

博士学位論文

ヒスタミン合成酵素の触媒機構と
天然由来阻害物質の阻害機構に関する研究

2022年3月

竹島 大貴

岡山県立大学大学院

保健福祉科学研究科

目次

第一章 序章

第二章 1 アミノ酸置換によるヒスチジン脱炭酸酵素からイミダゾールアセトアルデヒド合成酵素への変換

第一節 背景と目的

第二節 材料及び方法

第三節 結果

第四節 考察

第三章 エラジタンニン三量体 Rugosin G によるヒト由来ヒスチジン脱炭酸酵素の活性阻害

第一節 背景と目的

第二節 材料及び方法

第三節 結果と考察

第四章 総括

謝辞

参考文献

第一章 序章

ヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)は、ヒスチジンに対して高い基質特異性を有し、ヒスタミンと二酸化炭素を生成する反応を触媒する。2種類のアイソザイムが存在し、補酵素にピリドキサール 5'リン酸(PLP)を有する PLP 依存性酵素と、活性中心がピルボイル基であるピルボイル酵素に分けられる。私たち哺乳類の生体内では、PLP 依存性 HDC がマスト細胞や好塩基球、ECL 細胞などのヒスタミン産生細胞に存在する。ヒスタミン生成菌と呼ばれる微生物において、PLP 依存性 HDC は、*Morganella morganaii* や *Photobacterium damsela* などのグラム陰性菌に、ピルボイル酵素は、*Lactobacillus 30a* や *Oenococcus oenos* などのグラム陽性菌に存在している。

私たち哺乳類の生体内では、HDC により生成されたヒスタミンは、胃酸分泌や平滑筋収縮、血管透過性亢進の三大薬理作用を有する生理活性物質として存在し、また、アレルギー疾患を引き起こすケミカルメディエーターとしても知られている[1][2][3]。一方で、ヒスタミン生成菌由来 HDC の生理的意義は明らかになっていないが、低 pH 環境でのストレス応答に関与すると考えられている。魚やその加工食品、ワインやチーズ、醤油などの発酵食品では、ヒスタミン生成菌由来 HDC によりヒスタミンが蓄積され、多量にヒスタミンが蓄積した食品を摂取した場合、アレルギー様食中毒を引き起こすことが知られている[4]。アレルギー疾患やアレルギー様食中毒に用いられる抗ヒスタミン薬には、第一世代と第二世代がある。第一世代は、ヒスタミンの受容体への結合阻害を目的として開発されたが、脳内での受容体結合阻害により強い眠気などの副作用をもたらす[5]。第二世代は、ヒスタミン産生細胞からのヒスタミン遊離抑制を目的としており、第一世代に比べ副作用が少ない[5]。例えば、受容体を阻害せず、HDC 酵素活性を直接制御できるような阻害剤は、ヒスタミン生成を抑制することでヒスタミン産生細胞からのヒスタミン遊離抑制が可能となる。さらに阻害剤を、天然化合物として植物や果実から抽出し、HDC を含む食品中に添加すれば、加工や保存段階でのヒスタミン蓄積を予防でき、阻害剤が体内に吸収されたとしても第一世代抗ヒスタミン薬のような副作用を生じない。

この学位論文は I ~ IV で構成されている。Chapter I では、この学位論文に関するイントロダクションについて記述する。Chapter II は、ヒスタミン生成酵素を含む PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素の活性中心に共通して保存されるチロシン残基に着目した研究、Chapter III は、天然物由来阻害物質によるヒスタミン生成酵素の阻害機構に関する研究、Chapter IV は、この学位論文の総括である。総合して、ヒスタミン生成酵素を含む PLP 依

存性アミノ酸脱炭酸酵素の触媒機構の解明と、ヒスタミン生成酵素の活性を制御できる、これまでになく阻害剤の開発に対する新たな知見を得ることを目的とした。

第二章 1 アミノ酸置換によるヒスチジン脱炭酸酵素からイミダゾールアセトアルデヒド合成酵素への変換

A single amino acid substitution converts a histidine decarboxylase to an imidazole acetaldehyde synthase

第一節 背景と目的

ヒト由来 HDC(*hHDC*)および *M.morganaii* 由来 HDC(*mHDC*)は、活性中心に PLP を要求する PLP 依存性酵素である。PLP 依存性酵素には、アミノ基転移、ラセミ化反応、脱炭酸反応など、様々な反応を触媒する酵素が存在する。PLP 依存性酵素の立体構造および進化的関係から分類した時、HDC はフォールドタイプ I グループ II に属する [6]。これまで *hHDC* では、活性中心の L305 や S354、Y334 といったアミノ酸残基が活性や基質特異性に関与することが明らかとなっている [7]。L305 のような活性中心のリシン残基は、グループ II PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素に共通して保存されており、活性中心への PLP 結合に重要な役割を果たすことが明らかとなっている [8]。Y334 のようなチロシン残基も、グループ II PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素に共通して保存されており、私たちが過去に決定した *hHDC* の X 線結晶構造から、2 つのサブユニット間に形成される活性中心において、Y334 は L305 とは別のサブユニットに由来するフレキシブルループ構造上のアミノ酸残基であることが明らかとなっている [7]。また、同じ研究において、このチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体がヒスタミンを合成しなくなったことから、L305 同様に HDC の触媒反応に重要な残基であることが示唆されたが、Y334 が触媒反応にどのような役割を果たしているのかまでは検討しなかった。

グループ II PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素の触媒機構では、活性中心に PLP が近づくと、リシン残基側鎖のアミノ基と PLP アルデヒド基のシッフ塩基結合により、内部アルジミン構造を形成し、PLP が活性中心に保持される。基質が活性中心に近づくと、リシン残基のアミノ基と基質のアミノ基が置き替わり(アミノ基交換反応)、PLP と基質が結合した外部アルジミン構造を形成する。その後、切断される基質 α 位の結合が PLP 依存性酵素の触媒する反応によって異なり、グループ II PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素では、外部アルジミン構造の基質 $C\alpha$ 位からカルボキシル基が脱離(脱炭酸)する。続いて、同じ位置にプロトン付与が起こる。その後、再度、アミノ基反応が起こり内部アルジミン構造を形成する過程で、アミンが生成する。

HDC の触媒機構においては、カルボキシ基の離脱(脱炭酸)の立体化学、脱炭酸後の中間体形成の有無、プロトン付与の仕組みが、未だ明らかとなっていない。また、グループ II PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素の中には副反応[9] [10]や、活性中心チロシン残基の置換によって別の反応を触媒する酵素[11]が存在するが、HDC では、そのような点についても明らかとなっていない。

本研究は、PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素に共通して保存されている HDC の活性中心チロシン残基変異体酵素を解析した、チロシン残基の役割に関する研究である。この研究で得られた触媒機構に関する新たな知見は、PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素の触媒機構の解明に貢献し、HDC 阻害剤の効率的な開発に繋がる。

第二節 材料及び方法

試薬

イミダゾール-4-アセトアルデヒド(イミダゾールアセトアルデヒド)は、Shinsei Chemical Company, Ltd. (Osaka, Japan)で合成されたものを購入し、その純度を NMR と LC-MS により確認した。その他、購入した全ての試薬は試薬グレードである。組み換えヒト由来アルデヒドデヒドロゲナーゼ 2(ALHD2)は、Sigma-Aldrich から購入した。

ヒト由来 HDC の酵素調製

C 末端側のアミノ酸残基を切断した、組み換え体 *hHDC*(*hHDC*^{C²⁻⁴⁷⁷})を過去の報告[7]に従って構築した。*hHDC*^{C²⁻⁴⁷⁷} は活性型で、全長配列の組み換え体 *hHDC* は活性を示さない[12]。この活性型 *hHDC*^{C²⁻⁴⁷⁷} を鋳型として C179S/C417S 変異導入した *dmhHDC* 変異体を過去の報告[13]に従って構築した。この変異導入により、酵素調製時のタンパク質分子間のジスルフィド結合による凝集を防ぐことができる。*dmhHDC* 発現用プラスミド(*dmhHDC*-pGEX-6p-1)を用いて形質転換した *E. coli* Rosetta 2 (DE3)を、LB 培地で 37°C で培養し、GST タグ融合タンパク質として発現させた。培養した細胞を遠心分離により回収し、超音波破碎した。GST-*dmhHDC* をグルタチオンセファロース 4B カラム(GE Healthcare, England)で精製し、PreScission protease (GE Healthcare, England)を 4°C, 16 時間作用させ、GST タグを切断した。その後、GST トラップカラムを接続した resource Q column (GE Healthcare, England)を用いて、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いて、流速 1 mL/min、20~250 mM NaCl の直線濃度勾配により *dmhHDC* を溶出、回収した。*dmhHDC* と *hHDC*^{C²⁻⁴⁷⁷} での酵素学的諸性質に変化はなかった。以降の実験では、*dmhHDC* を野生型 *hHDC* のコントロールとして用いた。334 番目のチロシン変異体酵素 Y334F/*dmhHDC* は、*dmhHDC* 発現用プラスミド *dmhHDC*-pGEX-6p-1 を鋳型に、部位特異的変異導入により作成されたプラスミドを用いて、*dmhHDC* と同様に調製した。タンパク質の精製度は SDS-PAGE により確認した。タンパク質濃度の測定は、280 nm における吸光度と ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>)によりアミノ酸配列から推定されるモル吸光係数を用いて計算した。

