

Title	ピリドキサー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	https://hdl.handle.net/11094/35240
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka



ピリドキサー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

···									4	L					Ne).			
							和	文	抄	録	:	···· ··							
	ラ	<u></u>	<u>ہ</u>	胎	児	肝	臓	お	よ	び	M	o r	g a	n e	11	a	AM	- 1	Ę
の	Ľ	IJ	ド	+	サ		ル	IJ	ン ン	酸	依	存	性	۲	ス	Ŧ	ジ	ン	ļ
炭	酸	酵	素	(ΗD	C)	の	α		フ	ル	ォ	Ц	×	F	ル	۲	ス	•
ジ	ン	(FΜ	H)	に	よ	る	失	活	反	応	を	調	ベ	た	•	動	カ	Ę
钓	解	析	に	よ	り	、	F	MH	が	H	DC	の	活	性	部	位	で	化	5
钓	に	活	性	化	さ	れ	た	の	ち	に	H	DC	を	修	飾	す	る	ت	
が	示	さ	n	た	0	修	飾	酵	素	の	蛋	白	質	化	学	的	解	析	
よ	り	:	特	定	の	セ	IJ	ン [*]	残	基	が	F	MH	に	よ	っ	τ	修	1
を	受	け	τ	¢٢	る	こ	と	を	明	Б	ታ	٢	L	た	•	ŧ	た	失	ł
反	応	の	機	構	は	従	来	В	6	酵	素	の	自	殺	基	質	に	っ	}
τ		般	的	に	考	え	Б	れ	τ	ن ې	た	ŧ	の	と	は	異	な	IJ	•••••
部	分	的	に	ア	ス	パ	ラ	ギ	ン	酸	7	Ξ)	機	転	移	酵	素	(
セ	IJ	ン	_	0	_	硫	酸	ĸ	よ	る	失	湉	機	構	に	類	似	L	7
	1	1.5		~	F	5	-73	tz '	7	-		1.8	NP d	пС				 :	

Abstract

Inactivation of pyridoxal 5'-phosphate-dependent histidine decarboxylase from fetal rat liver and <u>Morganella</u> AM-15 by α -fluoromethylhistidine was studied. Kinetic analysis of the inactivation revealed a chemical processing of α -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 β -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), α-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 は L - ヒ ス チ ジ ン → ヒ ス タ ミ ン + CO2 の 記) 媒する酵素である。 HDCはヒスタミ 反応を触 素であるため、生体 ン生成を行なう唯一の酵 る上で重要であり、 の動態を探 内ヒスタミン 辺らによって、本酵素を指標 最近では 渡 また とすることにより脳内ヒスタミン神経線維の 1) 2)など現在注目を集 めつ 同定 がなされ る 素である。ヒスタミンを涸渇さ せる つある酵 的で種々のHDC阻害剤が開発されて き たが Ħ 3) 、 1978年 Kollonitsch ら 4) によって合 · 成された α – フルオロメチルヒスチジン(FM H)が非常に強力な阻害作用をもつことがわか in vivo でのヒスタミンの研究に り、現在 広く用いられている。 害機構については従来 FMHが HDC FMHの 阻 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 ー PLPシ ッ フ 塩 基 に 対

4

No.

29...20

									۸						No.		5		
L	Н	DC	の	7	11	2	酸	残	基	が	,	核	付	加	を	行	な	י גי ג	
そ	の	結	果	H	DC	が	親	和	標	識	を	受	け	• •	失	狧	₫	る	کے ب
考	え	Б	れ	τ	<u>ر</u> ې	た	4)	°	と	Ľ	ろ	が	· · ·	C	の	親	和	標
識	が	Ŀ	記	の	機	構	ታን	5	は	予	想	で	き	な	() ()	不	安	定	性
を	示	す	٢	と	が	ラ	<u></u> ٣	۰. ۲	胎	児	Н	DC	(以	下	r H	DC	と	略
記)	に	う	5	τ	見	出	さ	n	2)	x .	阻	害	機	構	の	再	検
討	が	必	要	と	な	<u>ې</u>	τ	き	て	い	る	•	そ	ح .	で	r H	DC	• •	及
び	量	的	に	+	分	量	得	る	٢	と	の	で	き	る	<u>M o</u>	гg	a n	e 1	<u>l a</u>
属	細	茵	5)	の	Н	DC	(以	下	m H	DC	ح	略	記)	に	う	 رب
τ	FΜ	H	に	よ	る	失	活	反	応	を	詳	L	<	検	討	す	る	C	٢
に	L	た	0					·•·											
				:		··· · · ·													
実	験	材	料	及	び	方	法												
<u>H D</u>	С	<u>の</u>	精	製															
	ΗD	С	は	ラ	ッ	<u></u> ۲	胎	児	肝	4	00	g	よ	IJ	Ħ	<u>п</u>	Б	の	方
法	2)	に	よ	IJ	`	ま	た	<u>Mo</u>	rg	a n	<u>e</u> 1	la	A	M -	15		菌	体
2	0 0) g	よ	IJ	棚]	Ę	>	5)	Ø	כ מ	方言	法	に	よ	IJ	精	製	L
た	o	最	終	比	活	性	<u>```</u>	収	量	`	収	率	は	そ	n	ぞ	n	1	ΙU
/ -	~		0	0	· ···· ···		ባ %	 	 				 7 11	· · · · · · ·			 	m 0	· · · · ·

