

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
松田奈穂子	主査 教授 黒岩 敏彦 主査 教授 鏡山 博行 副査 教授 宮崎 瑞夫 副査 教授 清水 章浩 副査 教授 玉井 浩
主論文題名  <b>Instability of the Apo Form of Aromatic L-amino Acid Decarboxylase <i>in Vivo</i> and <i>in Vitro</i>. Implications for the Involvement of the Flexible Loop that Covers the Active Site</b> (アポ型芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素の <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> における不安定性: 活性部位を覆う可動性ループの関与)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) はドーパ、5-ヒドロキシトリプトファンなどを基質とし、それらの脱炭酸により各々ドーパミン、セロトニンなどの重要な生体アミンを生成する酵素である。AADC はビタミン B<sub>6</sub> に由来するピリドキサルリン酸 (PLP) を補酵素とする酵素である。現代の食事環境ではビタミン B<sub>6</sub> 欠乏はまれであるが、ヒドラジン化合物やシクロセリン、ペニシラミンなどの薬剤によりビタミン B<sub>6</sub> 欠乏状態を引き起こすことがある。以上より AADC 活性とビタミン B<sub>6</sub> の関係を解明することはさまざまな神経疾患の病態解明の一端を担うと考えられる。本研究ではビタミン B<sub>6</sub> 欠乏によって生じるアポ型 AADC の安定性を <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> において検討した。</p> <p>《方法》</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. カテコールアミン生合成系を持つラット PC12 細胞を DMEM (pyridoxine free) に 20 mM 4-デオキシピリドキシン(ビタミン B<sub>6</sub> アンタゴニスト)、5% ウシ胎児血清 (FBS) を添加した培地で培養して PLP 欠乏状態とし、3 日、6 日間培養した。正常対象として DMEM に 5% FBS を添加した培地で培養した PC12 細胞を用いた。細胞内 AADC 蛋白量をイムノブロッティング、PLP 濃度・AADC 活性を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて解析した。AADC のホロ化率は川崎らの方法をゲル濾過法と HPLC を組み合わせて感度・再現性を向上させた方法によって行った。</li> <li>2. <i>in vitro</i> の解析には <i>E. coli</i> にて組換えラット AADC を発現し、精製したものをを用いた。PLP を結合していない酵素(アポ酵素)はフェニルヒドラジンを反応させて PLP をヒドラゾンとして除くことで調製した。</li> <li>3. ホロ型 AADC・アポ型 AADC を基質類縁物質であるドーパメチルエステル存在下、非存在下において、トリプシンで限定分解をおこない、残存活性・蛋白質の分解の程度をそれぞれ HPLC・SDS-PAGE にて解析した。</li> <li>4. ラット AADC がブタ AADC と 85% の相同性を有することより、既知のブタ AADC 結晶構造を基にして分子力学計算プログラム (MOE) を用いてラット AADC の構造を構築し、構造安定性の解析を行った。</li> </ol> <p>《結果および考察》</p> <p>ビタミン B<sub>6</sub> 欠乏培地で培養したラット PC12 細胞において AADC の活性および蛋白量ともに 3 日後で約 9%、6 日後には約 5% 以下にまで低下した。しかし PLP を結合した酵素(ホロ酵素)の割合(ホロ化率)は対照と同じく 90% 程度であった。この結果を数学的に解析した結果 PC12 細胞内でアポ酵素はホロ酵素より 20 倍以上速く分解されていることが分かった。しかしホロ酵素とアポ酵素は構造上 PLP の有無以外に違いはなく、また PLP は AADC 蛋白質の奥深くに位置し細胞内蛋白分解系による認識</p>	

は困難と考えられる。このことよりアポ酵素がどのようにして優先的に分解を受けているのかを解明するため、トリプシン限定分解を細胞内蛋白分解のモデルとする *in vitro* の解析を行った。AADC はホロ酵素・アポ酵素ともトリプシンにより可動性ループ部分で分解を受けたが、ホロ酵素は基質類縁物質存在下ではほとんど分解を受けなかった。一方アポ酵素は基質類縁物質存在下でも非存在下と同様に分解された。この分子機構を探るため、ブタ AADC の X 線結晶構造に基づく立体モデル構築による解析を行った。その結果、可動性ループは AADC 表面から突き出しており、容易にプロテアーゼに認識され、分解を受けることが分かった。しかしホロ酵素では基質が PLP とシッフ塩基を形成することで活性部位に固定されると、可動性ループの疎水性残基と基質のカテコール環が疎水結合を形成することで可動性ループが活性部位の入口の窪みに固定されるために安定化される。したがって基質であるドーパの存在する細胞内ではこの変化によりホロ酵素は分解を免れているが、アポ酵素は PLP を持たないため、基質を強固に結合できず、可動性ループが安定化されないため、容易に分解を受けていると推測される。

以上より、ビタミン B<sub>6</sub> が細胞内 AADC 量を保つのに重要であることが示され、またその機構に AADC の基質ドーパが関与していることが示唆された。最近神経細胞におけるドーパの毒性が注目されているが、ドーパをドーパミンに変換することでその毒性を減弱させると考えられる AADC の安定性がビタミン B<sub>6</sub> とドーパによって維持されることは、パーキンソン病の病因等を考える上で重要な意義を有すると考えられる。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第684号	氏名	松田奈穂子
論文審査担当者		主査 教授 黒岩 敏彦 主査 教授 鏡山 博行 副査 教授 宮崎 瑞夫 副査 教授 清水 章 副査 教授 玉井 浩	
主論文題名			
<p><b>Instability of the Apo Form of Aromatic L-amino Acid Decarboxylase <i>in Vivo</i> and <i>in Vitro</i>: Implications for the Involvement of the Flexible Loop that Covers the Active Site</b>  (アポ型芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素の <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> における不安定性:活性部位を覆う可動性ループの関与)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)はビタミン B<sub>6</sub> に由来するピリドキサルリン酸 (PLP) を補酵素とし、カテコールアミンやセロトニンなど重要な生体アミンの生成に関与する重要な酵素であるが、その安定性や分解機構に関しては今まで明らかにされていなかった。</p> <p>申請者は <i>in vivo</i> においてアポ酵素とホロ酵素の存在比率を精密に測定し、さらにそれらの結果を速度論的に解析することで、アポ酵素がホロ酵素よりも約 20 倍速く分解される事実を見出している</p> <p>さらに申請者はその分子機構を探るため <i>in vitro</i> のモデル実験を行い、基質ドーパのアナログの存在下、ホロ酵素は蛋白質分解酵素による分解を免れるが、アポ酵素は分解を受けることを示している。そしてX線結晶解析に基づく立体モデル構築を用いた考察を行い、ホロ酵素では基質が PLP とシッフ塩基を形成することで活性部位に強固に結合し、基質側鎖と可動性ループの相互作用によって可動性ループがコンフォメーション変化を起こし、活性部位近傍の窪みに収納されることにより分解を免れるという機構を提唱している。</p> <p>本研究によりいまままで不明であった AADC の分解機構に関して、ビタミン B<sub>6</sub> および基質であるドーパの関与が重要であることを初めて示唆している。最近ドーパの神経細胞毒性に関して注目されており、ドーパをドーパミンに変換することでその濃度を下げる AADC の安定性に着目したことはパーキンソン病等の神経変性疾患の病因の解明の新しい端緒を開くものと考えられる。</p> <p>以上により本論分は本大学院学則第 9 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌)  <i>The Journal of Biochemistry</i> 135: 33-42, 2004</p>			