モルガン菌由来 HDC の酵素調製

組み換え体 *Morganella morganii* 由来 HDC (*mHDC*)を過去の報告[14]に従って構築した。これを鋳型として、C53S/C330S/C340S 変異導入した *tmHDC* 変異体と、さらに Y260F 変異導入した Y260F/*tmHDC* 変異体を、部位特異的変異導入により作成した。これら変異体の Cys 残基は、*dmHDC* (PDB ID: 4E1O)の結晶構造を鋳型に作成した *mHDC* の結晶構造モデルにおいて、タンパク質表面に位置する残基である(図 S1)。これらの Cys 残基を Ser 残基に置換することにより、*dmHDC* 同様、凝集を防ぐことで発現タンパク質の均一性を改良することができた。C53S/C330S/C340S 変異導入による活性への影響はなかった (*tmHDC* : $K_m = 1.55$ mM and $V_{max} = 22.7$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, wild-type *mHDC* : $K_m = 1.60$ mM and $V_{max} = 23.8$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)。以降の実験では、*tmHDC* を野生型 *hHDC* のコントロールとして用いた。*tmHDC* 変異体及び Y260F/*tmHDC* 変異体の発現用プラスミドを用いて *E. coli* BL21 (DE3)を形質転換した後、*dmHDC* と同様にタンパク質発現及び精製を行った。

ゲル濾過クロマトグラフィー

精製した *mHDC*、*tmHDC*、Y260F/*tmHDC* をそれぞれ 20 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0)にバッファー交換し、100 mM NaCl を含む 20 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0)で平衡化させた Hiload 16/60 Superdex200 カラムを用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。溶出画分を UV 検出器により 280 nm で検出した。分子量マーカーとして Molecular Gel Filtration calibration kit LMW(GE Healthcare, England 及び Molecular Gel Filtration calibration kit HMW (GE Healthcare, England)を用いて、それぞれの酵素の分子量を推定した。

分光分析

U-2900 UV 吸光光度計(Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan)と光路長 10 mm の石英キュベットを用いて、20 mM HEPES buffer(pH 7.0)中の精製酵素の吸収スペクトルを室温下で記録した。

酵素活性測定

脱炭酸活性は、反応混合液中のヒスタミン生成量から算出した。酸化的脱アミノ化活性は、反応混合液中の過酸化水素生成量から算出した。反応混合液は、50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 6.5)中に酵素、10 μ M PLP、様々な濃度の L-ヒスチジンからなる。dm*h*HDC と Y334F/dm*h*HDC の速度論的パラメーターを算出する際には、L-ヒスチジンを 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0 mM になるように反応混合液中に添加した。tm*m*HDC と Y260F/tm*m*HDC の速度論的パラメーターを算出する際には、L-ヒスチジンを 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10 mM になるように反応混合液中に添加した。反応混合液を 37°C の恒温槽にてインキュベートし、5 分後に、60% 過塩素酸を終濃度 5% になるように添加して酵素反応を停止させた。遠心分離により、変性したタンパク質を沈殿させ、上清をヒスタミン定量または過酸化水素定量に用いた。ヒスタミン定量では、過去の報告[15]に従い、 σ フタルアルデヒド(OPA)によって誘導体化されたヒスタミンを、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により測定した。ヒスチジン消費量も同様の HPLC システムにより測定した。過酸化水素定量は、Pierce Quantitative Peroxide Assay Kit を用いて測定した。

アルデヒド脱水素酵素を用いたアルデヒド検出

HDC 変異体が生成するアルデヒドを、ヒト由来の NADH 依存性アルデヒド脱水素酵素 2(ALDH2)[16][17]を用いて検出した。反応混合液は、50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)中に、10 μ M PLP、1.0 mM L-ヒスチジン、1.0 mM EDTA、0.5 mM NAD⁺、ALDH2 を含む溶液とした。ALDH2 は、反応混合液 200 μ L 中に 2 μ L (>0.14 units/mL)含まれるよう添加した。反応混合液を 37°C で予熱した後、チロシン変異体(Y334F/dm*h*HDC、Y260F/tm*m*HDC)を添加することで反応を開始させた。ALDH2 の脱水素反応(R-CHO + NAD⁺ + H₂O \rightarrow R-COOH + NADH + H⁺)で生じる NADH の 340 nm における吸光度の増加を測定することで、反応過程を観察した。

アルデヒドの定量分析では、HDC 変異体と ALDH2 を別々で反応させた。50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 6.5)中に 10 μ M PLP、1.0 mM L-ヒスチジン、HDC 変異体を含む反応混合液を室温(20 \pm 2 °C)でインキュベートした後、熱失活により反応を停止させた。熱処理した反応混合液を 50 mM Tris 溶液で 3 倍希釈することで、ALDH2 の反応性が高い pH 8.4 に調整した。

イミダゾールアセトアルデヒド合成反応による酸素消費量の定量

アルデヒド定量分析と同様の反応混合液を室温(20 ± 2 °C)でインキュベート中に消費される溶存酸素量を、溶存酸素計(standard Clark oxygen electrode (TOX-999i, Toko Chemical Laboratories Co., Ltd., Tokyo, Japan))を用いて観察した。

イミダゾールアセトアルデヒド合成反応により生成したアンモニアの定量

HDC 変異体とグルタミン酸脱水素酵素のカップリング反応(pH6.5 及び pH7.4)により、HDC 変異体が生成するアンモニアを検出した。反応混合液は、50 mM リン酸カリウム緩衝液中に、グルタミン酸脱水素酵素、HDC 変異体、1.0 mM α-ケトグルタミン酸、0.3 mM NADH、10 μM PLP、1.0 mM、L-ヒスチジンを含む溶液とした。グルタミン酸脱水素酵素の逆反応($\text{NH}_4^+ + \alpha\text{-ketoglutarate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{L-glutarate} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$)により消費される NADH の 340 nm におけるの吸光度の減少を測定することで、反応過程を観察した。pH6.5 の反応では、HDC 変異体とグルタミン酸脱水素の反応を分けて測定した。50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH6.5)中に、10 μM PLP、1.0 mM L-ヒスチジン、HDC 変異体を含む反応混合液を室温(20 ± 2 °C)でインキュベートした後、熱失活により反応を停止させた。熱処理した反応混合液を、50 mM リン酸水素二カリウム溶液で 3 倍希釈することで、グルタミン酸脱水素酵素の反応性が高い pH7.4 に調整した。

液体クロマトグラフ質量分析

反応混合液は、20 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液(pH6.5)中に、0.6 mM L-ヒスチジンと 2 μ M Y260F/*tm*mHDC を含んでいる。反応混合液を 37°C で 60 分間インキュベートした。反応混合液から酵素を除去するために、Amicon YM-30 membrane を使用して、限界濾過を行った。濾過液を水で希釈した後、等量のアセトニトリルと混合した。アセトニトリル：水=50:50 の溶媒中に 0.1 ppm(0.9 mM)になるように溶解したイミダゾールアルデヒドを標準品として用いた。酵素反応サンプルと標準品を、Waters 2695 Separation Module を接続した AB SCIEX API 4000TM LC-MS/MS System を用いて分析した。液体クロマトグラフィーには、Capcell Pak C18 MG (3- μ m pore size, 3.0 mm I.D. \times 75 mm) HPLC column (Shiseido, Ltd., Tokyo, Japan)を用いた。HPLC 条件及びパラメーターは表 S1 に示した。

結晶構造モデリング

*m*HDC のホモロジーモデルを、*h*HDC 結晶構造(PDB ID: 4E1O)を鋳型として、SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)を用いて作成した。作図には、PyMOL(<http://www.pymol.org>)を用いた。

第三節 結果

精製酵素の性質

全ての精製酵素(dm*h*HDC、Y334F/dm*h*HDC、tm*m*HDC、Y260F/tm*m*HDC)の SDS-PAGE 分析を行った。Y334F/dm*h*HDC と Y260F/tm*m*HDC のサイズは、それぞれ 50 kDa と 43 kDa で、アミノ酸配列から予測されるサイズと一致した(図 1)。dm*h*HDC と Y334F/dm*h*HDC は、335 nm と 425 nm に吸収帯を持った類似の吸収スペクトルを示した。tm*m*HDC と Y260F/tm*m*HDC も類似の吸収スペクトルを示し(図 2)、330 nm と 415 nm に吸収帯を示した。このような 330 nm と 420 nm 付近の二つの吸収帯は、PLP 依存性酵素に共通する特徴的な吸収スペクトルである[7]。tm*m*HDC と Y260F/tm*m*HDC のゲル濾過クロマトグラフィーでは、74.1 分に主要な溶出ピークが観察された。この溶出時間でのピークは、野生型 *m*HDC で観察されたピークと同等で(図 3)、約 94 kDa の推定サイズに相当する。この結果から、*m*HDC と tm*m*HDC、Y260F/tm*m*HDC は溶液中で二量体を形成し、かつ Y260F 変異導入は二量体形成に影響しないことが示唆された。これらのデータは、*h*HDC の過去の報告と同じ結果であった[7]。さらに、*M. morganii* と同じグラム陰性菌で、*M. morganii* 由来 HDC との配列相同性が 83%である *Enterobacter aerogenes* 由来 HDC の過去の報告[18]とも同じ結果であった。しかしながら、Tanase らが報告した、*M. morganii* AM-15 由来 HDC が四量体を形成するという結果とは一致しなかった[19]。