									A						No.		5		
10	%	で	あ	っ	た	•				····· : 									
<u>H D</u>	C	の	<u>活</u>	性	測	定	法								:				
	ΗD	С	の	活	性	測	定	は	0	. 1	M	IJ	×	酸	カ	IJ	ウ	ム	緩
衝	液	(рН	6	. 5	×	安	定	化	剤	と	L	τ	0.	1 m	M	ΕD	ΤA	`
ο.	02	m M	D	ТТ	を	含	む)	ф	3	7	°C	に	お	い	τ	行	な	っ
た	0	r H	DC	で	は	0	. 2	5 m	M	L -	Ł	ス	Ŧ	ジ	ン	を	基	質	と
し		生	成	し	た	۲	ス	タ	ĩ	ン	を	蛍	光	法	2)	に	よ	IJ	
ま	た	m H	DC	で	は	2	0 m	M	の	[1	-	мС] -	L -	Ηi	S	を	基	質
と	L	. x	生	成	L	た	чС	0	2	を	市	山	ら	の	方	法	5)	に	よ
り	そ	n	ぞ	れ	測	定	し	た	o	:									
7	ポ	酵	素	<u>の</u>	調	_製													
	7	ポ	ŀ	H D (Cは	ホ	Ц	ŀ	IDC	、を	0 .1	M	Γ-	- シ	ス	テ	1	ン	に
対	し	て	透	析	し		ΡI	, P	を	Ŧ	7	ゾ	IJ	ジ	· >	誘	導	体	ح
ι	て	除	<	ح	ح	に	よ	IJ	調	製	L	た	: o						
<u>H</u>	DC	の		<u>F M</u>	<u>H に</u>	5	3	<u>失</u>	适	(親	和	標	識)				
	失	活	(新	」和	標	識)	反	応	は	狧	性	測	定	用	緩	衝	Ħ
中	にに	τ	•	ΗD	Cを	F	MH	ح	共	に	温	置	đ	る	ح	ح	に	よ	ţ
行	: っ	た	- 0		:	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		:			:		:						
	۴C	ע :	しは	; ³ F	i 7	5 標	識	しし	、た	· · · · · · · · · · · · ·	FM	H を	乕	V`	、 て	生失	活	反	<u> </u>
な	:行	すな	、た	、 -ts	t た	z æ	ح ح	<u>`````</u>	2	0 m	Mの	IJ	>		钅 大	י ז	ゥ	لم	, ř

 $20 \times 20^{\circ}$

									۸						No.		7		
鲄	液	(рН	6	. 5)	に	透	析	L	τ	未	反	応	の	F	MH	を	除
き	, x	Н	DC	に	結	合	し	た	放	射	活	性	を	測	定	L	τ	F	MH
に	よ	る	親	和	標	識	の	状	況	を	観	察	L	た	•				
<u>³Н</u>	<u>– F</u>	MH	で_	親	和	標	識	L	<u>t</u>	m H	DC	Ø	蛋	白	質	化	<u>学</u>	的	解
赾			:	:	· ·	······································	······································		······			····					•		
4.	3 m	g	の	m H	DC	(1 0	0 n	m	o l)	を	F	記	の	方	法	で	1 (
μ	mo	1 ¹	の	³ H	- F	MH	ځ	共	に	25	5 °C	1	5 m	nin	温	置	L	τ	完
全	に	失	活	さ	せ	た	の	ち	<u>`</u>	3 n	ng	の	Na	вН	4	を	加	え	`
25	°C	:	3 () m i	n	放	置	L	た	•				:					
	凍	結	乾	燥	標	品	を	Сг	еs	t	if	el	ld	の	方	法	6	;)	に
従	י יי	て	還	元	カ	N	ボ	÷	シ	۶	Ŧ	ル	化	し	た	の	ち	``````````````````````````````````````	
]	n Q	の	(Ο.	1 M	NF	4	НC	0	3		1 1	m M	Са	a C I	2	中	に	τ
1	/ 1	0 0	(重	量	比)	量	の	T	PCI	Κ —	۴	IJ	プ	シ	ン	を	加
え	` ح	3	7 °C		3 h	消	化	し	た	•			:						
	Ւ	IJ	プ	シ	ン	消	化	物	を	セ	フ	7	デ	<u>پ</u>	ク	ス	G	- 5	0力
ラ	Ь	. (2	0 ×	8	00	m m)に	τ	0	. 0	5 M	N	H 4	H	С О	3	を	肝
6	て	: 分	▶ 画	iL	、た	•	放	射	活	性	Ξ, 、	画	i 分	・を	集	ෂ්	7	磼	〔糸
乾	燥	t L	, た	あ	。 と	:	Z	or	ba	X	ΟD	S た	, ラ	· L	. (4.	6 ×	2	50
m	m)	k	<u> </u>	7	・セ	:	_	· ኑ	IJ	J	/ -	ト	J)	フ	・ル	オ	- 🏼	Ē	
Ŧ	÷ 7	11 厘	長 閉] L	· · ·	標	調	÷ ~	プ	' 1	- F	゛を	:得	身 た	<u> </u>				

(20 × 20)

No.

8

	\sim	↗°	F	ド	を	更	に	断	片	化	す	る	た	හ	に		1 0	n m	o l
の	~	",	F	ド	を		0.	2	m l	の	0	. 1	M	ΝH	4	НC	0	3	/
L	m M		Са	C 1	2	中	に	τ	1 /	1 0	0 0	(£	ル	比)	量	の	サ
	£	IJ	` <i>`</i> >	$\mathbf{\mathbf{\mathbf{\mathbf{\mathbf{\mathbf{\mathbf{\mathbf{\mathbf{\mathbf{\mathbf{\mathbf{\mathbf{\mathbf{\mathbf{\mathbf{\mathbf{\mathbf{$	ح	ح	ŧ	に	4	0	°C	2	h	温	置	し	た	0	断
片	は	Ζo	rb	a X	0	DS	力		L	を	用	<u>ر</u> ې	τ	同	様	に	分	離	L
た	•						•	······											
	~	プ	Ŧ	ド	の	7		>	酸	分	析	は	5	~	10	n	m o	1	の
~	プ	F	ド	を	5.	7	N	ΗC	l	中	真	空	下	1	10	°C		20	h
加	水	分	解	し	た	弒	料	に	っ	い	τ	行	っ	た	•	~	プ	Ŧ	ド
の		次	構	造	は	D	AB	ΙT	C /	ΡI	тс	<u> </u>	重	力	<u> </u>	プ	IJ	ン	グ
法	7)	及	び	カ	ル	ボ	+	シ	~	7°	チ	ダ		ゼ	Y	法	8)
を	用	い	τ	決	定	Ľ	た	o											
		;			:		:										;		:
	: : :			-		:		· · ·		:						:	:	-	
					•			•		:	1						:	;	
	:	;													· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·				
			;			· ·	:												
				· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			·····												
				: 															

