

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | ピリドキサルリン酸依存性ヒスチジン脱炭酸酵素の親和標識   |
| Author(s)    | 林, 秀行   |
| Citation     | 大阪大学, 1986, 博士論文  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/35240">https://hdl.handle.net/11094/35240</a> |
| rights       |   |
| Note         |   |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

主 論 文

ピリドキサルリン酸依存性ヒスチジン脱炭酸酵素の親和標識  
Affinity Labeling of Pyridoxal 5'-phosphate-dependent  
Histidine Decarboxylase

大阪大学医学部薬理学第二講座  
Department of Pharmacology, Medical School, Osaka University  
林 秀行  
Hideyuki Hayashi

## 和文抄録

ラット胎児肝臓および *Morganella* AM-15 のピリドキサーリン酸依存性ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) の  $\alpha$ -フルオロメチルヒスチジン (FMH) による失活反応を調べた。動力学的解析により、FMH が HDC の活性部位で化学的に活性化されたのちに HDC を修飾することが示された。修飾酵素の蛋白質化学的解析により、特定のセリン残基が FMH によって修飾を受けていることを明らかとした。また失活反応の機構は従来 B6 酵素の自殺基質について一般的に考えられていたものとは異なり、部分的にアスパラギン酸アミノ機転移酵素のセリン-O-硫酸による失活機構に類似した新しい型の反応であることが判明した。

## Abstract

Inactivation of pyridoxal 5'-phosphate-dependent histidine decarboxylase from fetal rat liver and Morganella AM-15 by  $\alpha$ -fluoromethylhistidine was studied. Kinetic analysis of the inactivation revealed a chemical processing of  $\alpha$ -fluoromethylhistidine at the active site of the enzyme, followed by a covalent modification of the enzyme protein. However, the experimental findings do not agree with the classical mechanism of inactivation of pyridoxal enzymes by  $\beta$ -substituted amino acids, and a novel mechanism which partially resembles to that of inactivation of aspartate aminotransferase by serine-O-sulfate is presented.

Key words;

Histidine decarboxylase (HDC),  $\alpha$ -fluoromethylhistidine (FMH), Suicide substrate, Pyridoxal 5'-phosphate (PLP), Pyridoxamine 5'-phosphate (PMP), Carbonyl group, Michael addition

## 緒言

ヒスチジン脱炭酸酵素 (L-histidine carboxy-lyase, E.C.4.1.1.22: 以下 HDC と略記) は L-ヒスチジン → ヒスタミン + CO<sub>2</sub> の反応を触媒する酵素である。HDC はヒスタミン生成を行なう唯一の酵素であるため、生体内ヒスタミンの動態を探る上で重要であり、また最近では渡辺らによって、本酵素を指標とすることにより脳内ヒスタミン神経線維の同定がなされる 1) 2) など現在注目を集めつつある酵素である。ヒスタミンを涵濁させる目的で種々の HDC 阻害剤が開発されてきたが 3)、1978 年 Kollonitsch ら 4) によって合成された  $\alpha$ -フルオロメチルヒスチジン (FMH) が非常に強力な阻害作用をもつことがわかり、現在 *in vivo* でのヒスタミンの研究に広く用いられている。

FMH の阻害機構については従来 FMH が HDC の作用によって脱炭酸と脱フッ素化を受け、生じた活性なエナミン-PLP シッフ塩基に対

し HDC の アミノ酸残基が求核付加を行ない、その結果 HDC が親和標識を受け、失活すると考えられていた 4) 。ところが、この親和標識が上記の機構からは予想できない不安定性を示すことがラット胎児 HDC (以下 rHDC と略記) について見出され 2) 、阻害機構の再検討が必要となってきた。そこで rHDC、及び量的に十分量得ることのできる Morganella 属細菌 5) の HDC (以下 mHDC と略記) について FMH による失活反応を詳しく検討することにした。

## 実験材料及び方法

### HDC の精製

HDC はラット胎児肝 400g より田口らの方法 2) により、また Morganella AM-15 菌体 200g より棚瀬ら 5) の方法により精製した。最終比活性、収量、収率はそれぞれ 1 IU/mg、0.3mg、2% および 70 IU/mg、48mg、

40%であった。

### HDCの活性測定法

HDCの活性測定は0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH 6.5、安定化剤として0.1mM EDTA、0.02mM DTTを含む)中37°Cにおいて行なった。rHDCでは0.25mM L-ヒスチジンを基質とし、生成したヒスタミンを蛍光法<sup>2)</sup>により、またmHDCでは20mMの[1-<sup>14</sup>C]-L-Hisを基質とし、生成した<sup>14</sup>C O<sub>2</sub>を市山らの方法<sup>5)</sup>によりそれぞれ測定した。

### アポ酵素の調製

アポHDCはホロHDCを0.1M L-システインに対して透析し、PLPをチアゾリジン誘導体として除くことにより調製した。

### HDCのFMHによる失活(親和標識)

失活(親和標識)反応は活性測定用緩衝液中にてHDCをFMHと共に温置することにより行なった。

<sup>14</sup>C又は<sup>3</sup>Hで標識したFMHを用いて失活反応を行なわせたあと、20mMのリン酸カリウム緩

衝液 (pH 6.5) に透析して未反応の FMH を除き、HDC に結合した放射活性を測定して FMH による親和標識の状況を観察した。

### $^3\text{H}$ -FMH で親和標識した mHDC の蛋白質化学的解析

4.3 mg の mHDC (100 n mol) を上記の方法で 10  $\mu$  mol の  $^3\text{H}$ -FMH と共に 25°C 15 min 温置して完全に失活させたのち、3 mg の  $\text{NaBH}_4$  を加え、25°C 30 min 放置した。

