{2,3)}。

3. 銅アミン酸化酵素におけるTPQ補酵素の自触的生成

銅アミン酸化酵素は、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、動植物、微生物に広く存在している。生理的な役割とアミン基質に対する特異性は、各生物種由来の酵素において異なっているが、タンパク質構造においては分子量70,000~90,000の同一サブユニット2個からなるダイマー構造をもつ点で共通している。銅アミン酸化酵素におけるTPQ補酵素の生成機構を明らかにすることを目的として、私たちはグラム陽性土壌細菌の一種、*Arthrobacter globiformis*のフェニルエチルアミン酸化酵素(AGAO)の遺伝子をクローニングした。得られた酵素の構造遺伝子は、1914塩基対で構成されており、638個のアミノ酸残基をコードしていた。さらに、その推定アミノ酸配列中に、TPQ生成のためのコンセンサス配列[Asn-Tyr-(AspまたはGlu)-Tyr:2番目のTyrがTPQに変換される]が認められ、その結合位置は382番目のチロシン残基であることが示唆された。次いで、同酵素の大腸菌内高発現系を作製したところ、発現プラスミドを導入した大腸菌における本酵素タンパク質の発現率は全可溶性タンパク質の約20%と高いにもかかわらず、酵素活性は非常に低かった。驚いたこ

とに、その粗抽出液に2価銅イオンを添加してしばらくインキュベートすると、顕著な酵素活性が出現した。このことから、大腸菌内では銅イオンもTPQも含まない不活性なアポ酵素として発現していると考えられた。そこで、この大腸菌を大量培養し、銅イオンのキレート剤の存在下で精製を行うことにより、銅イオンをほとんど含まずほぼ無色透明で不活性なアポ酵素を得た。精製アポ酵素を過剰の銅イオンとインキュベートすると、顕著な酵素活性が出現すると同時に、480 nm付近の吸収ピークが増大して酵素溶液は濃いピンク色に着色した。この発色団を含むペプチド断片を単離して共鳴ラマン分光法などで解析することにより、発色団はTPQであることを確かめた。また、銅イオンによるTPQの生成は嫌気条件下ではまったく認められなかった。以上の結果から、TPQは他の酵素(系)を介して生成するのではなく、銅イオンの存在下でTyr382が自動酸化されて生成すると結論された。この銅イオンによるTPQ補酵素の自動生成は、*A. globiformis*のヒスタミン酸化酵素においても確認された。最近、他の研究グループにより酵母由来の酵素においてもTPQの自動生成が示されており、この機構はどの生物の銅アミン酸化酵素にも共通した機構であると考えられる。このように金属イオンとタンパク質の特異的な相互作用により活性部位にキノン補酵素が自触的に生成する機構は、タンパク質の翻訳後修飾機構としてまったく新しいタイプのものである。

4. X線結晶解析に基づくTPQ補酵素の生成機構

TPQの自動生成過程においてタンパク質(特に活性部位)の構造はどのように変化するだろうか?このたいへん興味深い問題を明らかにするために、最近私たちは、AGAOのアポ酵素とTPQ含有ホロ酵素のX線結晶解析を行った⁴⁾。銅アミン酸化酵素の立体構造は、すでに大腸菌由来の酵素とマメ科植物由来の酵素で明らかにされていたが、いずれもホロ酵素のものであった。大腸菌酵素の構造を用いて分子置換法で解いたAGAOの構造は、ペプチド鎖の基本的なフォールディングにおいて大腸菌および植物酵素に非常に類似していた。一方、アポ酵素とホロ酵素の構造を比較すると、主鎖のバックボーン原子の座標は0.4Å以内のずれで一致し、両者に構造上の違いはほとんど見られなかった。しかし、各アミノ酸残基の側鎖の位置を詳細に比べると、アポ酵