۵

 $20 \times 20^{\circ}$

									4			=			No.		9	;	
結	果	;							· · · · · · · · ·			•							,
	1	•	гH	DC	の	F	ΜH	に	よ	る	失	活	反	応					
	гН	DC	は	F	ΜH	の	存	在	下	`	擬		次	反	応	的	に	失	活
し	た	(F	ig	ur	е	1 a)	0	失	活	反	応	の	見	か	け	の	速	度
定	数	k	аp	P	と	そ	の	時	の	F	MH	の	濃	度	の	両	逆	数	プ
D	ッ	ኑ	を	と	る	٤	直	線	F	に	並	び	(F	i g	ur	е	1 b)	`
い	わ	ゆ	る	"	自	殺	基	質	型	,,	の	失	活	反	応	様	式	を	示
し	た	0	こ	れ	よ	Ŋ	F	MH	ح	гH	DC	の	解	離	定	数		KI	=
0	. 0	1	m M	<u>``</u>	失	活	の	速	度	定	数	k	in	ac	t	=	0	. 2	5
m	in	-	1	が	算	出	さ	れ	た	(T	a b	1 e	1)	•			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
	2	•	基	質	L -	Ł	ス	Ŧ	ジ	ン	の	失	活	に	対	す	る	保	護
作	用			· ·			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	·····										
	FΜ	H	に	よ	る	гН	DC	の	失	活	の	速	度	は	`	L -	Ł	ス	F
ジ		を	共	存	ं र्न	- 3	5	ح .	: k	5	+ ۲	ר ר	て	暖	慢	ک	な	ີ	た
(F	ìg	ur	е	2)	o	1.	の	結	果	ح	合	わ	せ	`	F	MH	は	r H	DC
を	失	活	さ	せ	る	に	先	立	າ	て	гH	DC	の	活	性	部	位	に	च
逆	的	に	結	合	す	る	ε	と	が	示	さ	れ	た	0					
	3	•	2 -	×	ル	カ	プ	ኑ	ㅗ	タ	>	<u> </u>	ル	の	失	活	に	対	す
る	保	護	作	用															
	2 -	· ,	ル	力	プ	۴	I	タ	1	 	ル	は	Н	DC	の	非	拮	抗	的
	20×2	0`)								-									

