



Title	Study on Substrate Binding to Human Tryptophan 2, 3-Dioxygenase
Author(s)	Fukumura, Eiko
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/23466
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	ふく むら えい こ
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 6 9 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 21 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	Study on Substrate Binding to Human Tryptophan 2,3-Dioxygenase (ヒト由来トリプトファン 2,3-ジオキシゲナーゼへの基質結合に関する研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 招へい教授 城 宜嗣 (副査) 教 授 福山 恵一 教 授 倉光 成紀

論文内容の要旨

酸素添加酵素は、分子状酸素を直接、基質に挿入する反応を触媒する酵素であり、一原子酸素添加酵素と二原子酸素添加酵素の二つに分類される。現在、ヘム鉄を補因子とする二原子酸素添加酵素は、Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) と Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) の 2 種類のみが同定されている。IDO と TDO は、どちらもトリプトファン (L-Trp) のインドール環の 2,3 位に酸素原子を添加し、*N*-formylkynurenine を生成する反応を触媒する。その反応は、生体内 L-Trp 代謝の主要経路であるキヌレニン経路の第一段階かつ律速段階の反応である。IDO と TDO は、アミノ酸配列の相同性はなく、TDO はホモ四量体として、IDO は単量体として機能する。本研究では、特にヒトの TDO (hTDO) を研究対象とし、その特異な酵素反応における基質認識機構および反応機構を分子レベルで理解することを目的として研究を行った。酵素活性と基質結合に重要な役割を担うであろうアミノ酸残基として、組換え (recombinant) ヒト (human) TDO (rhTDO) の Tyr42 と His76 に着目した。野生型酵素、ならびに Tyr42 の変異体 (Y42F 変異体) と His76 の変異体 (H76A 変異体) について、これらの酵素活性と基質 (L-Trp) 結合に伴う構造変化を、共鳴ラマン分光法ならびに可視吸収スペクトル法を用いて追跡した。さらに、rhTDO の結晶化にも取り組んだ。

rhTDO は、基質である L-Trp と酸素の存在下で、ヘム鉄が酸化型 (Fe^{3+}) の時に高い酵素活性を有した。 Fe^{3+} の野生型 rhTDO に、 O_2 非存在下で基質 L-Trp を滴定すると、共鳴ラマンスペクトル、可視吸収スペクトルとともに大きく変化した。特に、ラマンスペクトルにおいては、鉄のスピニ状態を反映するバンド、ヘムのプロピオン酸基と 4 位のビニル基の変角振動を示すバンドの変化が最も顕著であった。これらのスペクトル変化は、基質濃度変化に対して、すべてシグモイド型の曲線を示した。この結果により、L-Trp 結合に伴うヘム鉄のスピニ状態変化、およびプロピオン酸基と 4 位ビニル基の構造変化には、ホモ四量体 TDO のサブユニット間で協同性が存在する事を明らかにした。H76A および Y42F 変異体については、 k_{cat}/K_m (触媒効率) が、野生型に対して、著しく低下した。これらの変異体への L-Trp 結合には、野生型で見られたようなヘム鉄の大きなスピニ状態やヘム構造の変化は観測されず、協同性も確認されなかった。近年明らかになった、バクテリアである *Xanthomonas*

campestris TDO の結晶構造を参考にすると、hTDO の Tyr42 はホモ四量体中で隣り合うサブユニットの活性部位の形成に寄与しており、このようなサブユニット間の密接な相互作用が協同性発現に重要であることが示唆された。一方、hTDO の His76 は酵素反応において、結合した基質 L-Trp の NH 基からプロトンを引き抜く役割を果たしていると考えられた。rhTDO の結晶化については、得られた結晶を用いて、SPring-8 で回折実験を行った結果、空間群や格子定数を決定することができた。しかし、分解能が低く、構造解析には至らなかった。

生体内の L-Trp は、キヌレニン経路とは別のセロトニン経路によっても代謝されて神経伝達物質へと変換される。このことから、hTDO への基質結合の協同性は、体内の L-Trp 濃度の変化に対応した代謝経路の調節という生理的な役割と関係していると推測できた。

論文審査の結果の要旨

酸素添加酵素は、空気中の酸素分子からの酸素原子を直接基質に挿入する反応を触媒する酵素であり、約 50 年前に当時の京大医学部早石修教授によって発見された。その興味深い化学反応に加え、生体内物質代謝において重要な役割を果たしている事から、多いに注目されている酵素である。学位申請者 福村栄維子は、肝臓に特異的に発現しており、生体内におけるトリプトファン代謝において重要な役割を果たしている酸素添加酵素トリプトファン 2,3-ジオキシゲナーゼ (TDO) を研究対象とした。TDO は、ヘムを活性中心に有し、分子状酸素の 2 酸素原子を直接基質 (L-Trp) に挿入する反応を触媒する。本申請者は、TDO の基質認識機構および反応機構の分子レベルでの理解を目的に研究を行った。可視および共鳴ラマンを用いた分光測定により、基質結合に伴う酵素構造の変化を明らかにした。その結果、ホモ四量体である TDO への L-Trp の結合には、サブユニット間に協同性が存在する事を初めて発見した。さらに、TDO 変異体を調製し、それらの解析から、活性中心に存在する Tyr42 と His76 が協同性の発現に重要な働きをしている事を見いだした。これらの結果は、TDO による L-Trp 代謝の反応機構だけでなく、その生理的な重要性を理解する上で重要な知見である。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。