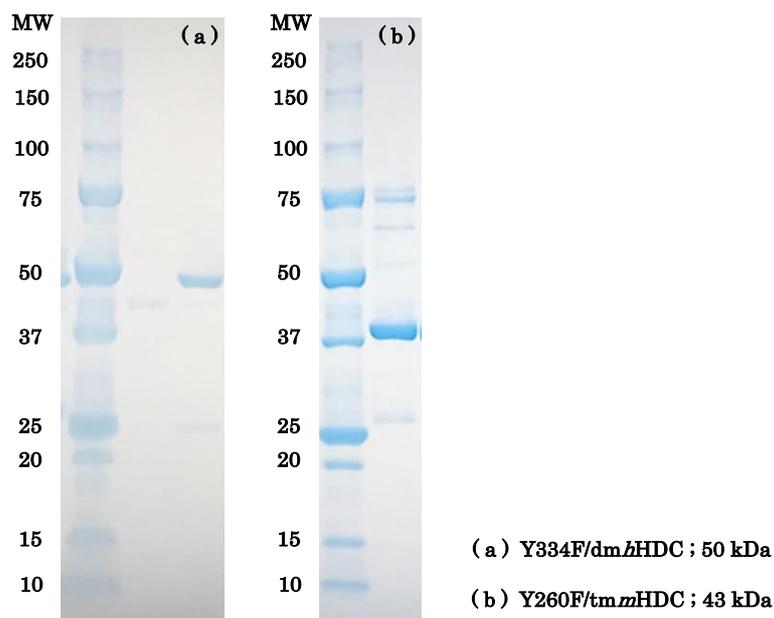


図 1 精製酵素の SDS-PAGE 結果

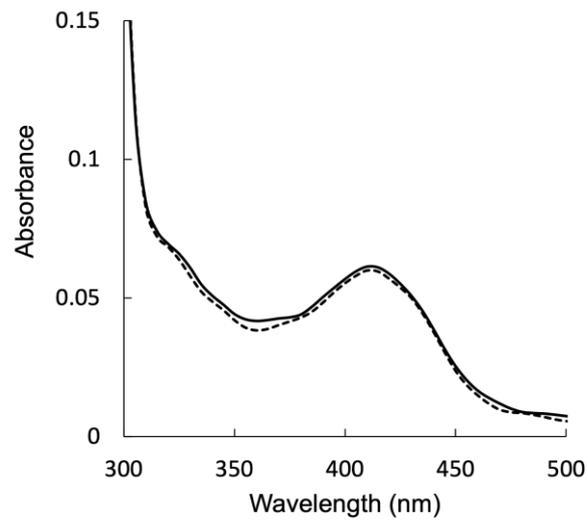


図2 モルガン菌 *HDC* の C53S/C330S/C340S(*tmHDC*)変異体と Y260F/*tmHDC* 変異体の UV スペクトル。実線 ; *tmHDC*、点線 ; Y260F/*tmHDC*

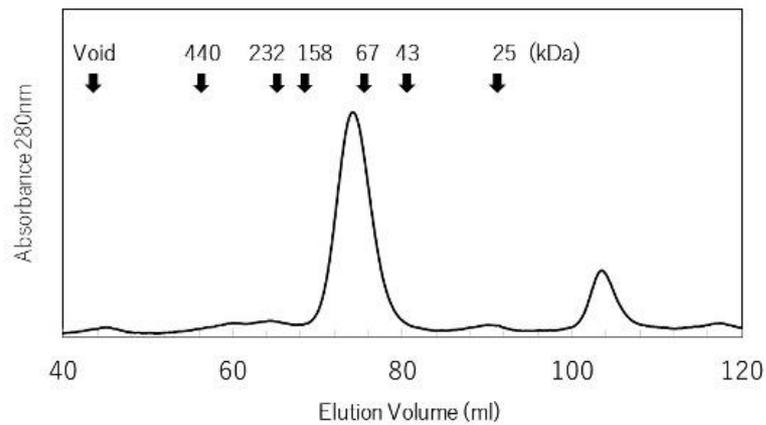


図3 野生型 *mHDC* のゲル濾過分析。280 nm の吸収における *mHDC* の溶出パターン
分子量マーカーのピークポジションとボイド容量を図の上部に示した。

ヒスタミン合成反応とイミダゾールアセトアルデヒド合成反応

Y334F/dm*h*HDC のヒスタミン合成反応の活性は、dm*h*HDC に比べて著しく低かった。しかしながら、Y334F/dm*h*HDC は、dm*h*HDC と同じくらい容易にヒスチジンを消費した。さらに、Y334F/dm*h*HDC は過酸化水素を生成していた(図 4)。Y260F/tm*m*HDC とヒスチジンとの反応においても、Y334F/dm*h*HDC と同様にヒスタミンは生成されず、過酸化水素生成が観察された(図 4)。ブタ由来芳香族アミノ酸脱水素酵素(AroDC)の Y332F 変異体が、脱炭酸依存酸化的脱アミノ化反応によって、過酸化水素に加えてアルデヒドやアンモニアを生成したという報告がある[11]。したがって、チロシン残基からフェニルアラニン残基へ置換した HDC 変異体の反応の生成物として、イミダゾールアセトアルデヒドが生成されるのか確認することにした。

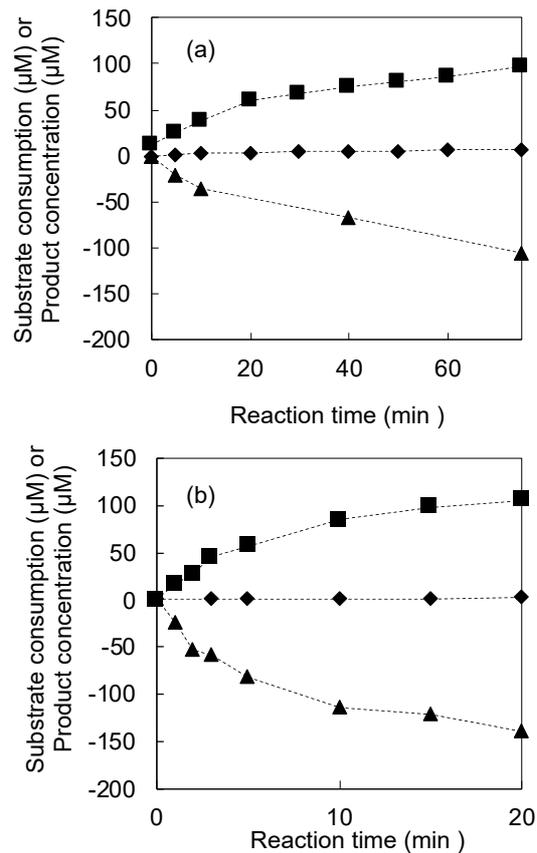


図 4 pH6.5 における(a)Y334F/ dm*h*HDC と(b)Y260F/tm*m*HDC の反応時間に伴うヒスチジン(▲)とヒスタミン(◆)、過酸化水素(■)の生成量

チロシン変異体により生成されるアルデヒドの同定(LC-MS/MS 分析)

イミダゾールアセトアルデヒド標準品を LC-MS/MS で分析した時、ジオール型のイミダゾールアセトアルデヒドに一致するシグナルが観察された。NMR 分析においても、アルデヒド型ではなくジオール型のピークが検出された(図 S2,表 S2)。これらの結果から、イミダゾールアセトアルデヒドは、水溶液中でジオール型として存在すると推測した。したがって、HDC チロシン変異体とヒスチジンとの反応におけるジオール型イミダゾールアセトアルデヒドの分析を試みた。その結果、酵素反応混合液の分析において、イミダゾールアセトアルデヒド標準品と同じサイズ(129/111)のフラグメントイオンが検出されたことから(図 5)、Y334F/ dm*h*HDC と Y260F/tm*m*HDC によって触媒される反応によって、イミダゾールアセトアルデヒド が形成されていることを確認した。