そう。 うし た 王 子	割ン脱けのa cるッ反	5 と 炭 る F t 2 応) の 酸 脱 M 「 の 小 塩	9) 間反炭Hの 基	で に 応 酸 存 も く	あ 形 を 速 て 2 - な	り 成 妨 度 、 下 メ り	、 さ げ が ル	補 れ る 減 力	酵 る た 少 え ア	素 シ よ し ト	P ツ る エ	LP フ 基 。 タ	と塩質同うノ	基基包禄电	質に和に度い	ヒ付濃飽定が	ス加度和数存
シン うし す 子	ン 脱 け の ac る ッ 反	と 炭 る F t 之 フ 応	の 酸 脱 小 塩	間 反 炭 Hの 基	に 応 者 く	形 を 速 2 - な	成	さ げ が ル	れ る 滅 カ	る た 少 デ ア	シ め す 日 反	ッ る エ	フ 基 。 タ	塩質同りう	基 飽 様 上	に和に度し	付濃飽定が	加度和数存
<u>こ</u> 月 うし れて 子	脱 け の a c る ッ 反	炭 る F t 之 フ 応	酸脱 脱 の 小 塩	反炭の値さ基	応 酸 存 も く	を 速 2- な	妨 度 下 メ	げ が ル	る 減 カ	た 少 ミ 沼	め す 〒 反 ト	б Г. Г. Т	基 。 。 タ	質 同 ッう	飽様。	和に度し	濃飽定が	度和数存
うし す 子	け の a c る ッ 反	る F t フ 応	脱 M I の 小 塩	炭 値 さ 基	酸 存 も く	速 : 在 2 - な	度 : 下 メ り	が :	減 > チ カ	少 ミ 汨 プ	す 盲 反 ト	る こ 尻 エ	。 5 0 タ	同 の う ノ	様 速 1	に度し	飽 定 が	和数存
ま n e 子	の ac る 、 、	F t フ 応	MI の 小 塩	H の 値 支 基	存 も く	- 在 2 - な	: 下 メ り	τ σ. Ν)	ミ 汨 プ	音 反 ト	. 尻 エ	5, 0 タ	の う ノ	速	度	定 が	数 存
n る ナ 舌	a c る ッ 反	t と フ 応	の 小 塩	値 さ 基	т с	2 - な	メ 1]	ル	力	プ	۲	I	タ	>		11z	が	存
ナ ど 舌	る ッ 反	と フ 応	小塩	さ 基	<u>ک</u>	な	<i>L</i>]									10	····	
と	ッ 反	フ 応	塩	基				(1	a b	le	2)	× .	F	M H	が	Р	LP
舌 [:]	反	応	·····		を	作	っ	て	脱	炭	酸	を	受	け	る	C	と	が
			に	お	い	τ	ŧ	重	要	で	あ	る	C	と	が	示	唆	さ
2	•																	
4	•	F	MH	の	各	部	分	の	гН	DC	~	の	取	Ŋ	込	み		
異	な	る	部	位	を	ъС	で	標	識	L	た	F	ΜH	で	rŀ	IDC	を	失
さ	せ	: : 、	透	析	を	行	な	ົ	た	後	に	`	H	DC	に	取	ŋ	込
ħ	た	放	射	狧	性	を	測	定	し	た	(T	a b	le	3)	•	1	11
ゾ		ル	2	位	炭	素	を	標	識	レ	た	場	合	に	は	化	学	量
的	に	r H	DO	2~	放	射	活	性	が	取	IJ	込	ま	n	た	が	N	力
ボ	+	シ	ル	炭	素	を	標	識	し	た	場	合	は	取	IJ	込	み	か
ら	n	な	ታን	っ	た	0	ح	の	L	と	は	`	F١	(H	は	r l	1 D (ን ሥ
न	逆	的	に	結	合	す	る	が	``````````````````````````````````````	そ	の	時	に	は	力	ル	ボ	+
	其	を	失	っ	7	¢١	る	ح	と	を	示	L	て	な	る	o		•
	s こ ブ 内 ボ ら 可 ル	s せた ー に キ れ 逆 基	s せ、 ι た 放 ノ ー ル ド ト ら れ 的 を ル	s せ、透 こた放射 ブール 2 内に r H D (ボキシル られなか 可逆的 に ル	s せ、透 析 こた 放 射 活 ノール 2 位 内 に r H D C へ ボキシル 炭 られ な かっ 可 逆 的 に 結 ル 基 を 失っ	s せ、透 析 を ι た 放 射 活 性 ノ ー ル 2 位 炭 内 に r H D C へ 放 ボ キ シ ル 炭 素 ら れ な か っ た 可 逆 的 に 結 合 ル 基 を 失 っ て	s せ、透 析 を 行 ι た 放 射 活 性 を / ー ル 2 位 炭 素 内 に r H D C へ 放 射 ボ キ シ ル 炭 素 を ら れ な か っ た 。 可 逆 的 に 結 合 す ル 基 を 失 っ て い	s せ、透 析 を イ な ι た 放 射 活 性 を 測 ノ ー ル 2 位 炭 素 を 内 に r H D C へ 放 射 活 ボ キ シ ル 炭 素 を 標 ら れ な か っ た。 こ 可 逆 的 に 結 合 す る ル 基 を 失 っ て い る	s せ、透 析 を イ なっ こ た 放 射 活 性 を 測 定 バ ー ル 2 位 炭 素 を 標 内 に r H D C へ 放 射 活 性 ボ キ シ ル 炭 素 を 標 識 ら れ な か っ た 。 こ の 可 逆 的 に 結 合 す る が ル 基 を 失 っ て い る こ	s せ、透析を打なった ι た 放射 活 性 を 測 定 し バール 2 位 炭 素 を 標 識 内に r H D C へ 放射 活 性 が ボキシル炭 素 を 標 識 し られ な かった。 このこ 可 逆 的 に 結 合 す る が、 ル 基 を 失っている こと	s せ、透析を行なった役 ι た 放射 活 性を 測定した バール 2 位 炭素を標識し 内に r H D C へ 放射 活 性 が 取 ボキシル炭素を標識した られ な かった。 このこと 可 逆 的 に 結 合 する が、 そ ル 基 を失っていることを	s せ、透析を行なった夜に ι た 放射 活 性 を 測 定 し た(T ノール 2 位 炭 素 を 標 識 し た 内に r H D C へ 放射 活 性 が 取 り ボ キ シ ル 炭 素 を 標 識 し た 場 られ な かっ た。 こ の こ と は 可 逆 的 に 結 合 す る が、 その ル 基 を 失っ て い る こ と を 示	s せ、透析を行なった後に、 ι た 放射 活 性 を 測 定 し た(T a b ノール 2 位 炭 素 を 標 識 し た 場 内に r H D C へ 放射 活 性 が 取 り 込 ボキシル 炭 素 を 標 識 し た 場 合 られ な かった。 このことは、 可 逆 的 に 結 合 す る が、 その 時 ル 基 を 失っている ことを示し	s せ、透析を行なった後に、 m こた 放射 活 性 を 測 定 した (Table ノール 2 位 炭 素 を 標 識 した 場 合 的に r H D C へ 放射 活 性 が 取 り 込 ま ボ キ シ ル 炭 素 を 標 識 した 場 合 は られ な かった。 このことは、 FN 可 逆 的 に 結 合 す る が、 その 時 に ル 基 を 失ってい る ことを 示 して	s せ、透析を行なった夜に、 hbc こた放射活性を測定した(Table S ノール 2 位炭素を標識した場合に 内に r H D C へ放射活性が取り込まれ ボキシル炭素を標識した場合は取 られなかった。このことは、 F M H 可逆的に結合するが、その時には ル基を失っていることを示してい	s せ、透析を行なった役に、 hbok った放射活性を測定した(Table 3) ノール2位炭素を標識した場合には 内にrHDCへ放射活性が取り込まれた ボキシル炭素を標識した場合は取り られなかった。このことは、FMH は 可逆的に結合するが、その時にはカ ル基を失っていることを示している	s せ、透析を行なった後に、 hDoに kk こた放射活性を測定した(Table 3)。 ノール2位炭素を標識した場合には化 的に r H D C へ放射活性が取り込まれたが ボキシル炭素を標識した場合は取り込 られなかった。このことは、 F M H は r H 可逆的に結合するが、その時にはカル ル基を失っていることを示している。	s せ、透析を行なった夜に、「HDOに取り こた放射活性を測定した(Table 3)。イ ブール2位炭素を標識した場合には化学 内に r H D C へ放射活性が取り込まれたが、 ボキシル炭素を標識した場合は取り込み られなかった。このことは、FMH は r H D C 可逆的に結合するが、その時にはカルボ ル基を失っていることを示している。

<u>以上の結果を総合すると、 FMHは rHDCの</u>活 性 部 位 の · PLPと 結 合 し て 脱 炭 酸 を 受 け て 活 性 化され、「HDC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 を"標識"と呼ぶことにする。 質 の こ と 標識の安定性 5. [imidazole 4 - 3H]-FMH を用いて失活させ た r H D C 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 r H D C を 尿 素 で 変 性 さ せ る と r H D C から遊離した。ただし、尿素で変性させる前 に 失 活 r H D C を あ ら か じ め N a B H 4 で 還 元 し て お と 、 尿 素 変 性 後 も 標 識 は r H D C 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 r H D C で は 量 的 に 限 界 が あ る 。 m H D C は 失 活に 関 し て r H D C 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

No. 11

 $\pm 20 \times 20$:

