

氏名	高木一好
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1064号
学位授与の日付	平成11年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科農芸化学専攻
学位論文題目	Spectroelectrochemical analysis of quinoprotein amine oxidoreductase reactions (キノプロテインアミン酸化還元酵素反応の分光電気化学的解析) (主査)
論文調査委員	教授 池田篤治 教授 加藤暢夫 教授 井上國世

### 論文内容の要旨

ピロロキノリンキノン (PQQ) が酸化還元酵素の新しいコファクタとして発見されて以来、これまでに4種のキノノイドコファクタの存在が明らかにされている。これらのコファクタを有する酸化還元酵素 (キノプロテイン) のうち微生物由来のものは、ペリプラズム空間における短絡的な電子伝達系の初発酵素として機能し、限られた栄養条件下での微生物のエネルギー代謝に深く関与している場合が多い。PQQ以外のキノノイドコファクタは、酵素ペプチド鎖に共有結合しているため単離が困難で、機能性低分子としての評価を行った研究例は少ない。また、キノプロテインについては、基質との反応特性および構造解析などの報告が豊富な一方で、酸化還元特性を熱力学的視点から詳細に検討した研究例は少ない。本研究では、まず、トリプトファントリプトフィルキノン (TTQ) モデル化合物 (TTQ<sub>a</sub>) について、物理化学的基本特性、ならびにイミノキノン生成反応を解析した。次に、PQQ, TTQ<sub>a</sub>, トーパキノン (TPQ) モデル化合物 (TPQ<sub>a</sub>) の3種のキノノイドコファクタを用いて、それらが触媒する非酵素的アミン酸化反応を解析した。さらに、新規キノヘモプロテインアミン脱水素酵素を単離・精製し、分光電気化学的手法を用い、本酵素の酸化還元特性を明らかにした。これらの結果に基づいて、キノプロテインが触媒するアミン酸化反応機構、酵素分子内ならびに酵素-電子受容体間での電子移動機構について考察した。

1. メチルアミン脱水素酵素の活性中心はTTQであることが1991年に明らかにされた。ここでは、まず、電気化学分析により、TTQ<sub>a</sub>の酸化還元・酸塩基反応といった物理化学的基本特性を明らかにし、TTQ<sub>a</sub>の酸化還元反応がセミキノンラジカル中間体 (TTQ<sub>a</sub><sup>•-</sup>) を経由する2段階1電子反応で進行することを明確にした。EPRスペクトル分析によりTTQ<sub>a</sub><sup>•-</sup>の生成を確認し、TTQ<sub>a</sub>の2つのインドール環における部分的π共役と、そのnon-rigidな構造が示唆された。TTQ<sub>a</sub>はアンモニアと可逆的に反応し、イミノキノン体 (ITTQ<sub>a</sub>) を生成する。UV-visスペクトル分析により、この反応の平衡定数、速度定数を決定した。電気化学分析、EPRスペクトル分析により、ITTQ<sub>a</sub>もセミキノンラジカル中間体 (ITTQ<sub>a</sub><sup>•-</sup>) を経由する可逆的酸化還元挙動を示すことを明らかにした。さらに、TTQ<sub>a</sub><sup>•-</sup>と比較してITTQ<sub>a</sub><sup>•-</sup>は均化反動的に安定化されていることから、触媒反応過程でのITTQ<sub>a</sub>, ITTQ<sub>a</sub><sup>•-</sup>の機能について論じた。

2. PQQ, TTQ<sub>a</sub>, TPQ<sub>a</sub>のアミン酸化触媒能を生成物分析、電気化学分析で評価し、本反応がキノノイドコファクタとアミンの濃度に関する2次反応であり、再酸化過程は律速段階でないことを明らかにした。また、触媒反応過程での電気化学分析、EPRスペクトル分析の結果、アミノフェノール、イミノセミキノンの生成を確認した。これらの結果から、キノノイドコファクタが触媒するアミン酸化反応はアミノ基転移反応機構で進行することを明確にした。さらに、これらの知見から、銅アミン酸化酵素のCu<sup>II</sup>は、TPQあるいはリジンチロシルキノンの2電子還元体に対して分子内1電子受容体として機能することによって、キノノイドコファクタの酸素酸化反応を促進し、さらに、TPQ酵素の場合には、TPQの解離型水酸基に弱く配位し、これをo-キノンの電子構造にする機能をも有するものとして、その役割を説明した。