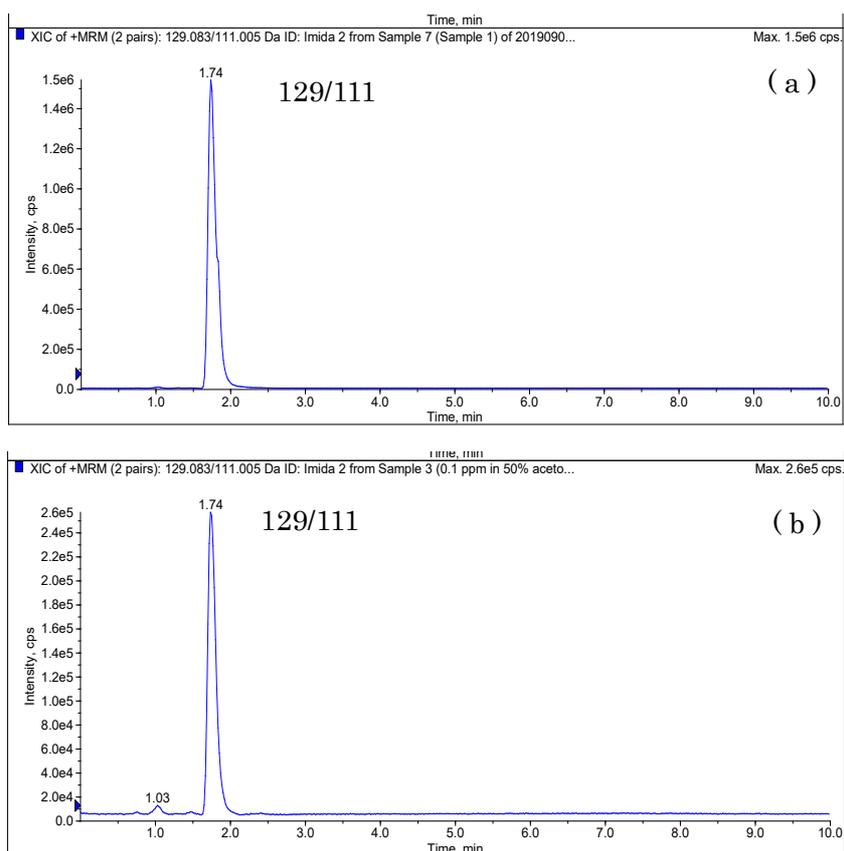


図 5 イミダゾールアセトアルデヒド標準品(a)と Y260F/tm*m*HDC の反応生成物(b)におけるイミダゾールアセトアルデヒド水和物に対応するフラグメントイオン(129/111)のクロマトグラム

HDC チロシン変異体と ALDH2 のカップリング反応

HDC チロシン変異体によって触媒的に生成されるイミダゾールアセトアルデヒドは、人ミトコンドリアタンパク質であるヒト由来アルデヒド脱水素酵素 2(ALDH2) の基質として知られている[16][17]。HDC チロシン変異体とヒスチジンとの反応によって、イミダゾールアセトアルデヒドが生成されていることを確かめるために、HDC チロシン変異体と ALDH2 を同じ反応混合液中で作用させた。HDC チロシン変異体によって生成されたイミダゾールアセトアルデヒドが ALDH2 の基質になるだろうと予測し、イミダゾールアセトアルデヒドが ALDH2 による触媒作用を受けると同時に起こる、 NAD^+ から NADH への変換の際の吸光度変化を観察した。10 μM PLP, 20 mM ヒスチジン, 40 mM EDTA, 20 mM NAD^+ , ALDH2, HDC 変異体を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 中で反応させた。37°C で HDC 変異体を添加することで反応を開始し、 NAD^+ が NADH に変換していることを示す 340 nm での吸光度を観察した(図 6)。HDC 変異体添加により、時間依存的な吸光度の上昇が観察された(図 6)。HDC または ALDH2 を含まない反応混合液では、このような吸光度の上昇は確認されなかった。

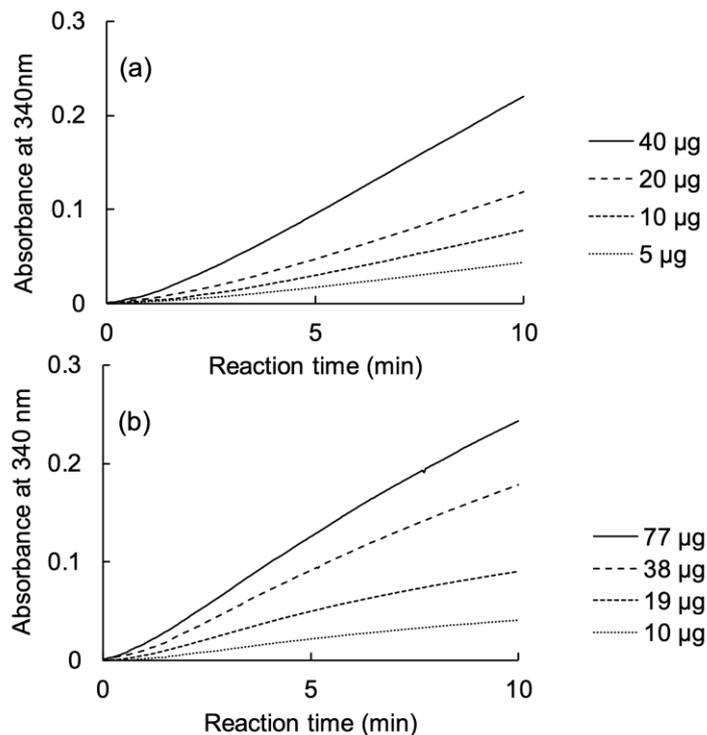


図 6 異なる HDC 酵素量の反応混合液を用いたチロシン変異体-ALDH2 カップリング反応時間に伴う 340 nm における吸収 (a)Y334F/dmHDC、(b)Y260F/tmHDC)

HDC チロシン変異体の生成物

HDC チロシン変異体の生成物の定量的関係を観察した。図 6 に示すように、Y334F/dm*h*HDC (図 7 (a))と Y260F/tm*m*HDC (図 7 (b))ともに、イミダゾールアセトアルデヒドと過酸化水素の生成量は、ほぼ同程度であった。アンモニア生成量と過酸化生成量の比較では、pH6.5(酵素活性測定時の pH)における反応ではアンモニア生成量が過酸化水素生成量に比べて少なかったが(データとして示していない。)、pH7.4(グルタミン酸脱水素酵素の至適 pH)における反応では、アンモニアと過酸化水素の生成量は、ほぼ同程度であった。これらの結果から、HDC チロシン変異体によって生成されるイミダゾールアセトアルデヒド、過酸化水素、アンモニアは、全て等モル量ずつ生成されていると考えられた。また、HDC チロシン変異体によって消費される酸素と生成物の定量的関係も観察した。Y334F/dm*h*HDC では、減少した溶存酸素量は、イミダゾールアセトアルデヒド生成量よりも少なかった。一方で、Y260F/tm*m*HDC では、減少した溶存酸素量とイミダゾールアセトアルデヒド生成量は、ほぼ同程度であった。Y260F/tm*m*HDC に比べ、Y334F/dm*h*HDC の反応による溶存酸素の減少速度が遅いため、反応中に空気から酸素が供給されたために消費量が減少したと考えられた。これらの結果から、イミダゾールアセトアルデヒド生成量と等モル量の溶存酸素が、HDC チロシン変異体によって消費されていると考えられた。図 4 に示すように、ヒスチジンの消費量は、過酸化水素生成量と同程度であったことから、生成した過酸化水素と等モル量のヒスチジンが消費されていると考えられた。以上の結果から、図 8 に示すように、HDC チロシン変異体の反応により、1 mol のヒスチジンが脱炭酸されると、1 mol の酸素が消費され、それぞれ 1 mol のイミダゾールアセトアルデヒド、過酸化水素、アンモニアが生成することが示唆された。

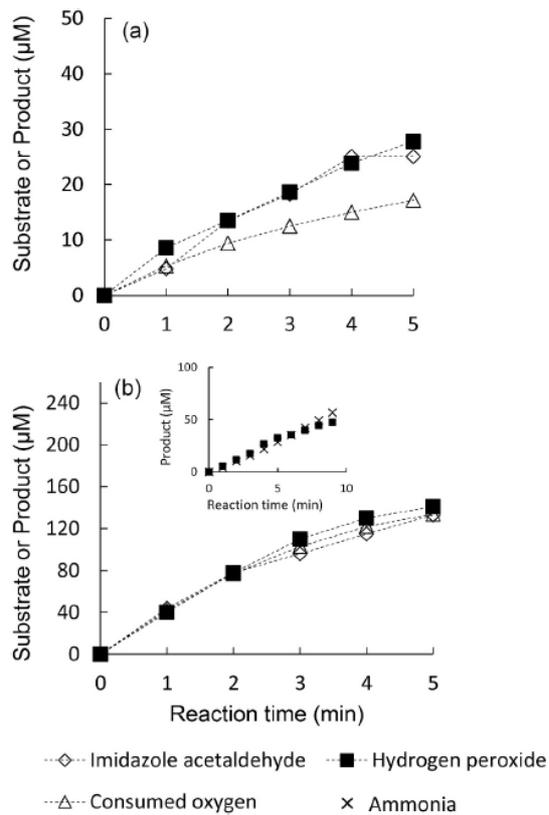


図7 pH6.5におけるチロシン変異体の反応時間に伴うイミダゾールアセトアルデヒド (◇)と過酸化水素(■)の生成量と酸素(△)消費量

(a) Y334F/dmhHDC (12 μM)、(b) Y260F/tmHDC (15 μM)