										A					۱.	ю.	/:	2	
හ	· ` `	m H	DC	を	用	6,	τ	以	下	の	検	討	を	行	າ	た	•	·····	
	6	•	遊	離	L	た	標	識	物	質	の	性	状				···· · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
	³Н	- F	MH	で	失	活	l	た	m	ΗD	С	0.	. 4 n	ng	か	ß	熱	変	1
に	よ	, つ	τ	遊	離	L	τ	来	る	放	射	活	性	物	質	の	吸	収	7
~	ク	<u>ጉ</u>	ル	を	F	igu	1 T 6	e 3	A	に	示	し	た	•	C	の	物	質	0
ス	~	ク	ኑ	ル	は	F	, L I	, ,	ΡM	Р	の	そ	れ	と	は	異	な	っ	7
お	IJ	`	現	在	ま	で	に	知	5	れ	て	い	る	ビ	タ	E	ン	В	6
誘	導	体	の	中	で	は	Sc	chn	ac	k e	Γz	1	1)	に	よ	っ	て	合	向
z	れ	た	Р	LΡ	と	Ľ	ル	Ľ	~	酸	の	縮	合	物	······	(F	ìg	ç u r	e
3 B)	に	よ	<	類	似	L	て	<i>د</i> ب	た	•	放	射	活	性	ታን	Б	計	貨
L.	た	分	子	吸	Y	七日	系娄	女 に	t 7	, 5	00	(c m	-	1	M	-	1	ح
S	c h	na	c k	e r	z	複	合	体	の	そ	れ	と	よ	い	<u> </u>	致	を	示	L
<u>بر</u>	1	2)	•									••••••	:						
	7	•	標	識	ペ	7°	Ŧ	ド	Ø	単	離			:					
	³Н	- F	МН	で	失	狧	さ	せ	た	m H	DC	を	Na	ΒH	4	で	還	元	L
••••••	力	ル	ボ	+	シ	ル	×	Ŧ	ル	化	し	た	の	ち	に	<u>۲</u>	IJ	プ	シ
	で	消	化	し	<u>`````````````````````````````````````</u>	消	化	物	を	セ	フ	7	デ	"	ク	ス	G -	50	で
\	画	L	τ	`	³Н	に	由	来	す	る	放	射	活	性	を	有	す	る	画
J :	• • • • • • • • •										••••••					• • • • • • • • • • • • • •			
ታ ት	を	集	හ	τ	凍	結	乾	燥	L	た	•	乾	燥	標	品	を	1	m l	の

			·						4	. 					No.	•	13		
0	2	m 1	す	<i>っ</i>	を	同	溶	掖	で	平	衡	化	L	た	Ζo	r b	ax	0	DS
力	ラ	4	(4	. 6	×	25	0	m m)	に	添	加	L	<u>.</u> `	7	セ	ŀ	<u> </u>	١
IJ	ル	を	4 0	分	間	に	50	%	濃	度	ま	で	直	線	的	に	Ŀ.	昇	さ
せ	る	Ξ	と	に	よ	IJ	展	閞	を	行	っ	た	(F	i g	ur	е	4)	٥	そ
の	結	果	た	だ		っ	の	~	プ	F	ド	の	۲°	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ク	に	• 	致	L
τ	放	射	活	性	と	31	4	nm	の	吸	収	の	Ľ		ク	が	見	ら	n
た	۰	٢	の	べ	7°	F	ド	は	再	度	第		の	溶	媒	系	(0.	1 %
ኑ	IJ	7	ル	ォ		酢	酸	中	2 -	プ		パ	/		ル	の	濃	度	勾
配)	に	τ	精	製	を	行	<i>د</i> ې	`	単	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	の	標	品	と	L	た	o	
	ま	た	³Н	- F	ΜH	に	よ	る	失	狧	や	Na	ΒH	4	還	元	を	Æ	ど
۲	L	て	ن ې	な	い	m H	DC	ን	ß	ŧ	同	様	の	操	作	で	標	識	ペ
プ	F	ド	に	対	応	す	る	非	標	識	~	プ	Ŧ	ド	を	得	た	•	
8	. •	~	プ	F	ド	の	構	造	解	析	:						·····		
	±	記	の	両	ペ	プ	Ŧ	ド	の	7	Ę	>	酸	組	成	を	Та	b l	е
5	に	示	す	o	両	者	の	比	較	ታን	Б	× .	非	標	識	~	プ	Ŧ	ド
に	お	<i>ن</i> ې	τ	2	残	基	存	在	す	る	セ	IJ	ン	の	う	ち	1	残	基
が	7	MH	と	の	反	応	で	失	わ	n	て	い	る	٢	と	が	明	Б	ወን
で	あ	る	•	こ	れ	Ъ	の	~	プ	F	ド	を	サ	<u> </u>	Ŧ	IJ	シ	ン ン	で
断	片	化	す	る	ح	両	者	ح	ŧ	大	小	2	個	の	断	片	に	分	ታን
れ	た	0	そ	れ	ぞ	れ	の	ア	ĩ	2	酸	組	成	は	Та	b l	е	5	に

 $\pm 20 imes 20$;

										·					No	•	1	;	
示	चे	通		で	あ	る	•	T h	- 2	は	標	識	······	非	標	識	~	フ	£
<u>ال</u>	両	者	ĸ	っ	<u>ر</u> ب		同	Ľ	で	あ	Ŋ	.		方	T h	- 1	は	非	標
識	~		Ŧ	F	曲	来	Ø	ŧ	の	は	7	ス	パ	₹	ギ	ン	酸	と	セ
IJ	ン ン	で	あ	ر	た	が	·	標	識	^	\$ 7	۴ <u>-</u>	£	۲ ۱	Ħ	来	の	ŧ	の
は		7	ス	パ	∍	ギ	ン	酸	の	み	で	あ	り		2	n	に	L	IJ
F	ΜH	と	反	応	L	た	セ	IJ	>	は	Th	- 1	F	に	あ	る	こ	と	が
わ	か	る	0							:	;					:			:
	Fi	gu	ге	5	に	標	識	~	プ	Ŧ	۴	の	7	Ę	1	酸	配	列	を
示	す	•	T	h -	1、	T	h -	2 カ	5 🕅	10	० क्र	Π	< ;	帰	属	さ	n	る	٤
と	```	Th	. – 1	が	放	射	活	性	を	ŧ	っ	٢	と	x	更	に	デ		タ
は	示	L	τ	い	な	¢,	が	I	ド	マ	ン	分	解	の	第	2	段	で	放
射	活	性	が	~	プ	F	۴	か	Б	遊	離	す	る	ح	と	ታን	B		N
末	端	よ	IJ	ŧ	2	番	目	の	セ	ŋ	ン	が	F	F M F	Iと	反	応	L	た
٢	ح	が	明	ß	ታን	ح	な	っ	た	0									
			:	· ·······															:
					:														
					· ·	:					•								
,	·		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	÷	······	:							· · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			:		
	:		 : 		:												· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	·····	