凍結乾燥標品を Crestfield の方法 6) に従って還元カルボキシメチル化したのち、1 ml の 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、1 mM  $\text{CaCl}_2$  中にて 1/100 (重量比) 量の TPCK-トリプシンを加えて 37°C 3 h 消化した。

トリプシン消化物をセファデックス G-50 カラム (20  $\times$  800 mm) にて 0.05 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  を用いて分画した。放射活性、画分を集めて凍結乾燥したあと、Zorbax ODS カラム (4.6  $\times$  250 mm) にてアセトニトリル-トリフルオロ酢酸系で展開し、標識ペプチドを得た。

ペプチドを更に断片化するために、10 nmol  
のペプチドを 0.2 ml の 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  /  
1 mM  $\text{CaCl}_2$  中にて 1/1000 (モル比) 量のサ  
ーモリシンとともに 40 °C 2 h 温置した。断  
片は Zorbax ODS カラムを用いて同様に分離し  
た。

ペプチドのアミノ酸分析は 5 ~ 10 nmol の  
ペプチドを 5.7 N  $\text{HCl}$  中真空下 110 °C 20 h  
加水分解した試料について行った。ペプチド  
の一次構造は DABITC/PITC 二重カップリング  
法 7) 及びカルボキシペプチダーゼ Y 法 8)  
を用いて決定した。

## 結果

## 1. rHDCの FMHによる失活反応

rHDCは FMHの存在下、擬一次反応的に失活した (Figure 1a)。失活反応の見かけの速度定数  $k_{app}$  とその時の FMHの濃度の両逆数プロットをとると直線上に並び (Figure 1b)、いわゆる“自殺基質型”の失活反応様式を示した。これより FMHと rHDCの解離定数  $K_i = 0.01 \text{ mM}$ 、失活の速度定数  $k_{inact} = 0.25 \text{ min}^{-1}$  が算出された (Table 1)。

## 2. 基質 L-ヒスチジンの失活に対する保護作用

FMHによる rHDCの失活の速度は、L-ヒスチジンを共存することによって緩慢となった (Figure 2)。1.の結果と合わせ、FMHは rHDCを失活させるに先立って rHDCの活性部位に可逆的に結合することが示された。

## 3. 2-メルカプトエタノールの失活に対する保護作用

2-メルカプトエタノールは HDCの非拮抗的

阻害剤 5) 9) であり、補酵素 PLP と基質ヒスチジンとの間に形成されるシッフ塩基に付加して脱炭酸反応を妨げるため、基質飽和濃度における脱炭酸速度が減少する。同様に飽和濃度の FMH の存在下の失活反応の速度定数  $k_{inact}$  の値も 2-メルカプトエタノールが存在すると小さくなり (Table 2)、FMH が PLP とシッフ塩基を作って脱炭酸を受けることが失活反応においても重要であることが示唆された。

#### 4. FMH の各部分の rHDC への取り込み

異なる部位を  $^{14}C$  で標識した FMH で rHDC を失活させ、透析を行なった後に、HDC に取り込まれた放射活性を測定した (Table 3)。イミダゾール 2 位炭素を標識した場合には化学量論的に rHDC へ放射活性が取り込まれたが、カルボキシル炭素を標識した場合は取り込みが見られなかった。このことは、FMH は rHDC と不可逆的に結合するが、その時にはカルボキシル基を失っていることを示している。

以上の結果を総合すると、FMHはrHDCの活性部位のPLPと結合して脱炭酸を受けて活性化され、rHDCと不可逆的に結合すると考えられる。以後HDCに結合したFMHに由来する物質のことを“標識”と呼ぶことにする。

### 5. 標識の安定性

[imidazole 4-<sup>3</sup>H]-FMHを用いて失活させたrHDCに取り込まれた放射活性を測定することにより標識の安定性を調べた(Table 4)。

◀ 標識はpH 6.5の緩衝液中では長時間安定であるが、失活rHDCを尿素で変性させるとrHDCから遊離した。ただし、尿素で変性させる前に失活rHDCをあらかじめNaBH<sub>4</sub>で還元しておくこと、尿素変性後も標識はrHDCに結合したままであった。

これは従来の反応機構では説明できない現象であるが、この点を更に詳しく検討するためにはrHDCでは量的に限界がある。mHDCは失活に関してrHDCと同様の挙動を示し(10)、量的にも蛋白質化学的に充分量が得られるた

め、mHDCを用いて以下の検討を行った。

## 6. 遊離した標識物質の性状

$^3\text{H}$ -FMHで失活した mHDC 0.4 mg から熱変性によって遊離して来る放射活性物質の吸収スペクトルを Figure 3A に示した。この物質のスペクトルは PLP、PMP のそれとは異なっており、現在までに知られているビタミン B<sub>6</sub> 誘導体の中では Schnackerz (11) によって合成された PLP とピルビン酸の縮合物 (Figure 3B) によく類似していた。放射活性から計算した分子吸光係数は  $7,500 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  と Schnackerz 複合体のそれとよい一致を示した (12)。

## 7. 標識ペプチドの単離

$^3\text{H}$ -FMHで失活させた mHDC を  $\text{NaBH}_4$  で還元し、カルボキシルメチル化したのちにトリプシンで消化し、消化物をセファデックス G-50 で分画して、 $^3\text{H}$  に由来する放射活性を有する画分を集めて凍結乾燥した。乾燥標品を 1 ml の 0.1% トリフルオロ酢酸溶液に溶解し、