5. お わ り に

素における前駆体チロシン残基(Tyr382)とホロ素におけるTPQの位置が大きく異なることが判明した(図2). さらに, 銅イオンのリガンドの一つであるヒスチジン残基(His592)のイミダゾール環の向きもかなり異なっていた. また, ホロ型酵素における銅イオンは, 3個のヒスチジン残基のイミダゾール窒素と1個の水分子とが面配位子となり, 別の1個の水分子が軸配位子となって変形ピラミッド構造で配位していた. アポ酵素におけるTyr382のC-4位水酸基は, ホロ型酵素の銅イオンの軸配位水分子とはほぼ同じ位置に存在していた. 銅アミン酸化酵素におけるTPQ補酵素の生成過程をビデオ映画に例えるなら, 上に述べたAGAOのアポ酵素とホロ酵素の構造は, それぞれ最初と最後のスナップショットであると見なすことができる. このビデオの全編を完成するには, 時分割X線結晶解析などの動的な構造解析法を用いた今後の研究が必要である. しかし, ESRや共鳴ラマン分光などのこれまでの種々の分光学的研究により得られた知見と, アポ酵素とホロ酵素の立体構造比較, さらに活性部位アミノ酸残基への変異導入による生化学的解析などから, TPQ生成過程ではタンパク質全体の大きなコンフォメーション変化は起こらず, 活性部位に極めて限定された構造変化, 特にTyr382とHis592の空間的な位置とそれに伴う銅イオンの配位構造変化が重要な役割を果たしていると考えている⁵⁾.

触媒作用に必須の補酵素がこのようにタンパク質内部の奥深くで自動的に生成されるということは驚異に値する. タンパク質の立体構造に秘められた未知の機能がまだまだ他にも存在するかも知れない. 事実, キノン補酵素以外にも, 酵素の活性部位のアミノ酸残基が何らかの翻訳後修飾を受けて補酵素となる例は, タンパク質のX線結晶解析をはじめとする構造生物学的研究の急速な発展に伴って, 最近次々と報告されている. 例えば, 脱硫酸酵素(スルファターゼ)のシステイン残基(またはセリン残基)由来のホルミルグリシン残基や, ガラクトース酸化酵素のチロシン残基にチオエーテル結合したシステイン残基などは, 新しいタイプのビルトイン補酵素としてその生成機構に興味をもたれる. これらのビルトイン補酵素の形成反応は, 最近発見されたタンパク質の自触的スプライシング反応とともに, タンパク質構造に内在する新しい機能であり, 遺伝子のDNA配列のみからはまったく予想もできない問題を提供している. ポストゲノム時代のバイオサイエンスの進展の方向を見据えつつ, 生化学はもとより, 分子生物学, 構造生物学, 生物有機化学, 生物物理学など, いろいろなアプローチから, 私たちはこれらビルトイン補酵素の形成反応に関する研究を進めている.

文 献

- 1) V. L. Davidson, Ed. : "Principles and Applications of Quinoproteins", Marcel Dekker, Inc., New York (1993)
- 2) J.P. Klinman and D. Mu : Annu. Rev. Biochem., 63, 299 (1994)
- 3) K. Tanizawa : J. Biochem., 118, 671 (1995)
- 4) M.C.J. Wilce, et al. : Biochemistry, 36, 16116 (1997)
- 5) 谷澤克行 : 化学と生物, 35, 569 (1997)

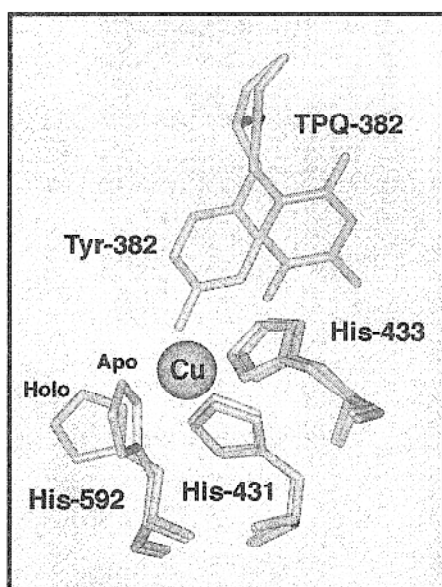


図2 活性部位におけるアポ型 AGAO とホロ型 AGAO の構造の違い