									A			=			No	•	13		
考	察				· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·					• • • • •									
	以	Ŀ	Ø	結	果	L.	り	F	MH	は	基	質	類	縁	体	ح	L	τ	Н
DC	の	活	性	部	位	に	वि	逆	的	に	結	合	(お	そ	Б	<	Р	LΡ
と	シ	"	7	塩	基	を	形	成)	レ	た	あ	ح	<u>`</u>	ΗD	С	の	触	媒
作	用	ĸ	よ	<u>ې</u>	τ	脱	炭	酸	を	受	け	τ	活	性	化	さ	n	<u>.</u>	ΗD
3	の	セ	IJ	ン	残	基	(mН	DC	の	場	合)	に	非	च]	逆	的	に
結	合	L	τ	Н	DC	を	失	活	さ	せ	る	۲	と	が	明	<u></u> Б	ረታ	ራ	な
າ	た	0		•••••••		•													
	失	活	反	応	の	速	度	論	的	パ	7	×		タ			KI	•	
k	i n	аc	t	を	通	常	の	脱	炭	酸	反	応	の	パ	7	×	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	タ	·····
K	m,	k	са	t	৮	比	較	L	て	み	る	ح	(Ta	b l	е	1)	r	ΗD
5	•	m F	ID (0 い	ず	ħ	とれ	- Ŧ	3 V) -	ζ :	6 F	ζι (1 I	Кm	よ	り	小	さ
<	•	F	MH	が	۲	ス	F	ジ	ン	よ	IJ	ŧ	強	<	Н	DC	۲	(वा
逆	的	に)	結	合	す	る	٦	ک	が	う	か	が	ゎ	n	る	0		方
k	i n	аc	t	の	値	は	٢	ΗD	С	<u>،</u>	m H	DC	ح ا	ŧ	に	k	сa	t	Ø
値	の	1 /	1 0	0	程	度	で	あ	る	o	k	in	ac	t	は		1	न 	MH
の	脱	炭	酸		2		活	性	化	さ	れ	た	F	MH	と	Н	DC	の	間
の	共	有	結	合	の	形	成		の	う	ち	<u>،</u>	律	速	段	階	と	な	る
方	の	速	度	定	数	に		致	す	る	は	ず	で	あ	る	が	````	1)	гH
) C	は	m ł	I D I	0に	比	; ~	× -ر	<u> </u>	C C	a t	; (の1	直 :	が、	小	さ	<u>ر</u> ې	が	x

									*						No.		1		
k	in	аc	t	の	値	ŧ	同	Ľ	程	度	に	小	さ	い	ε	٤	•	即	ち
失	活	速	度	が	Н	DC	の	脱	炭	酸	反	応	を	触	媒	す	る	能	カ
に	依	存	L	τ	い	る	ح	ځ	•	2)		2 -	X	ル	カ	プ	<u>۲</u>	I	タ
1	. —	ル	に	よ	っ	τ	F	MH	の	脱	炭	酸	を	妨	げ	る	と	k	i n
аc	t	の	値	が	減	少	L	た	٢	と	(T	a b	l e	2)	に	よ	IJ	k
i n	аc	t	は	H	DC	に	よ	る	F	MH	の	脱	炭	酸	の	速	度	を	反
映	L	τ	¢۷	る	と	考	え	Б	れ	る	•	従	っ	τ	F	MH	は	L -	Ł
ス	F	ジ	ン ン	に	比	ベ	τ	約	1 /	1 0	0	の	速	さ	で	脱	炭	酸	を
受	け	τ	<u>ر</u> ې	る	と	<i>د</i> ب	う	۲	ح	が	で	き	る	0					
	失	活	L	た	Н	DC	に	お	け	る	F	M H	ĸ	由	来	す	る	標	識
ک	H	DC	と	の	結	合	は	比	較	的	不	安	定	で	x	Na	ΒH	4	を
用	い	τ	還	元	L	な	÷ V	、随	ł ł)、	4	₹ ¥	舌	擇	素	の	変	性	ĸ
よ	っ	τ	結	合	が	解	離	L	た	(Та	b 1	е	4)	0	こ	٢	で	遊
離	し	た	物	質	を	調	べ	た	と	۲	ろ	`	٢	の	物	質	は	F	MH
に	由	来	ŧ	る	イ	Ę	ダ	ゾ		ル	環	と	補	酵	素	۲	IJ	ド	+
サ		ル	IJ	ン	酸	に	由	来	f	る	۲	ド		+	シ	Ľ	IJ	ジ	$\boldsymbol{\mathcal{Y}}$
環	を	有	し	て	お	IJ	<u>`</u>	そ	の	吸	収	ス	~	ク	ኑ	ル	の	性	質
ኳን	Б	<u> </u>	Sc	hn	.ac	k e	erz	:複	合	体	(Fi	gι	іте	3	B)	と	同	r
共	役		重	結	合	の	系	を	持	っ	ŧ	の	ځ	推	定	さ	れ	た	0
	以	上	の	点	を	考	慮	に	入	れ	τ	```	得	ら	れ	た	実	験	結

