



Title	Crystal structure of human monoamine oxidase A at 2.2Å resolution and a functional role of the transmembrane helix
Author(s)	Son, Seyoung
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1452
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【8】

氏 名 孫 世 永

博士の専攻分野の名称 博士(理学)

学位記番号 第 22384 号

学位授与年月日 平成20年6月23日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
理学研究科高分子科学専攻

学位論文名 Crystal structure of human monoamine oxidase A at 2.2 Å resolution and a functional role of the transmembrane helix
(2.2 Å分解能でのヒト由来モノアミン酸化酵素Aの結晶構造とその膜貫通ヘリックスの機能的役割)

論文審査委員 (主査)
教授 中川 淳史

(副査)
教授 後藤 祐児 教授 原田 明 准教授 鈴木 守
名誉教授 月原 富武

論文内容の要旨

ヒト由来モノアミン酸化酵素(MAO)は生体内でモノアミン酸化を触媒するタンパク質として知られている。このタンパク質は二つのサブタイプ(AとB)が存在する。この二つのサブタイプは約70%のホモロジを有するにも関わらず、MAOAの場合5-HT(セロトニン)を基質としてclorgylineを阻害剤として認識していることに対し、MAOBはPEA(フェニルエチルアミン)を基質としてDeprenylを阻害剤として認識することが知られており、異なる基質阻害反応特異性を示している。

モノアミン酸化酵素が生体中のモノアミンである神経伝達物質を酸化することと、この酵素からの生成物である過酸化水素が特別な環境下で分解され酸化ストレスの原因物質である酸化ラジカルと活性酸素を作ることから、このタンパク質はいくつかの重要な精神疾患と神経症の原因となる。の中でも特にMAOAはうつ病、MAOBはパーキンソン病とアルツハイマー病の原因になることが知られている。

このような神経症治療の観点で、新しくて効果的な阻害剤の開発にはその阻害と触媒メカニズムの相関特に立体構造に基づいた相関を明確に理解することが極めて重要である。特に、二つのサブタイプの3次元構造の違いからその特異的選択性の差を理解することが、いろいろな神経症と精神疾患の効果的治療に直接つながる非常に重要なことになるとされる。本研究では、以前に報告された構造-ヒト由来のモノアミン酸化酵素A、B-に基づいて、ヒト由来のモノアミン酸化酵素Aの構造的特徴を明らかにすることを目的とした。それとともに、まだその機能に明らかになっていない一本鎖膜貫通ヘリックスの機能を生理的活性測定と構造面から検討した。

モノアミン酸化酵素の構造解析のために、酵母系を発現系とした大量発現系を構築し、1回の培養で20mgオーダーで定常的に結晶化に適したサンプルが得られるようになった。しかし、当初得られた結晶はすべて双晶であり、その問題解決のためにシーディングや添加剤の添加、新たな結晶化条件の探索などを行い、最終的に、全く新しい結晶化条件から単結晶を得ることができた。

ヒト由来MAOAの野生型構造は2.2Å分解能で決定することに成功した。現在まで報告されているモノアミン酸化酵素Aの内、最も高い分解能を示しており、活性中心での可逆的阻害剤といくつかの水分子の確認が可能であった。さらにその活性測定の結果を構造面から理解するために、もう一つの変異体構造(G110A)を2.17Åで決定した。

一昨年他のグループにより報告されたヒト由来酸化酵素Aの構造は、以前我々の研究室から発表されたラット由来モノアミン酸化酵素Aの構造と基質/阻害剤入口のループ構造が大きく違い、阻害剤と基質の出入と活性中心での基質/阻害剤結合が大きく変わることが示されていたが、本研究での二つの構造-野生型と変異体-から、ヒト由来MAOAはラット由来のモノアミン酸化酵素Aの構造と高い類似性を持っていることを確認した。

他のサブタイプであるモノアミン酸化酵素Bとの構造比較から基質/阻害剤特異的選択性が一つのアミノ酸残基(A:I335→B:Y326)の構造的制限によることが明らかになった。この構造的特徴の解析とともに、ラット由来MAOAの構造から考察された重要な機能を持っていると思われる入口のループ構造の内の一つの残基に変異を導入した変異体を作成し、その生理活性測定を行った。野生型と変異体の構造を、その生理的活性と共に比較することにより、その機能的役割を解明した。さらに、膜に結合している膜結合型と可溶化されている可溶化型の二つの種類のタンパク質の活性を比較し、膜貫通領域である一本鎖ヘリックスが膜中に結合していることで酵素の活性を促進する機能的役割を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本研究では、生体中の神経伝達物質であるモノアミンの酸化を触媒し、うつ病などの神経疾患の治療薬のターゲットとなるヒト由来のモノアミン酸化酵素A(MAOA)の立体構造をX線結晶構造解析法を用いて2.2Å分解能で決定した。さらに、その構造に基づいて、MAOAの基質認識機構や特異性の解明を行った。

モノアミン酸化酵素は、1本の膜貫通ヘリックス構造を持つ膜結合タンパク質である。膜タンパク質の結晶構造解析は困難な場合が多い。本研究では酵母を用いた発現系を用いることにより20mgオーダーで定常的に結晶化

に適したサンプルを得ることができるようになった。最初に得られた結晶は双晶であったが、さらに結晶化条件の検討を続けることにより単結晶を得ることに成功した。この結晶は、2.2Å分解能という、これまでに報告されているモノアミン酸化酵素の中で最も高分解能の回折像を与える良質の結晶であった。

2006年に報告されたヒト由来MAOAの構造に比べて、より高分解能の構造が得られたことにより、基質結合部位の入り口にあるループの構造を精度良く決定することができた。その高分解能の構造に基づいて、このループ構造が生理活性に重要であるという仮定を提案し、それを変異実験を通して生化学的に証明した。また、MAOBとの構造比較により、基質特異性が一つのアミノ酸残基の置換(I→Y)の構造的な制限によることを示した。さらに、膜に結合した状態と界面活性剤で可溶化した状態での活性測定から、膜貫通領域の一本鎖αヘリックスが膜に固定されることによって、この酵素の活性を促進することを明らかにした。

本研究では、モノアミン酸化酵素の2つのサブタイプの基質認識機構の違いを詳細な原子構造によって明らかにし、神経疾患の治療薬となる阻害剤開発に必要な、基質/阻害剤の認識および結合機構についての詳細な状況を得た。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。