0.2 ml ずつを同溶液で平衡化した Zorbax ODS カラム (4.6 × 250 mm) に添加し、アセトニトリルを40分間に50%濃度まで直線的に上昇させることにより展開を行った (Figure 4)。その結果ただ一つのペプチドのピークに一致して放射活性と314 nmの吸収のピークが見られた。このペプチドは再度第二の溶媒系 (0.1% トリフルオロ酢酸中2-プロパノールの濃度勾配) にて精製を行い、単一の標品とした。

また  $^3\text{H}$ -FMHによる失活や  $\text{NaBH}_4$ 還元をほどこしていない mHDCからも同様の操作で標識ペプチドに対応する非標識ペプチドを得た。

## 8. ペプチドの構造解析

上記の両ペプチドのアミノ酸組成を Table 5 に示す。両者の比較から、非標識ペプチドにおいて2残基存在するセリンのうち1残基が FMHとの反応で失われていることが明らかである。これらのペプチドをサーモリシンで断片化すると両者とも大小2個の断片に分かれた。それぞれのアミノ酸組成は Table 5 に

示す通りである。Th-2は標識、非標識ペプチド両者について同じであり、一方Th-1は非標識ペプチド由来のものはアスパラギン酸とセリンであったが、標識ペプチド由来のものは、アスパラギン酸のみであり、これによりFMHと反応したセリンはTh-1上にあることがわかる。

Figure 5に標識ペプチドのアミノ酸配列を示す。Th-1、Th-2が図の如く帰属されること、Th-1が放射活性をもつこと、更にデータは示していないがエドマン分解の第2段で放射活性がペプチドから遊離することから、N末端よりも2番目のセリンがFMHと反応したことが明らかとなった。

## 考察

以上の結果より FMHは基質類縁体として HDCの活性部位に可逆的に結合（おそらく PLPと Schiff塩基を形成）したあと、HDCの触媒作用によって脱炭酸を受けて活性化され、HDCのセリン残基（ $m$ HDCの場合）に非可逆的に結合して HDCを失活させることが明らかとなった。

失活反応の速度論的パラメーター  $K_I$  ,  $k_{inact}$  を通常の脱炭酸反応のパラメーター  $K_m$  ,  $k_{cat}$  と比較してみると (Table 1)  $r$ HDC、 $m$ HDCいずれにおいても  $K_I$  は  $K_m$  より小さく、FMHがヒスチジンよりも強く HDCと（可逆的に）結合することがうかがわれる。一方  $k_{inact}$  の値は  $r$ HDC、 $m$ HDCともに  $k_{cat}$  の値の  $1/100$  程度である。 $k_{inact}$  は ① FMHの脱炭酸 ② 活性化された FMHと HDCの間の共有結合の形成のうち、律速段階となる方の速度定数に一致するはずであるが、1)  $r$ HDCは  $m$ HDCに比べて  $k_{cat}$  の値が小さいが、

$k_{inact}$  の値も同じ程度に小さいこと。即ち失活速度が HDC の脱炭酸反応を触媒する能力に依存していること。2) 2-メルカプトエタノールによって FMH の脱炭酸を妨げると  $k_{inact}$  の値が減少したこと (Table 2) により  $k_{inact}$  は HDC による FMH の脱炭酸の速度を反映していると考えられる。従って FMH は L-ヒスチジンに比べて約 1/100 の速さで脱炭酸を受けているということが出来る。

失活した HDC における FMH に由来する標識と HDC との結合は比較的不安定で、 $\text{NaBH}_4$  を用いて還元しない限り、失活酵素の変性によって結合が解離した (Table 4)。ここで遊離した物質を調べたところ、この物質は FMH に由来するイミダゾール環と補酵素ピリドキサーリン酸に由来するヒドロキシピリジン環を有しており、その吸収スペクトルの性質から、Schnackerz 複合体 (Figure 3B) と同じ共役二重結合の系を持つものと推定された。

以上の点を考慮に入れて、得られた実験結

果をすべて矛盾なく説明できる失活機構を Figure 6 に示した。まず、FMH はヒスチジンと同様に HDC の補酵素 PLP と Schiff 塩基を形成して脱炭酸を受けフッ素イオンを脱離してエミナン-PLP Schiff 塩基 III を生じる。III は当初 PLP を結合していたリシン残基との間にイミノ基転移反応を起こして遊離のエナミン VI となる。VI のメチレン炭素は遊離のアミノ基からの電子を受けいれて求核性を持つため PLP の 4'-炭素を攻撃し、その結果 Schnackerz 複合体に類似の物質 VIII が生じる。VIII の 4'-C に対して HDC のセリン残基の水酸基が求核攻撃を行い、その結果 VIII と HDC との間に共有結合が生じる (IX)。しかし失活 HDC を変性させると、IX の構造を安定化していた立体的な要因が失われて、再び逆反応が起こり、VIII が HDC から遊離する。IX のカルボニル基が 4'-炭素との間の炭素上のプロトンを活性化することによりこの逆反応を促進しているが、 $\text{NaBH}_4$  で処理すると IX が X に還元されて、IX  $\rightarrow$  VIII

の逆反応が起こらなくなり、標識と酵素の結合が安定化すると説明される。

Ⅷ → Ⅸは一種のミカエル付加反応であるが、通常の場合と異なり、ここではピリジン環の電子吸引性のため、4'-炭素の反応性がやや乏しくなっている。しかし、カルボニル炭素をセリンが攻撃すると生成物がヘミアセタールとなって不安定であること、またその場合は  $\text{NaBH}_4$  還元による結合の安定化を説明し得ないことから4'-炭素がセリンによって攻撃を受けると考えるのが自然である。従来は、Ⅲのメチレン炭素に HDCの求核性残基が結合すると考えられていたが4)、その仮説によると失活 HDCの変性によって PLP或いは PMPが遊離され、また  $\text{NaBH}_4$  で還元しなくても FMH由来の部分と HDCとの結合は安定のはずであり、両方とも実験結果に矛盾している。従って、少なくとも HDCについては従来の仮説は当てはまらない。今まではⅢのメチレン炭素の反応性が過大に評価されていた