 $20 \times 20^{+}$

4

															No).	17	7	-
果	を	₫	べ	τ	矛	盾	な	: <	説	明	17	a	5	3 :	失	活	機	構	を
Fi	gu	re	6	に	示	L	た	•	ま	ず	`	न	MH	は	Ł	ス	Ŧ	ジ	ン
	同	様	に	H	DC	の	補	酵	素	Р	LΡ	と	シ	ッ	フ	塩	基	を	形
成	ι	τ	脱	炭	酸	を	受	け	7	ッ	素	亻	オ	ン	を	脱	产	L	τ
I	Ξ	ナ	ン	- P	LΡ	シ	"	フ	塩	基	Ш	を	生	Ľ	る	0	Ш	は	当
初	Р	LΡ	を	結	合	L	τ	い	た	IJ	シ	ン	残	基	ځ	の	間	に	イ
ĩ	>	基	転	移	反	応	を	起	٢	し	て	遊	離	の	т	ナ	E.	ン	VI
ځ	な	る	•	VI	の	<u>بر</u>	F	レ	ン	炭	素	は	遊	離	の	7	E.	>	基
か	Б	の	電	子	を	受	け	<i>د</i> ب	n	τ	求	核	性	を	持	っ	た	ෂා	Р
LΡ	の	4	' _	炭	素	を	攻	擊	L	`	そ	の	結	果	Sα	c h n	ac	k e	ΓZ
複	合	体	に	類	似	の	物	質	VIII	が	生	Ľ	る	•	VIII	Ø	4 '	- C	に
対	L	τ	Н	DC	の	セ	IJ	ン	残	基	の	水	酸	基	が	求	核	攻	撃
を	行	い	`	そ	の	結	果	VIII	ځ	H	DC	と	の	間	に	共	有	結	合
が	生	じ	る	(X)	o	L	か	L	失	狧	H	DC	を	変	性	さ	せ
る	と	`	IX	の	構	造	を	安	定	化	L	て	い	た	立	体	的	な	要
因	が	失	わ	れ	τ	×	再	び	逆	反	応	が	起	こ	IJ	• •	VIII	が	Н
DC	ታን	Б	遊	離	す	る	0	IX	の	カ	ル	ボ	=	ル	基	が	4	' -	炭
素	と	の	間	の	炭	素	F	の	プ		ኑ :	ン	を	湉	性	化	す	る	٢
と	に	よ	り	こ	の	逆	反	応	を	促	進	L	τ	ن ۷	る	が	• •	Na	ΒH
	で	処	理	す	る	と	IX	が	Х	に	還	元	さ	れ	τ	•	IX	\rightarrow	VII

(20.420)

18 No.

<i></i> の	逆	反	応	が	起	ح	Б	な	<u>,</u>	な	IJ		標	識	ځ	酵	素	の	結
合	が	安	定	化	す	る	ک	説	明	さ	ħ	る	0						
	VIII	\rightarrow	X	は		種	の	N	力	L	-)	レキ	t ;	ba	反	応	で	あ	る
が	`	通	常	の	場	合	と	異	な	IJ	`	٢	C	で	は	Ľ	IJ	ジ	ン
環	の	電	子	吸	引	性	の	た	හ	`	4	• -	炭	素	の	反	応	性	が
や	や	乏	L	<	な	っ	て	ن ې	る	•	L	ታን	ι	`	カ	ル	ボ	=	ル
炭	素	を	セ	IJ	ン ン	が	攻	撃	す	る	と	生	成	物	が	\sim	ĩ	ア	セ
Ø		ル	と	な	ی	τ	不	安	定	で	あ	る	٢	٢	<u> </u>	ま	た	そ	の
場	合	は	Na	ΒH	4	還	元	ĸ	よ	る	絬	合	の	安	定	化	を	説	明
L	得	な	61	こ	ک	ታን	Б	4 '		炭	素	が	セ	IJ	ン	に	よ	っ	τ
攻	撃	を	受	け	る	と	考	え	る	の	が	自	然	で	あ	る	0	従	来
は	. x	Ш	の	×	チ	V	ン	炭	素	に	ł	IDC	の	求	核	性	残	基	が
結	合	す	る	と	考	え	<u>Б</u>	れ	て	¢۷	た	が	4	.)	x	そ	の	仮	説
に	よ	る	ح	失	狧	H	DC	の	変	性	に	よ	っ	て	F	рГЪ	或	<i>ن</i> ې	は
P	ΜP	が	遊	離	さ	れ	``	ま	た	Na	Bł	4	で	還	元	L	な	<	τ
ŧ	F	MH	由	来	の	部	分	٢	H	DC	と	の	結	合	は	安	定	の	は
ず	で	あ	IJ	<u>```</u>	両	方	ح	ŧ	,実	三馬	食	結	₹	に	矛	盾	L	τ	¢١
る	•	従	っ	τ	、	少	な	ζ,	と	ŧ	I	H D C	に	っ	い	て	は	従	来
の	仮	説	は	当	τ	は	ま	Б	な	¢,	0	今	ŧ	で	は	Ш	の	×	Ŧ
レ	ン	炭	素	σ	,反	応	七	カ	5 遥	1	t i	に	評	価	さ	n	τ	<u>ر</u> ې	た

(20×20)