3. *Paracoccus denitrificans* IFO 12442をメチルアミンを炭素源として培養し、新規キノヘモプロテインアミン脱水素酵

素 (QH-AmDH) を単離・精製した。QH-AmDHは2つのサブユニットから構成される $\alpha\beta$ 構造を有し、 $\alpha$ サブユニットにはヘムcとキノノイドコファクタが存在することを明らかにした。本酵素が触媒するアミン酸化反応について速度論的解析を行い、基質アミン、人工電子受容体について速度論的パラメータを決定するとともに、カルボニル試薬による非可逆的反応阻害を確認した。次に、メディエータ型間接カラム電解分光法を用い、QH-AmDHのヘムc部位の1電子酸化還元電位を決定した。

一方、基質アミンによる滴定におけるヘムc部位の酸化還元挙動を電気化学理論に基づいて解析し、UV-visスペクトルでは直接検出不可能なキノノイドコファクタ部位の2段階の酸化還元電位を分離評価した。これらの結果に基づいて、本酵素分子内における電子移動経路について論じた。

## 論文審査の結果の要旨

キノノイドコファクタおよびキノプロテインが触媒する生体内酸化還元反応の重要性については、これまでも多くの報告がある。一方で、キノノイドコファクタを機能性低分子として評価をした研究例は少なく、それらが触媒するアミン酸化反応機構については、未だ統一的な解釈には至っていない。また、キノプロテインについては、酸化還元特性を熱力学的視点から詳細に検討した研究例は少ない。そのような背景の下、本論文では、キノノイドコファクタおよびキノプロテインが触媒するアミン酸化反応に注目し、機能性低分子としてのキノノイドコファクタの特性評価、キノノイドコファクタが触媒するアミン酸化反応機構の解析、さらに新規キノヘモプロテインアミン脱水素酵素の酸化還元挙動解析を行っている。特に、電気化学的および分光学的手法やカラム電解分光法といった分析手法を積極的に取り入れ、物理化学的視点からの詳細な解析を行っており、評価すべき点は以下の通りである。

1. TTQモデル化合物 (TTQ<sub>0</sub>)、および、そのイミノキノン体 (ITTQ<sub>0</sub>) について、詳細な電気化学分析により物理化学的基本特性を明らかにしている。さらに、分光学的分析手法を用い、TTQ<sub>0</sub>の酸化還元挙動における構造的情報も得ている。特に、TTQ<sub>0</sub>ならびにITTQ<sub>0</sub>について、セミキノンラジカル中間体を經由した2段階1電子酸化還元反応を明確にし、酵素-電子受容体間での電子移動機構を考察した点は評価に値する。
2. キノノイドコファクタが触媒するアミン酸化反応を生成物分析、電気化学分析によって速度論的視点から詳細に検討するとともに、EPRスペクトル分析により反応中間体ラジカルの検出とその帰属を試み、アミン酸化反応機構を明らかにしている。さらに、これらの知見を基に、アミン酸化酵素におけるCu<sup>II</sup>の役割についても斬新な提唱を行っている。
3. 活性中心にヘムcとキノノイドコファクタの両方を有する新規アミン脱水素酵素を *Paracoccus* 属より精製し、その生化学的基本特性を明らかにしている。さらに、新規な分析手法であるカラム電解分光法、ならびに基質滴定の電気化学理論に基づいた解析により、本新規酵素の酸化還元特性を明らかにし、熱力学的視点からその詳細を論じている。

以上のように、本論文は、キノプロテインアミン酸化還元酵素反応について、電気化学的および分光学的手法を用い、コファクタレベルから酵素レベルにわたって、その機能特性を定量的に明らかにしており、酵素化学、機能生物化学、ならびに生物電気化学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成11年2月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。