が、Table 6 に示した III のフロンティア電子密度の計算ではむしろ 4'-炭素の方が求核攻撃を受け易く、必ずしもメチレン炭素の反応性が特別に高いとは言えない。4'-炭素が HDC のリシンによって攻撃を受けると Figure 6 の III → VII の反応が起こることになり、これも Figure 6 の反応機構を支持している。

修飾されたセリン残基の役割は今のところ不明であるが、補酵素 PLP との位置関係から、触媒反応において何らかの意義を有するものと思われる。この点については今後更に検討を加えて行く方針である。

本稿を終えるにあたり、本研究において終始御指導下さり、本稿の御校閲の労を賜わりました和田博教授、Morganella の酵素に関する研究の機会をお与え下さいましたテキサス大学 エズモンド・E・スネル教授に心より感謝の意を表します。

## 文献

- 1) Watanabe T, Taguchi Y, Hayashi H, Tanaka J, Shiosaka S, Tohyama M, Kubota H, Terano Y, Wada H: Evidence for the presence of histaminergic neuron system in the rat brain: an immunohistochemical analysis. *Neurosci. Lett.* 39: 249-254, 1983
- 2) Taguchi Y, Watanabe T, Kubota H, Hayashi H, Wada H: Purification of histidine decarboxylase from the liver of fetal rats and its immunochemical and immunohistochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 259: 5214-5221, 1984
- 3) 渡辺建彦, 田口吉孝, 和田博; ヒスタミンの代謝と関連酵素 - ヒスチジン脱炭酸酵素を中心に. *蛋白質核酸酵素*. 26: 1447-1461, 1981
- 4) Kollonitsch J, Patchett AA, Marburg S, Maycock AL, Perkins LM, Doldouras GA, Duggan DE, Aster SD: Selective inhibitors of biosynthesis of aminergic neurotransmitters. *Nature* 274: 906-908, 1978
- 5) Tanase S, Guirard BM, Snell EE: Purification and properties of a pyridoxal 5'-phosphate-dependent histidine decarboxylase from *Morganella morganii* AM-15. *J. Biol. Chem.* 260: 6738-6746, 1985
- 6) Crestifield AM, Stein WH, Moore S: Alkylation and identification of the histidine residues at the active site of ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 238: 2413-2420, 1963
- 7) Chang JY, Brauer D, Wittmann-Liebold B: Micro-sequence analysis of peptides and proteins using 4-N,N-dimethylaminoazobenzene 4'-isothiocyanate/phenylisothiocyanate double coupling method. *FEBS Lett.* 93: 205-214, 1978
- 8) Hayashi R, Bai Y, Hata T: Kinetic studies of carboxypeptidase Y. *J. Biochem.* 77: 69-79, 1975
- 9) Wada H, Hayashi H, Watanabe T: Mammalian histidine decarboxylase: purification, characterization, and immunohistochemistry. *Fed. Proc.* 43: 1494, 1984
- 10) Hayashi H, Tanase S, Snell EE: Pyridoxal 5'-phosphate-dependent histidine decarboxylase. Inactivation by  $\alpha$ -fluoromethylhistidine and comparative sequences at the inhibitor- and coenzyme-binding sites. *J. Biol. Chem.* in press, 1986

- 11) Schnackerz K, Ehrlich JH, Giesemann W, Reed TA: Mechanism of action of D-serine dehydratase. Identification of a transient intermediate. Biochemistry 18: 3557-3563, 1979
- 12) Likos JJ, Ueno H, Feldhaus RW, Metzler DE: A novel reaction of the coenzyme of glutamate decarboxylase with serine-O-sulfate. Biochemistry 21: 4377-4386, 1982
- 13) 菊池修 ; 分子軌道法 — 電算機によるその活用 . 106-110, 培風館, 東京, 1971
- 14) Nagata C, Yamaguchi T: Molecular orbital study on the reaction mechanism of irreversible enzyme inhibitors. J. Med. Chem. 22: 13-17, 1979

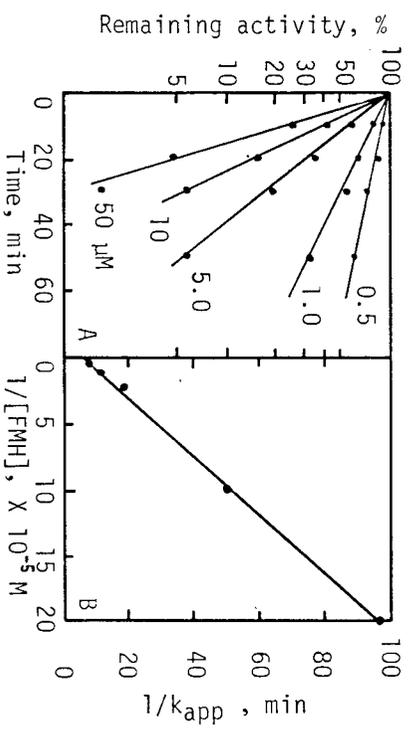


Figure 1. (A) Time course of inactivation of rHDC by FMH. rHDC was incubated with various concentrations of FMH in 1 ml assay mixture at 37°C. At the indicated time, aliquots were taken from the solution to measure the residual activity. (B) Double reciprocal plots of the apparent first order rate constants of inactivation ( $k_{app}$ ) against  $[FMH]$ .

