



Title	Aromatic L-amino acid decarboxylase : Conformational change in the flexible region around Arg334 is required during the transaldimination process
Author(s)	石井, 誠志
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41182">https://hdl.handle.net/11094/41182</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	石 井 誠 志
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 2 0 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 12 月 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Aromatic L-amino acid decarboxylase: Conformational change in the flexible region around Arg334 is required during the transaldimination process (芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素, アルギニン334周辺のフレキシブル領域の構造変化とその役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡本 光弘 (副査) 教 授 谷口 直之 教 授 柳田 敏雄

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [目 的]

芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) は分子量54 kDa の同一サブユニットからなるダイマー酵素である。以前から本酵素にはトリプシンによって特異的に切断を受けるフレキシブルな領域が存在し、この切断により酵素の触媒能が著しく損なわれることが知られていた。AADC は PLP 酵素のフォールディングパターンによるタイプ分けではタイプ I に分類される。タイプ I の酵素の内、現在アスパラギン酸アミノ基転移酵素、オルニチン脱炭酸酵素をはじめ 8 つの酵素の立体構造が解明されているが、いずれの酵素においても一次構造上 PLP 結合リジンの直後に位置する一番目の  $\alpha$ -ヘリックスとそれに続くループ上に、もう一方のサブユニットの活性中心と相互作用しているアミノ酸残基が存在する。タイプ I 酵素とのアミノ酸一次構造比較によると AADC の Arg334周辺の領域は、この部位に相当すると考えられる。

最近 AADC の触媒反応は 2 つの中間体、すなわち Michaelis Complex および External Aldimine を経て進むことがわかっている。本研究は AADC の Arg334周辺のフレキシブル領域が AADC 触媒反応の進行過程において果たす役割の解明を目的とした。

#### [方法ならびに成績]

本研究ではフレキシブル領域の AADC 反応過程における状態を詳細に捉えるため 2 つの中間体を安定に形成する基質アナログ、すなわち Michaelis Complex モデルとしての dihydroxyphenylacetic acid (DOPAc) と External Aldimine モデルとしての L-dopa methyl ester (DopaOMe) を用いた。

AADC を 1/1000 (w/w) のトリプシンにより限定加水分解したところ、 $k_{inact} = 0.032 \text{ min}^{-1}$  の速度で失活した。ところが、失活速度は基質アナログ共存下では遅くなることがわかった。特に DopaOMe 共存下においては AADC の切断はほとんど起こらなかった。AADC の経時的な失活は Methyl- $\rho$ -nitrobenzenesulfonate (MNBS) による化学修飾においても見られ、この場合にも同様の基質アナログによる失活保護が起こった。ペプチドマッピングにより調べた

結果、MNBS により修飾された残基にトリプシン限定加水分解部位近傍に位置する His335 や His337 などが含まれていることがわかった。これらの残基は DOPAc 共存下では同様のパターンで修飾されていたが DopaOMe 共存下ではほとんど修飾されていなかった。

次に、フレキシブル領域が果たす役割を詳細に調べるために Asn327 と Met328 の間を境界とする断片化酵素を遺伝子操作により作製し、その性質を調べた。断片化酵素は完全には失活していなかったが、L-ドーパを基質として調べると野生型酵素に比べ、 $k_{cat}$  値が 1/57 倍に減少、 $K_m$  値が 9 倍に上昇していた。DopaOMe 共存下の吸収スペクトルは、断片化酵素のイミノ基転移反応の平衡が External Aldimine 側から Michaelis Complex 側に偏っていることを示した。断片化酵素をトリプシンにより切断すると Met328 から Arg334 までの 7 残基が除去されたが、これにより酵素は完全に失活した。また、断片化酵素では基質アナログ共存下での失活保護は起こらず、このことは断片化されたフレキシブル領域が反応進行に伴う構造変化を起こしていないことを示すと考えられた。

#### [総括]

野生型酵素のトリプシンによる限定加水分解および化学修飾実験の結果 AADC の Arg334 周辺のフレキシブル領域は、基質が結合し Michaelis Complex を形成すると open 型と closed 型の平衡が変化するような微細な構造変化をおこし、続くイミノ基転移反応の段階でこの領域が内部に埋もれるような大きな構造変化を起こすと考えられた。

断片化酵素と野生型酵素の性質を比較した結果、フレキシブル領域の構造変化は特にイミノ基転移反応の過程で重要であることがわかった。

Met328 から Arg334 までの 7 残基に AADC の触媒反応に重要な残基が含まれていると考えられた。一つの候補として近縁脱炭酸酵素間で完全に保存されている Tyr332 が考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

申請者の研究は、カテコールアミンおよびセロトニンの生合成において中心的な役割を果たしている酵素である芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素の構造機能相関についてタンパク質の動的側面から詳細な解析を行ったものである。遺伝子操作技術、蛋白質化学的手法など高度な技術を駆使し、得られた結果に対しても十分な議論を行っており、その内容は学位の授与に値すると考えられる。