No. 19

		Ta	b 1	е	6	に	示	L	た	Ш	の	7	Ц	×	. .		7	電	子
密	度	Ø	計	算	で	は	む	L	3	4 '		炭	素	の	方	が	求	核	攻
撃	を	受	け	易	۲	x	必	ず	ι	ŧ	×	f	ν	ン	炭	素	Ø	反	応
性	が	特	別	に	高	62	ح	は	言	え	な	5	0	4 '		炭	素	が	H
DC	の	IJ	シ	ン	に	よ	っ	τ	攻	撃	を	受	け	る	٤	F	ig	uг	е
6	の	Ш	→	VII	の	反	応	が	起	٢	る	۲	と	に	な	ŋ		٢	れ
ŧ	Fi	gu	ге	6	の	反	応	機	構	を	支	持	L	て	<i>ک</i> ۱	る	•		
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	修	飾	さ	れ	た	セ	IJ	ン	残	基	の	役	割	は	今	の	ح	ح	ろ
不	明	で	あ	る	が		袝	Ì	₹₹	Ē	ΡL	ΡĮ	معاد المعاد ا	の	位	置	関	係	ታን
Б		触	媒	反	応	に	お	61	て	何	<i>Б</i>	か	の	意	義	を	有	ŧ	る
ŧ	の	と	思	わ	れ	る	•	۲	の	点	に	っ	い	て	は	今	後	更	に
検	討	を	加	え	τ	行	<	方	針	で	あ	る	0			:	:		
					.											• • • • • • • • • • •	····• ···· ·		
:					:														
· ·	本	稿	е	終	え	る	ド	あ	た	IJ	·····	本	研	究	に	お	<u>ر</u> ،	て	終
始	本御	稿 指	を 導	終 下	えさ	るり	к ,	あ 本	た稿	り の	、 御	本校	研 閲	究 の	に 労	おを	い 賜	て わ	終り
始ま	本 御 し	稿 指 た	を 導 和	終 下 田	えさ	る り 博	に 、 教	あ 本 授	た 稿	り の <u>M o</u>	、 御 <u>rg</u>	本 校 an	研 閲 e	究 の []a	に 労 の	お を 酵	い賜素	てわに	終 り 関
始ます	本 御 しる	稿 指 た 研	を 導 和 究	終 下 田 の	え さ 機	るりくく	に 、 教 を	あ 本 授 お	た 稿 、 与	り の <u>M</u> o え	、 御 <u>r</u> g 下	本 校 an	研 閲 e	究 の 1 a ま	に 労 の し	お を 酵 た	い 賜 素 テ	てわにキ	終 り 関 サ
始ますス	本 御 し る 大	稿 指 た 研	を 導 和 究	終下田のエ	え さ 機 ズ	る り 使 モ	に 、 教 を ン	あ 本 授 お ド	た 稿 、 与	り の <u>M</u> o え E	、 御 下 ・	本 校 an さ ス	研 閲 い ネ	究 の <u>1 a</u> ェ ル	に 労 の し 教	お を 酵 た 授	い 賜 素 テ に	てわに キ心	終り関サよ
始ますスり	本 御 し る 大 感	稿 指 た 研 学 謝	を 導 和 究	終下田のエ意	え さ 機 ズ を	る り 博 会 モ 表	に 、 教 を ン し	あ 本 授 お ド ま	た 稿 、 与 ・ す	り の <u>M</u> o え E	、 御 下 ・	本 校 an さ ス	研 閲 い ネ	究 の 11ª ま ル	に 労 の し 教	お を 酵 た 授	い 賜 素 テ に	てわにキ心	終 り 関 サ よ
	*	稿	<i>b</i>	終	ž	z	K	あ	t:	4]	·····	本	研	究	に	お	<u>ل</u> ار	7	*

 $20 \times 20^{\circ}$

4

- Watanabe T, Taguchi Y, Hayashi H, Tanaka J, Shiosaka S, Tohyama M, Kubota H, Terano Y, Wada H: Evidnece for the presence of histaminergic neuron system in the rat brain: an immunohistochemical analysis. Neurosci. Lett. 39: 249-254, 1983
- 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) 渡辺建房,田口禄,和田博:ヒスタミンの代謝と関連願素ーヒスチジン脱炭酸 越来て中心に、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 <u>Morganella morganii</u> 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 duoble 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
- Hayashi H, Tanase S, Snell EE: Pyridoxal 5'-phosphatedependent histidine decarboxylase. Inactivation by α-fluoromethylhistidine and comparative sequences at the inhibitorand coenzyme-binding sites. J. Biol. Chem. in press, 1986

文献

- 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-<u>O</u>-sulfate. Biochemistry 21: 4377-4386, 1982
- 13) 菊池修;分子軌道法一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

At the indicated time, aliquots were taken from the solution to measure the residual activity. (B) Double reciprocal plots of the apparent 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 $37^{\circ}C$. 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 3. Absorption spectra at various pH values of the product released by heating FMH-inactivated mHDC (A) and the "Schnackerz adduct" (B). 3 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 refference 12) with modification.



of 1 ml were collected, and 5 μl of each fraction were used for counting reverse phase HPLC. Radioactive fractions from Sephadex G-50 column chromatography was lyophylized and applied to Zorbax ODS column. Fractions radioactivity.



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

	K _I (mM	K _m)	k inact (min	k _{cat}
rHDC	0.01	0.5*	0.25	54*
mHDC	0.1**	1.3***	32.2**	4300***

Table 1. Comparison of parameters for inactivation and catalytic reaction

 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.

2-Mercaptoethanol	k'inact
(1014)	(//////////////////////////////////////
0	0.25
1	0.17
5	0.086
10	0.049
20	0.027

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

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.

$$k_{\text{inact}}^{\prime} = \frac{K_{d}}{K_{d} + [2ME]} k_{\text{inact}}$$

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 into HDC	¹⁴ C-labeled FMH
[imidazole 2- ¹⁴ C]-FMH	320 cpm
[carboxyl - ^{[4} C]-FMH	20
background*	20

Three micrograms of rHDC was incubated with 14 C-labeled FMH (each 6 x 10³ cpm/nmol) in 1 ml of assay mixture for 30 min at 37°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.

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

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

Three micrograms of rHDC was incubated with 10 nmol of 3 H-FMH (1.28 X 10⁴ 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.

Amino acid c	composition	of T-10, T	-10m, and t	heir thermo	olytic fragm	ents.
Amino	Peptides	from nativ	e enzyme	Peptides	from modifi	ed enzyme
acid	T-10	Th-1	Th-2	T-10m	Th-lm	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 value:	s are ratio	s of amino	acids obta	ined after	hydrolysis v	vith 5.7 N

Table 5.

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 threenine during hydrolysis. Cysteine was determined as S-carboxymethylcysteine.

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

β		
$\begin{array}{c} & & \\ & \alpha \\ & & \\$	1.4314 0.8769 0.7571 1.1547 0.8822 1.0970 1.6090 0.7926 1.4421 1.1015 0.8554	0.1722 0.3977 0.0580 0.0665 0.2480 0.0038 0.0917 0.5117 0.2224 0.0058 0.2202

Calculations were carried out on a PC-8001 microprocessor using a program for ASMO-SCF-LCAO-MO method¹³⁾. Values for atomic distances and bond angles in PLP¹⁴⁾ were taken from the cited literature. The bond angles in the azomethine and $C\alpha$ -C β system were 120° and the atomic distances were standard values reported. Frontier electron density is for nucleophilic reaction.