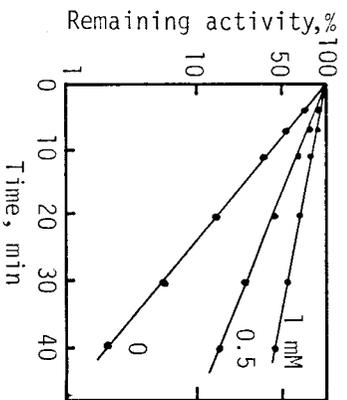


Figure 2. The effect of L-histidine on the rate of inactivation of rHDC by FMH (0.01 mM) at 37°C. Concentrations (mM) of L-histidine are given above the curves.

Figure 2

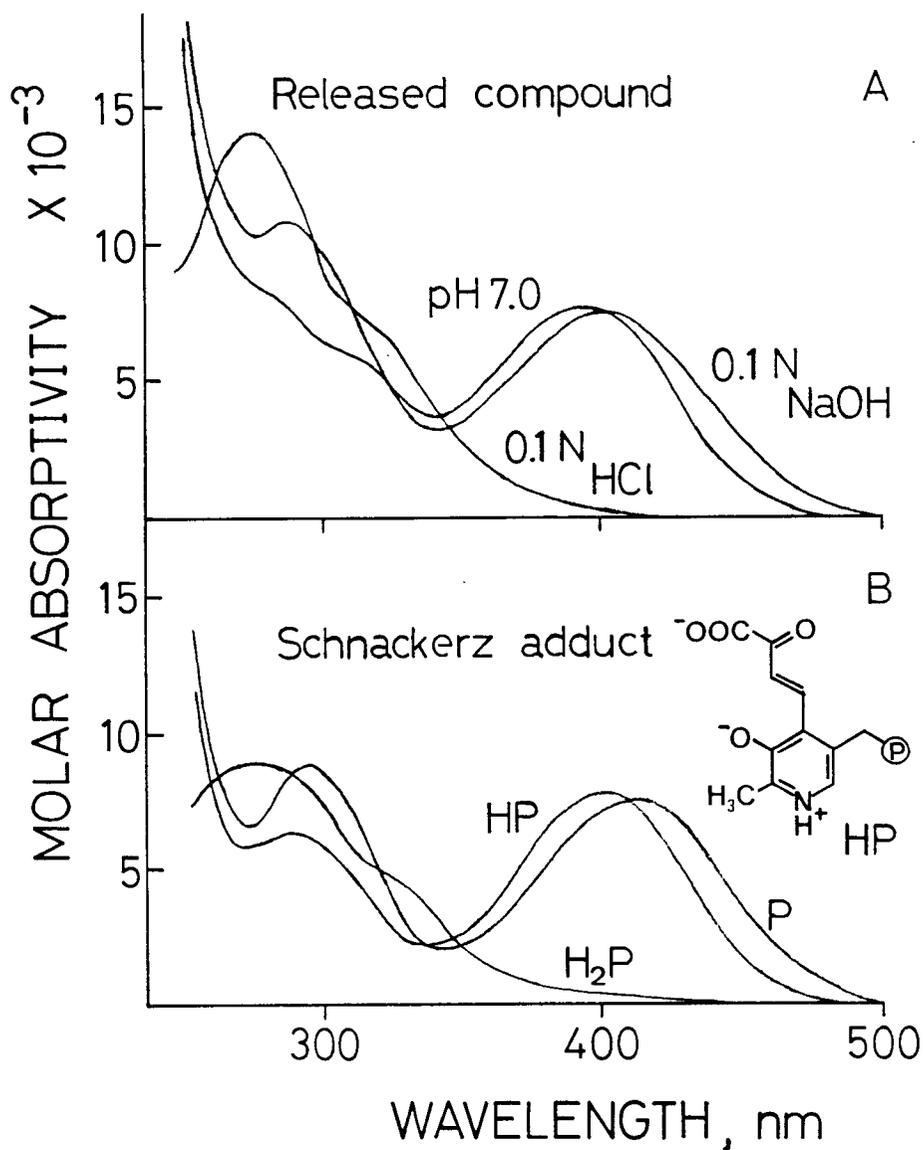


Figure 3. Absorption spectra at various pH values of the product released by heating FMH-inactivated mHDC (A) and the "Schnackerz adduct" (B). <sup>3</sup>H-FMH-inactivated HDC (0.4 mg) was dialyzed against distilled water extensively and heated at 100°C for 1 min, centrifuged, and filtered through Amicon YM10 membrane. The filtrate was measured photometrically. Spectra of (B) was taken from reference 12) with modification.