挿入図 ; pH7.4での Y260F/tmHDCの反応時間に伴う過酸化水素(■)とアンモニア (×)の生成量

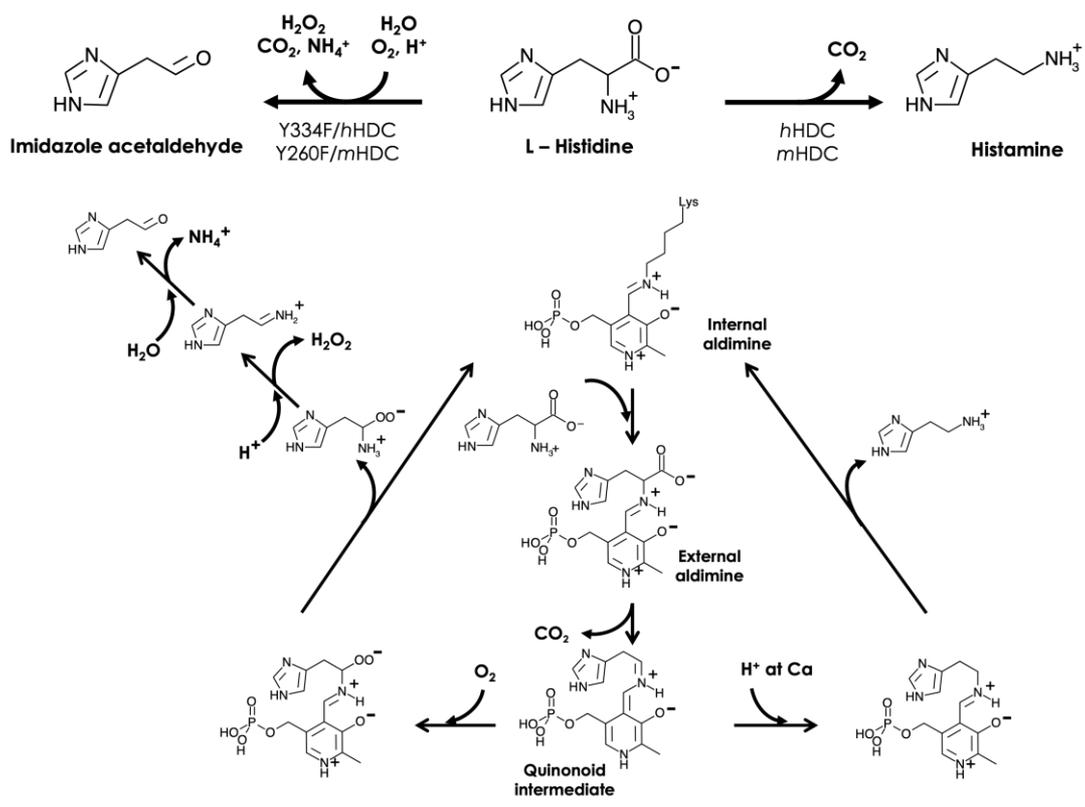


図8 野生型 HDC とチロシン変異体の予想の触媒サイクル

Kaminaga[31]や Wang[32]は、分子状酸素の反応においてキノノイド中間体から過酸化物が形成されると推測している。PLP が離れた後、過酸化物がプロトン化されてすぐに過酸化水素が放出され、加水分解をうけてアルデヒドとアンモニアが生成される[31][32]。

過酸化水素生成反応の速度論的解析

イミダゾールアセトアルデヒド合成反応の速度論的パラメーターを過酸化水素生成に基づいて算出し、表 1 にまとめた。基質親和性を示す K_m 値は、Y334F/dm*h*HDC、Y260F/tm*m*HDC とともに、野生型のコントロールである dm*h*HDC、tm*m*HDC と比較して、ほぼ同程度であった。この結果から、チロシン残基からフェニルアラニン残基への変異による基質結合への影響はなく、チロシン残基は基質結合には関与しないと考えられた。一方で、Y334F/dm*h*HDC と Y260F/tm*m*HDC によるイミダゾールアセトアルデヒド合成反応の k_{cat} 値は、dm*h*HDC と tm*m*HDC ヒスタミン合成反応に比べて著しく低かったことから、チロシン残基は脱炭酸反応に重要な残基であることが示唆された。

表 1 pH6.5 における dm*h*HDC によるヒスタミン合成反応と Y334F/dm*h*HDC によるイミダゾールアセトアルデヒド合成反応、tm*m*HDC によるヒスタミン合成反応 Y260F/tm*m*HDC によるイミダゾールアセトアルデヒド合成反応の速度論的パラメーター。 dm*h*HDC、Y334F/dm*h*HDC、tm*m*HDC、Y260F/tm*m*HDC の酵素濃度は、それぞれ 70、860、20、420 nM である。

| 酵素 | 生成物 | V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) | K_m (mM) | k_{cat} (s^{-1}) | k_{cat}/K_m (s^{-1}/mM) |
|-----------------------|-------|---|-----------------|----------------------------------|--|
| dm <i>h</i> HDC | ヒスタミン | 2.16 ± 0.13 | 0.20 ± 0.02 | 1.94 ± 0.11 | 10.0 ± 0.50 |
| Y334F/dm <i>h</i> HDC | アルデヒド | 0.07 ± 0.01 | 0.13 ± 0.01 | 0.06 ± 0.01 | 0.50 ± 0.05 |
| tm <i>m</i> HDC | ヒスタミン | 22.7 ± 3.54 | 1.55 ± 0.49 | 16.3 ± 2.53 | 11.3 ± 5.25 |
| Y260F/tm <i>m</i> HDC | アルデヒド | 0.38 ± 0.09 | 2.17 ± 0.42 | 0.27 ± 0.07 | 0.13 ± 0.05 |

第四節 考察

この研究では、*dmhHDC* の Y334F 置換により、同じ基質に作用しながらも、その触媒作用がヒスタミン生成からイミダゾールアセトアルデヒド生成にシフトしていることを示した。このことから、ヒト由来 *HDC* への Y334F 変異導入で、脱炭酸酵素からアルデヒド合成酵素へと変換したことが明らかとなった。ブタ由来 *AroDC* でも同様に反応が変換されたことが報告されている[11]。同じ PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素である *hHDC* と *AroDC* は、51%の高いアミノ酸配列相同性を示し、よく似た結晶構造を持っている[7][20]。したがって、哺乳類由来の *hHDC* と *AroDC* において、活性中心のチロシン残基は同様の役割を果たしていると推測する。

AroDC の結晶構造が決定されているが[20]、触媒ループの部分は明らかとなっていない。一方で、*dmhHDC* とヒスチジンメチルエステルの複合体の結晶構造では、触媒ループ上 334 位チロシン残基のヒドロキシ基が、ヒスチジンメチルエステルの C α 位近傍に位置していた(図 9)。この結果は、Fernandes らによる量子力学計算と分子動力学計算を組み合わせた QMMM 法と X 線結晶構造解析を用いたシミュレーション結果とも一致し[21]、この報告で、チロシン残基は、ヒスタミン生成反応におけるキノノイド中間体へのプロトン供与に重要であると示した。このことから、*hHDC* チロシン変異体は、334 位をチロシンからフェニルアラニンに置換されたことによって、基質 C α のプロトン供与が阻害されたためにヒスタミンが放出されないと推測する。

もう一つの PLP 依存性ヒスチジン脱炭酸酵素である *mHDC* のチロシン変異体も、アルデヒド生成反応を触媒した。しかしながら、*mHDC* の精製酵素でも凝集を起こしてしまい、酵素の触媒反応の解析のためには、この課題を解決する必要があった。まず、*dmhHDC* の結晶構造を鋳型とし、*mHDC* の二量体構造モデルを作成した。このモデルでは(図 S1)、53 位、330 位、340 位のシステイン残基がタンパク質の分子表面に位置しており、その側鎖が他のタンパク質分子のシステイン残基側鎖とジスルフィド結合を形成することで、精製酵素が凝集を起こしている可能性を考えた。したがって、この 3 つのシステインを全てセリンに置換した変異体酵素(*tmHDC*)を調製した。この *tmHDC* は、二量体を形成していることをゲル濾過クロマトグラフィーにより確認した。また、*mHDC* の構造モデルにおいて、260 位のチロシン残基は、もう一方のサブユニットの活性中心リシン残基の近くに位置していた(図 9)。このことから、*mHDC* と *hHDC* のアミノ酸配列相同性は 29%と低いが、構造モデルにおいて同様の場所に位置する *mHDC* の 260 位チロシン残基と *hHDC* の 334 位チロシン残基は、触媒反応においても同様の役割を果たすと推測する。

アミノ酸配列相同性に基づくと、*hHDC*は*mHDC*よりも*AroDC*とより近い関係にあり、B.Sandmeier らが作成したグループ II PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素の進化系統樹とも一致する[22]。したがって、グループ II PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素の祖先が、真核生物と原核生物で分岐した後、真核生物の共通した祖先から *hHDC* と *AroDC* に分岐したと推測する。図 10 では、様々なグループ II PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素(*HDC*[23][24]、*AroDC*[25]、グルタミン酸脱炭酸酵素(*GAD*)[26]、チロシン/*DOPA* 脱炭酸酵素{*TyDC*}[27][28]、トリプトファン脱炭酸酵素(*TDC*)[28])のアミノ酸配列を示しており、*mHDC* 以外は全て、真核生物由来の酵素である。さらに図 10 には、アミノ酸配列情報からグループ II PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素としてアノテートされているが、*hHDC* の 334 位チロシン残基と対応する位置が別のアミノ酸残基(フェニルアラニンまたはイソロイシン)に置換された酵素も含まれている。このようなグループ II PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素は、アルデヒド合成反応を触媒することが報告されている[29][30][31]。以上のことから、グループ II PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素に属する真核生物酵素に共通して保存されたチロシン残基は、アミノ酸脱炭酸反応のメカニズムにおいて同様の役割を果たすことを示唆している。

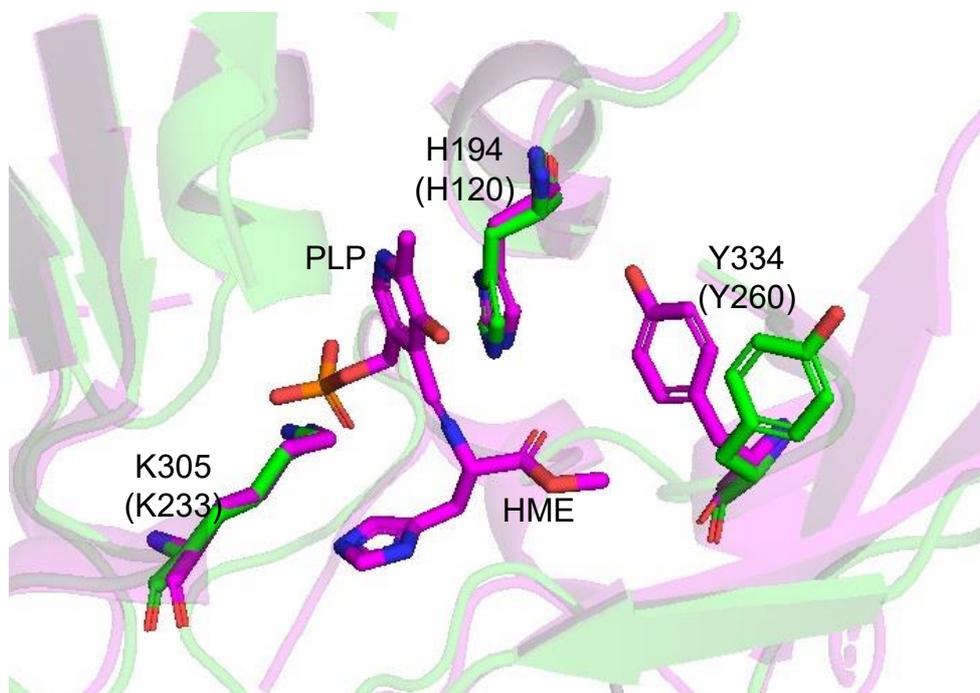


図 9 *dmHDC* の活性中心構造;マゼンダと *tmHDC* の活性中心構造モデル;グリーンを重ね合わせ。()内の残基番号は *tmHDC*

```

H.sapiens_HDC      296 ADSFTFNPS KWMMVHFDCTGFVVKDKYKLQQTFSVNPI YLRHA--NSG 341
M.morganii_HDC    224 IDSIGVSGH KMIGSPIPCGIVVAKKENV--DRISVEID YISA----- 263
H.sapiens_AroDC   294 ADSFNFNPH KWLLVNFDCSAMWVKKRTDLTGAFRLDPT YLKSHQDSG 341
H.sapiens_GAD67   396 ANSVTWNPH KMMGVLLQCSAILVKEKGI LQGCNQMCAG YLFQPKQYD 443
H.sapiens_GAD65   387 ANSVTWNPH KMMGVPLQCSALLVREEGLMQNCNQMHAS YLFQQDKHYD 434
A.thaliana_TyDC   352 ADSFNMNAH KWLFANQTCSPLVVKDRYSLIDALKTNPE YLEFKVSKKD 309
P.somniferum_TyDC 312 ADSFSLNAH KWFFTTLDCCCLWVKDSDSLVKALSTSAE YLKNKATESK 359
C.roseus_TDC      310 VDSL SLSPH KWLLAYLDCTCLWVKQPHLLLRALTTNPE YLKNKQSDLD 367
A.thaliana_AAS    300 ADSFNMNAH KWFLTNFDCSLLWVKDQDSLTLALSTNPE FLKNKASQAN 347
P.crispum_AAS     308 ADSFSLNAH KWFLTTLDCCCLWVRNPSALIKSLSTYPE FLKNNASETN 365
M.truncatula_AAS  293 IDSVTISGH KFLGCPSPCGVLIITRLKYM--NALS RDVD IIAS----- 332
C.arietinum_AAS  266 IDSVTISGH KFLGCPSPCGVVIITRLKYI--NELSRDVE IIAS----- 305

```

★

図 10 ヒスチジンデカルボキシラーゼ(HDC)、芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ

(AroDC)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)、チロシンデカルボキシラーゼ (TyrDC)、トリプトファンデカルボキシラーゼ(TDC)、様々な種由来のアルデヒド シンターゼ(AAS)のアミノ酸配列アライメント。アミノ酸デカルボキシラーゼで共 通して保存されているチロシン残基が、AAS ではフェニルアラニンやイソロイシン に置換されていた。★印で示したリシン残基はすべての酵素に保存されていた。 グレーで被ったアミノ酸残基は保存されたリシン残基またはチロシン残基である。

サプリメンタルデータ

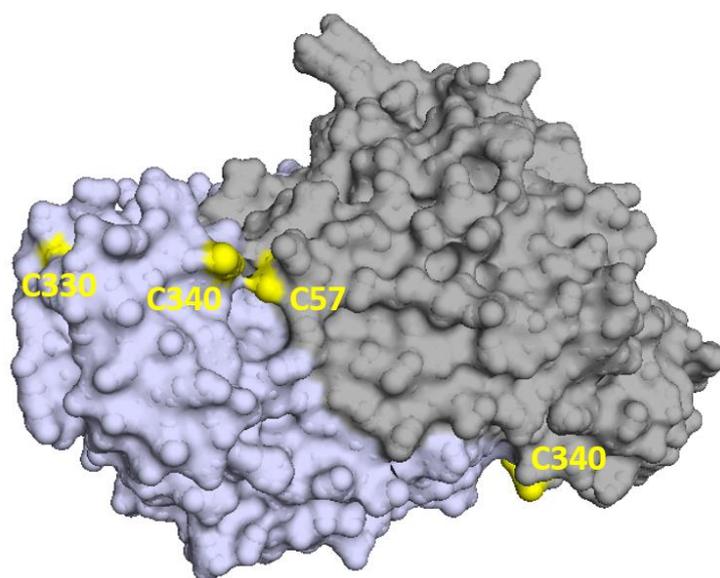


図 S1 *mHDC* の二量体構造モデル(鋳型構造 PDB ID : 4E1O)
黄色で示した残基がタンパク質表面に曝露したシステイン残基

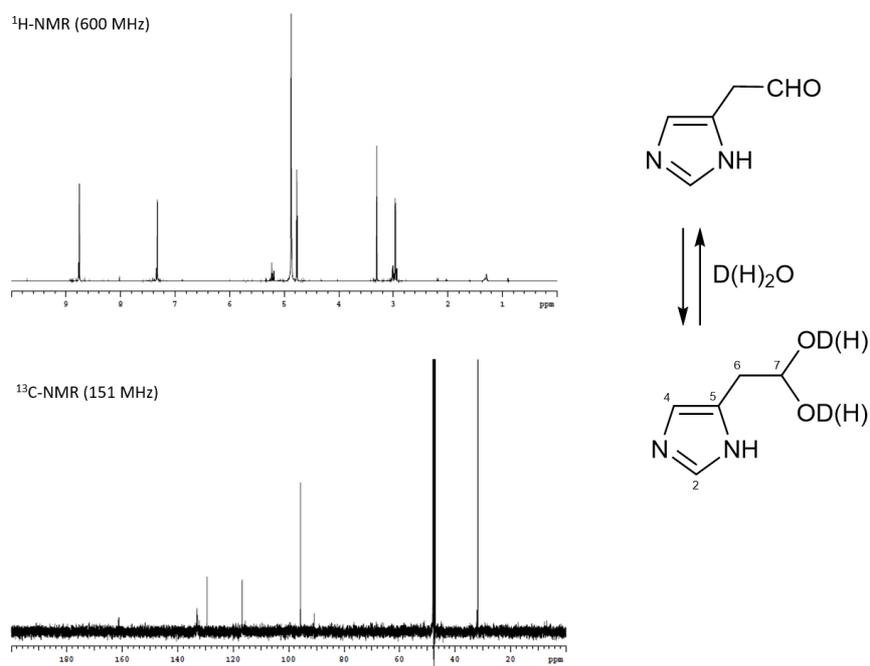


図 S2 重水素化メタノールに溶解したイミダゾールアセトアルデヒドの
 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルと $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル