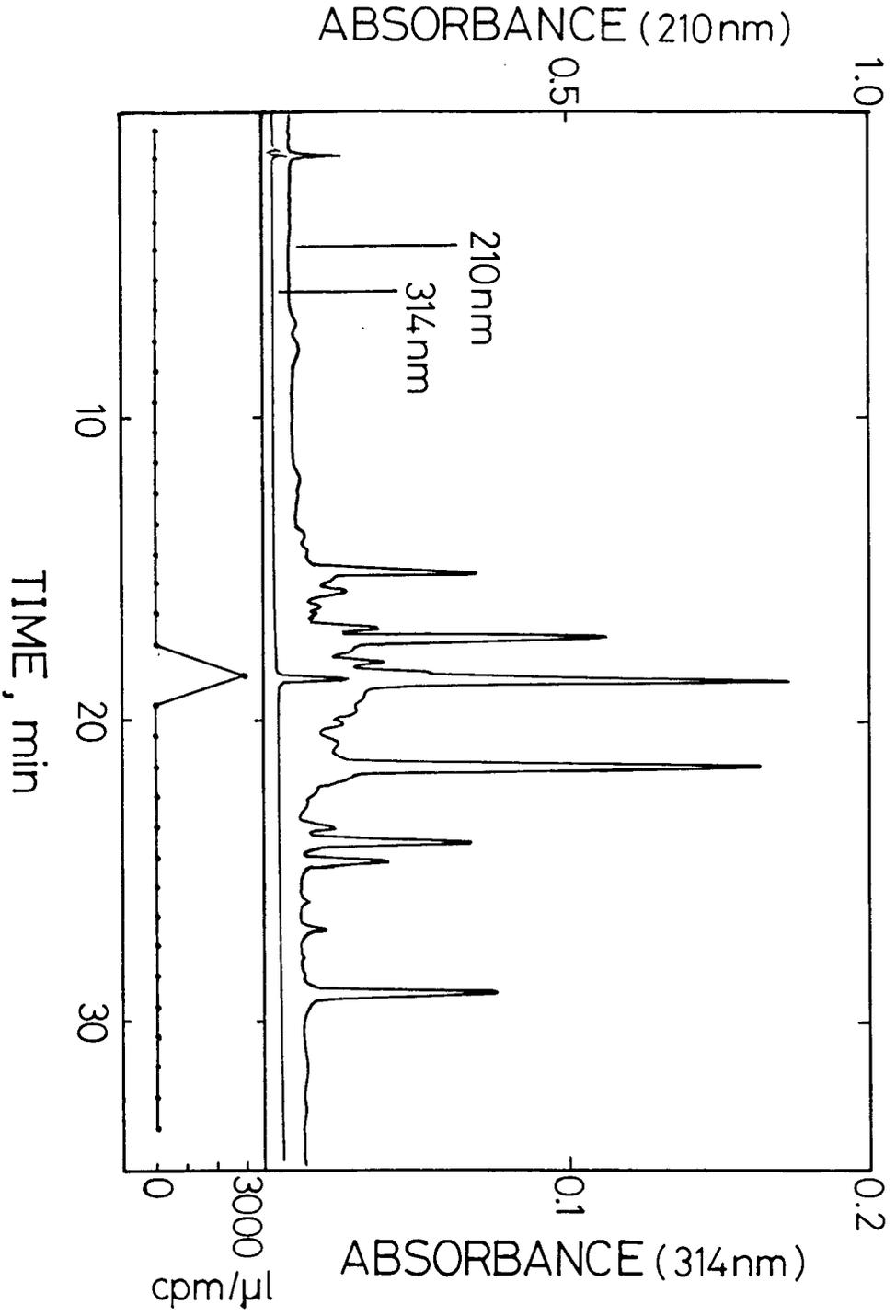


Figure 4. Separation of tryptic peptides of  $^3\text{H}$ -FMH-inactivated HDC by reverse phase HPLC. Radioactive fractions from Sephadex G-50 column chromatography was lyophilized and applied to Zorbax ODS column. Fractions of 1 ml were collected, and 5  $\mu\text{l}$  of each fraction were used for counting radioactivity.