表 S1 液体クロマトグラム質量分析の HPLC 条件とパラメーター

| | |
|------------------|---|
| HPLC system | Waters 2695 Separations Module |
| Column | CAPCELL PAK C18 3 μ m 3.0 mm I.D. \times 75 mm (SHISEIDO) |
| Column temp. | 40°C |
| Sample temp. | 5°C |
| Flow rate | 0.2 mL/min |
| Gradient | H ₂ O : CH ₃ CN =95 : 5 + 0.1% HCOOH (10 mM ammonium acetate) A100% 0-20 min |
| Injection volume | 10 μ L |
| MS/MS system | AB SCIEX API 4000 TM LC/MS/MS System |

表 S2 重水素化メタノールに溶解したイミダゾールアセトアルデヒドの NMR データ

| Number | δ_{H} (600 MHz) | δ_{C} (151 MHz) |
|--------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1 | | |
| 2 | 8.75 (1H, d, $J=1.8$ Hz) | 133.1 |
| 3 | | |
| 4 | 7.33 (1H, d, $J=1.8$ Hz) | 116.8 |
| 5 | | 129.5 |
| 6 | 4.77 (1H, t, $J=4.8$ Hz) | 31.8 |
| 7 | 2.97 (1H, t, $J=2.4, 4.8$ Hz) | 95.7 |
| | 2.96 (1H, t, $J=2.4, 4.8$ Hz) | |

第三章 エラジタンニン三量体 Rugosin G によるヒト由来ヒスチジン脱炭酸酵素の 活性阻害

The ellagitannin trimer rugosin G inhibits recombinant human histidine
Decarboxylase.

第1節 背景と目的

天然物は、有効な化合物の豊富な供給源ではあるが、高い活性を示す化合物の同定には広範なスクリーニングが必要不可欠である。私たちは、有効な HDC 阻害物質を 122 種の薬用植物から探索し、Tellimagrandin II や Rugosin A、Rugosin D などのエラジタンニンにその有用性を見出した[33][34]。エラジタンニン類は、様々な植物に存在し、500 種を超えるエラジタンニン類が同定されている。今日まで、HDC を競合的に阻害する HME のような様々なヒスチジン誘導体が開発されているが、臨床的応用可能なレベルには至っていない[35][36][37]。したがって、新しいアプローチでの阻害剤開発が必要である。これまでの研究で、単離したエラジタンニンはヒスチジン誘導体とは異なる様式で HDC を阻害することを明らかにしている。エラジタンニンは、HDC の基質であるヒスチジンや HME に比べ、基質結合ポケットに入れられないほど嵩高いため、基質結合ポケットの外に結合して、非競合的に様々な酵素の活性を阻害していると考えられている。エラジタンニン類は、HDC 阻害以外にも、様々な酵素を阻害し、また阻害されない酵素も報告されている。エラジタンニンが持つ様々な生理活性は、多様な構造が関係していると考えられている[38]。これまでの研究で、エラジタンニン単量体の Tellimagrandin II や Rugosin A よりも、二量体の Rugosin D の方が強く HDC を阻害する事が明らかになっており[34]、より大きなラジタンニンほど強く HDC を阻害する可能性を示唆している。

本研究は、Rugosin D よりも大きな三量体の Rugosin G や、直鎖状の Rugosin D や Rugosin G とは異なる環状の Oenothain B を用い、エラジタンニン類の多様な構造に着目した、HDC 活性阻害に関する研究である。

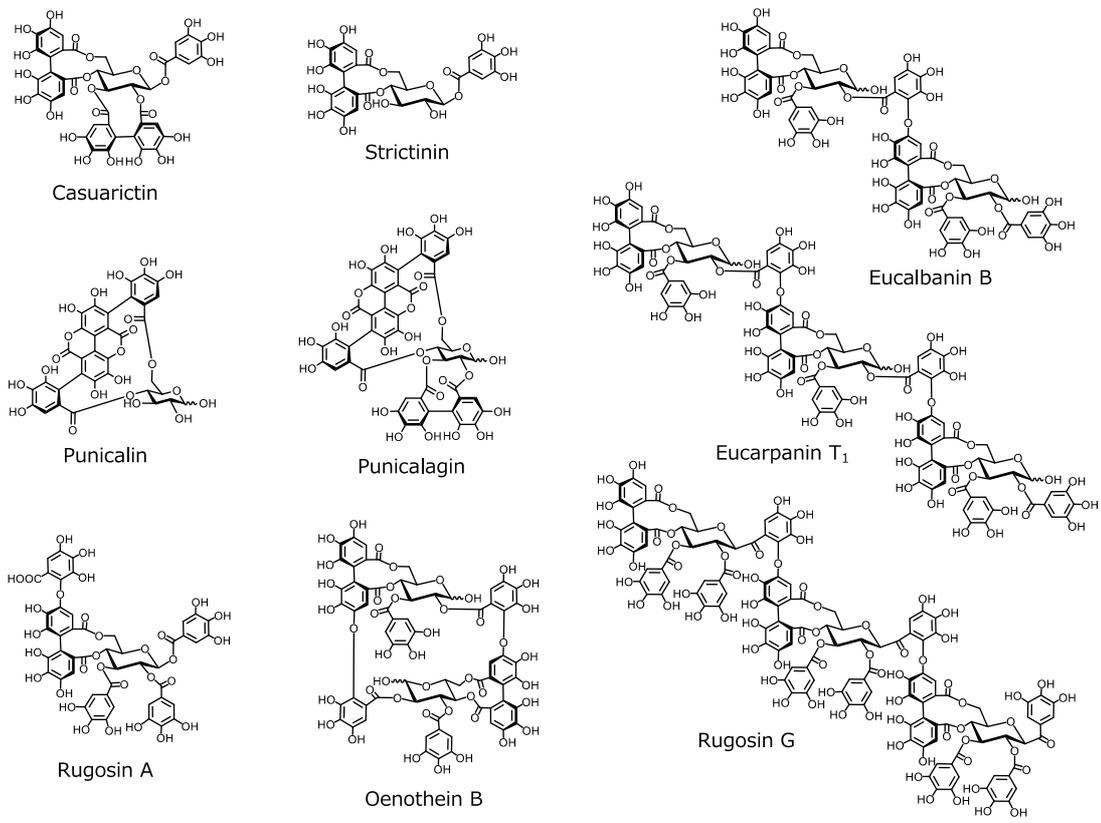


図 11 様々なエラジタンニンの化学構造

第二節 材料と方法

材料および試薬

Rosa gallica の乾燥した花は Taiyo Corporation (Osaka, Japan) から提供して頂いた。Punicalin、Punicalagin、Oenothlein B、Eucalbanin B、Eucarpanin T₁ は、ザクロから抽出した[39](図 11)。Rugosin A (図 11) は、メドウスイートの酢酸エチル画分から精製した。Strictinin と Casuarictin(図 11) は、Nagara Science Ltd.(Gifu, Japan) から購入した。これらのエラジタンニン類を蒸留水に溶解した試験サンプルを、HDC 阻害試験に用いた。

Rugosin G の調製

Rosa gallica の花 400g を微粉碎し、*n*-ヘキサンとジクロロメタン、70%アセトンを 5 L ずつ用い、室温で 3 回ずつ抽出を行った。抽出の際、微粉碎した花を溶媒に浸漬させ、一晚静置した。*n*-ヘキサン混合抽出液とジクロロメタン混合抽出液を減圧蒸留し、*n*-ヘキサン抽出液 5.4 g とジクロロメタン抽出液 5.2 g を得た。また、70%アセトン混合抽出液からアセトンを減圧濃縮し、その結果生じた水溶性残留物を酢酸エチルで分配させ、酢酸エチル画分 24.2 g と水溶性画分 101.2 g を得た。水溶性画分 10.7 g を、逆相クロマトグラフィーカラムの MCI Gel CHP20/P50 (Mitsubishi Chemical Co., Tokyo, Japan) に乗せ、水とメタノールで溶出した。メタノール画分を減圧濃縮し、3.0 g のメタノール抽出画分を得た。その内 2.6 g を、Sephadex LH-20 (GE, Uppsala, Sweden) を用い、エタノール中メタノール濃度を 0% から 100% (0%→20%→50%→75%→100%) に上げると同時に、メタノール中アセトン濃度を 5% から 100% (5%→50%→100%) に上げながらクロマト分離した。メタノール中アセトン濃度が 5% で抽出した画分から Rugosin G 31 mg を回収し、過去の報告[40]の ¹H NMR データとの比較により同定した。¹H NMR スペクトルは、溶媒としてアセトン-d₆ を用いて JNM AL-400 (400 MHz, JEOL, Tokyo, Japan) から得た。