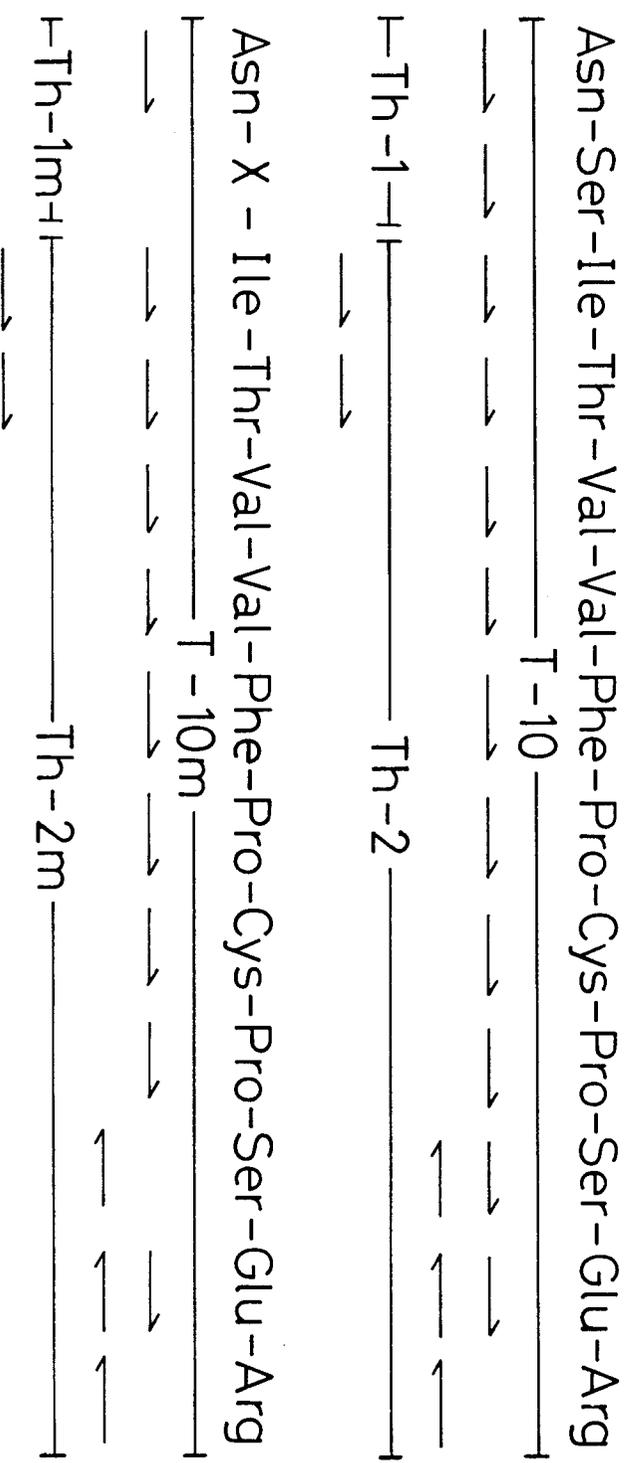


Figure 5. Sequence of peptide T-10 from native mHDC and T-10m from the modified enzyme. Arrow (→) indicate the amino acid residues identified by manual DABITC/PITC sequencing conducted on 10 nmol of each peptide. Reverse arrows (←) show the results of carboxypeptidase Y digestion of 15 nmol of each peptide. Fragments obtained by thermolysin digestion (Th-1, Th-2) were assigned the sequences shown from their amino acid compositions (Table 5) and from the indicated sequencing steps.

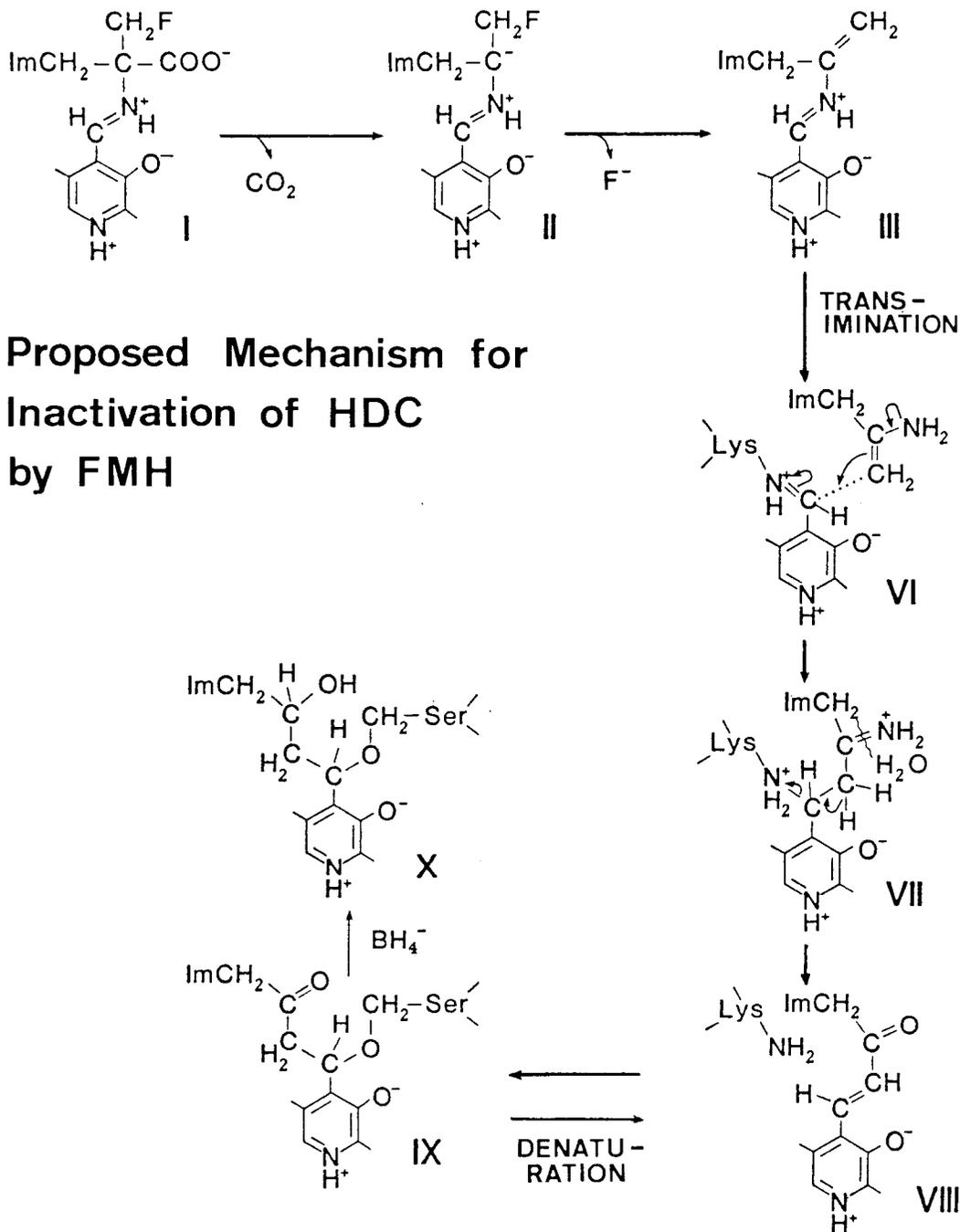


Figure 6. Proposed mechanism for inactivation of HDC by FMH. See texts for details.

Table 1. Comparison of parameters for inactivation and catalytic reaction

|      | $K_I$<br>(mM) | $K_m$  | $k_{inact}$<br>(min <sup>-1</sup> ) | $k_{cat}$ |
|------|---------------|--------|-------------------------------------|-----------|
| rHDC | 0.01          | 0.5*   | 0.25                                | 54*       |
| mHDC | 0.1**         | 1.3*** | 32.2**                              | 4300***   |

$K_I$  and  $k_{inact}$  were calculated from the data shown in Figure 1.

\*2) \*\*10) \*\*\*5) ; These values were taken from the cited literature.

Table 2. Effect of 2-mercaptoethanol on the rate constant of inactivation of HDC by FMH

| 2-Mercaptoethanol<br>( mM ) | $k'_{inact}$<br>(min <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| 0                           | 0.25                                 |
| 1                           | 0.17                                 |
| 5                           | 0.086                                |
| 10                          | 0.049                                |
| 20                          | 0.027                                |

$k'_{inact}$  was determined as a first order rate constant of inactivation at infinite concentration of FMH in the presence of 2-mercaptoethanol (2ME). The relationship of  $k'_{inact}$  and  $k_{inact}$  is as follows.

$$k'_{inact} = \frac{K_d}{K_d + [2ME]} k_{inact}$$

where  $K_d$  denotes a dissociation constant of 2ME and rHDC-FMH complex, and was calculated to be 2.4 mM from this result.

Table 3. Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -labeled FMH into HDC

|                                     |     |     |
|-------------------------------------|-----|-----|
| [imidazole 2- $^{14}\text{C}$ ]-FMH | 320 | cpm |
| [carboxyl - $^{14}\text{C}$ ]-FMH   | 20  |     |
| background*                         | 20  |     |

Three micrograms of rHDC was incubated with  $^{14}\text{C}$ -labeled FMH (each  $6 \times 10^3$  cpm/nmol) in 1 ml of assay mixture for 30 min at  $37^\circ\text{C}$ , then dialyzed against 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) extensively. Radioactivity was measured for each preparation. \* Same amount of rHDC in 1 ml buffer.

Table 4. Effect of reduction on the stability of the adduct formed between FMH and rHDC

| Treatment  | Time   | Radioactivity released |
|--|--------|------------------------|
| Dialyzed against buffer*   | 40 (h) | 2 (%)                  |
| Dialyzed against buffer plus 8 M urea  | 20     | 100                    |
| Reduced with 1 mg NaBH <sub>4</sub> , then dialyzed against buffer plus 8 M urea | 40     | 5                      |

Three micrograms of rHDC was incubated with 10 nmol of <sup>3</sup>H-FMH (1.28 X 10<sup>4</sup> cpm/nmol) in 1 ml of assay mixture for 30 min at 37°C, then dialyzed against water. Aliquots (0.3 ml) from this preparation were subjected to the indicated treatment at 25°C in a total volume of 1 ml

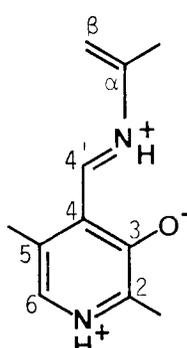
\* 20 mM potassium phosphate (pH 6.5) in all cases.

Table 5.  
Amino acid composition of T-10, T-10m, and their thermolytic fragments.

| Amino acid | Peptides from native enzyme |          |          | Peptides from modified enzyme |          |          |
|------------|-----------------------------|----------|----------|-------------------------------|----------|----------|
|            | T-10                        | Th-1     | Th-2     | T-10m                         | Th-1m    | Th-2m    |
| Cys        | 0.96 (1)                    |          | 1.07 (1) | 0.93 (1)                      |          | 0.98 (1) |
| Asx        | 1.03 (1)                    | 1.00 (1) |          | 1.12 (1)                      | 1.00 (1) |          |
| Thr        | 0.92 (1)                    |          | 0.93 (1) | 0.85 (1)                      |          | 0.92 (1) |
| Ser        | 2.03 (2)                    | 1.16 (1) | 1.05 (1) | 1.21 (1)                      | 0.25 (0) | 0.91 (1) |
| Glx        | 0.96 (1)                    |          | 1.09 (1) | 1.14 (1)                      |          | 1.07 (1) |
| Pro        | 1.88 (2)                    |          | 2.05 (2) | 1.96 (2)                      |          | 1.92 (2) |
| Val        | 1.70 (2)                    |          | 1.65 (2) | 1.75 (2)                      |          | 1.55 (2) |
| Ile        | 1.02 (1)                    |          | 1.15 (1) | 1.03 (1)                      |          | 1.10 (1) |
| Phe        | 1.12 (1)                    |          | 0.98 (1) | 1.04 (1)                      |          | 1.13 (1) |
| Arg        | 1.00 (1)                    |          | 1.00 (1) | 1.00 (1)                      |          | 1.00 (1) |

These values are ratios of amino acids obtained after hydrolysis with 5.7 N HCl for 20 h at 110 °C; values in parenthesis are the nearest integral ratios. Experimental values are not corrected for incomplete hydrolysis of valine peptides or destruction of serine and threonine during hydrolysis. Cysteine was determined as S-carboxymethylcysteine.

Table 6. Electron Density and Frontier Electron Density of PLP-Enamine Adduct

|   | Electron Density | Frontier Electron Density |
|---|------------------|---------------------------|
|  |                  |                           |
| N1  | 1.4314           | 0.1722                    |
| C2  | 0.8769           | 0.3977                    |
| C3  | 0.7571           | 0.0580                    |
| C4  | 1.1547           | 0.0665                    |
| C5  | 0.8822           | 0.2480                    |
| C6  | 1.0970           | 0.0038                    |
| O   | 1.6090           | 0.0917                    |
| C4'   | 0.7926           | 0.5117                    |
| N   | 1.4421           | 0.2224                    |
| C $\alpha$  | 1.1015           | 0.0058                    |
| C $\beta$   | 0.8554           | 0.2202                    |

Calculations were carried out on a PC-8001 microprocessor using a program for ASMO-SCF-LCAO-MO method<sup>13)</sup>. Values for atomic distances and bond angles in PLP<sup>14)</sup> were taken from the cited literature. The bond angles in the azomethine and C $\alpha$ -C $\beta$  system were 120° and the atomic distances were standard values reported. Frontier electron density is for nucleophilic reaction.