酵素調製

dmhHDC 及び tmHDC の酵素液は、Chapter I と同様に調製したものをを用いた。

hHDC の脱炭酸反応活性の阻害実験

L-ヒスチジンに対する基質親和性 K_m は、0.1 mM であった。dmhHDC 阻害試験では、100 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 6.8 と 0.01 mM PLP、1.4 $\mu\text{g/mL}$ dmhHDC、試験サンプル 10 μL の反応混合液に、L-ヒスチジンを 0.8 mM になるよう添加することで反応を開始し、37°C で 20 分間反応させた。その後、200 μL の反応混合液に対して 10 μL の 60% 過塩素酸を添加して反応を停止した。この反応に生じたヒスタミン量から比活性を算出した。時間依存試験では、dmhHDC とそれぞれのエラジタンニン類を 37°C で一定時間プレインキュベートした後、L-ヒスチジンを添加して 37°C で 20 分間反応させた。産生したヒスタミンを、Histamine pack column (Toso, Tokyo, Japan) を用いた高速クロマトグラフィーにより分離し、 σ -フタルアルデヒド法を用いて蛍光定量的に測定し、ピーク面積[S]を元に定量した[41]。それぞれのエラジタンニン類による dmhHDC 活性の阻害率を次の計算式により算出した。

$$\text{inhibitory rate (\%)} = 100 - (\text{histamine [S] of sample}) / (\text{histamine [S] of control}) \times 100$$

コントロールとして、試験サンプルの代わりに蒸留水を同量添加した反応混合液を用いた。それぞれの試験において、同様の 2 つのサンプルを分析した。阻害定数の測定では、L-ヒスチジンの濃度を 0.1 mM から 0.8 mM の一定範囲に固定した。速度論的データの算出には、SigmaPlot Enzyme Kinetics Module (Systat Software, San Jose, CA, USA) を用いた。反応速度を式に適合させ、競合阻害、非競合阻害、不競合阻害、混合阻害のそれぞれの様式の中から、赤池基準を使用し、最も適合する阻害様式を特定した。

tmHDC の脱炭酸反応活性と Y260F/tmHDC の酸化的脱アミノ化反応活性の阻害実験

阻害剤として Rugosin G を用いた。脱炭酸反応活性の阻害実験は、dmhHDC と同様の方法で行い、同様の計算式より阻害率を算出した。

酸化的脱アミノ化反応活性の阻害実験は、Y260F/tmHDC を用いて、dmhHDC の脱炭酸反応活性の阻害実験と同様に反応させた後、反応液中の過酸化水素量を定量した。コントロールとして、Rugosin G の代わりに蒸留水を同量添加した反応混合液を用いた。阻害率は、次の計算式により算出した。

$$\text{inhibitory rate (\%)} = 100 - (\text{H}_2\text{O}_2 [\mu\text{M}] \text{ of sample}) / (\text{H}_2\text{O}_2 [\mu\text{M}] \text{ of control}) \times 100$$

第三節 結果と考察

Rugosin G は、濃度 1 μM で *dmhHDC* の活性を 90%以上阻害した。*dmhHDC* に基質を作用させる前に、Rugosin G とプレインキュベートした際、インキュベート時間による阻害率に変化はなかったことから、速度論的解析が可能であると判断した。その解析の結果、Rugosin G の阻害様式は、非競合阻害($K_i = 0.23 \pm 0.02 \mu\text{M}$)であった。

様々なエラジタンニンを用いた *HDC* の阻害実験の結果を、図 S3 及び表 2 に示した。三量体である Rugosin G と Eucarpanin T₁[40]は、他のエラジタンニンよりも強力に *dmhHDC* を阻害した。二量体の Eucalbanin B[34]は、同じく二量体の Rugosin D[34]と同程度に *dmhHDC* を阻害した。一方、単量体では、*dmhHDC* を阻害しないエラジタンニンも存在した。

tmHDC は、濃度 20 μM の Rugosin G により 90%以上の活性が阻害された(図 12)。この時に過酸化水素生成は見られなかった。また、Y260F/*mHDC* は、0.5 μM の Rugosin G により 90%以上の活性が抑制された(図 13)。Rugosin G と過酸化水素の混合溶液中での過酸化水素量に変化は見られなかった。Y260F/*mHDC* と Rugosin G のカイネティクス解析を行った結果、Rugosin G の阻害様式は、非競合阻害(K_i 値 0.60 μM)であった(図 S4)。

表 2 試験に用いたエラジタンニンによる阻害結果

| エラジタンニン | | K_i (μM) | 阻害様式 | IC_{50} (μM) | 立体構造 |
|---------------|-------------|----------------------------|-------|---------------------------------------|------|
| Rugosin G | (Trimer) | 0.23 ± 0.02 | 非競合阻害 | | 直鎖状 |
| Eucarpanin T1 | (Trimer) | 0.30 ± 0.06 | 非競合阻害 | | 直鎖状 |
| Eucarpanin B | (Dimer) | 0.52 ± 0.10 | 非競合阻害 | | 直鎖状 |
| Oenothain B | (Dimer) | 16 ± 4 | 非競合阻害 | | 環状 |
| Rugosin | (Monomer) | 0.80 ± 0.02 | 非競合阻害 | | |
| Casuarictin | (Monomer) | 3.1 ± 0.1 | 非競合阻害 | | |
| Strictinin | (Monomer) | | | 170 ± 20 | |
| Punicalagin | (Monomer) | | | >500 | |
| Runicalin | (Monomer) | | | >500 | |

IC_{50} value (μM) at 0.8 mM histidine

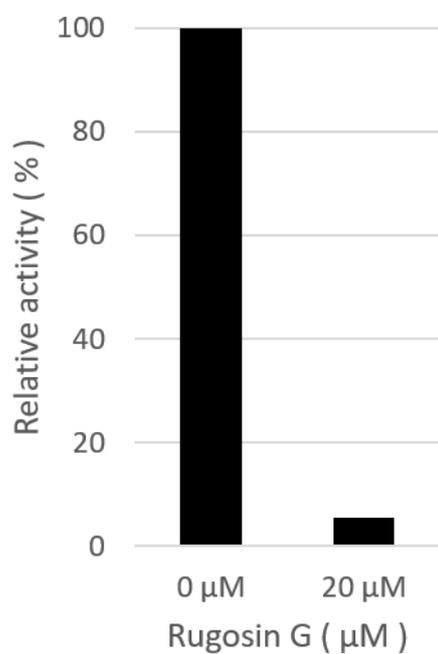


図 12 Rugosin G による *tmmHDC* の脱炭酸反応の阻害結果

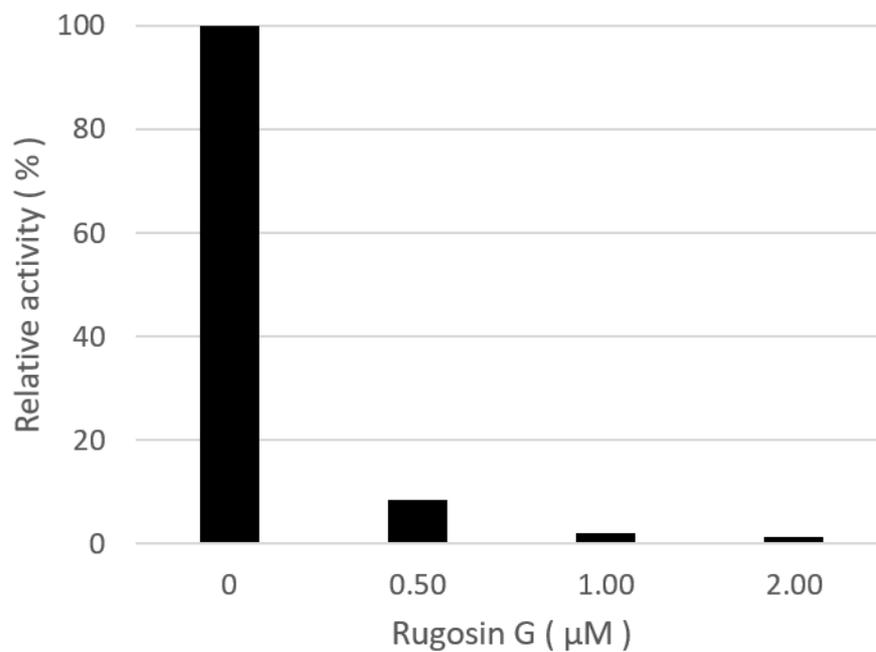


図 13 Rugosin G による Y260F/*tmmHDC* の酸化的脱アミノ化反応の阻害結果

阻害実験に用いたエラジタンニン類の多量体構造に着目すると、オリゴマー化するほど HDC 活性阻害に有効であることが示唆された。しかしながら、二量体である Oenothain B は、モノマーよりも *dmhHDC* を阻害しなかった。さらに、エラジタンニン類の立体構造に着目すると、Rugosin G、Eucarpanin T₁、Eucalbanin B、Rugosin D は直鎖状構造である一方で、Oenothain B は環状構造であった(図 11)。ウシ血清アルブミンに対する Oenothain B の結合親和性は、直鎖状エラジタンニンの結合親和性よりも低く、oenothain B 分子の柔軟性は直鎖状分子の柔軟性よりも低いという報告があり [42]、これらのことから、エラジタンニンの直鎖状にオリゴマー化することが *dmhHDC* 阻害に重要な要因であると推測している。本研究で用いたエラジタンニン類の他にも、四量体、五量体、六量体の直鎖状にオリゴマー化したエラジタンニン類がザクロで同定されており [39]、それらが Rugosin G よりも高い HDC 活性阻害効果を発揮するかもしれない。今後、それらの阻害活性を評価する予定である。

hHDC は、活性部位と別サブユニットの触媒ループが接近するように、二量体構造を形成しており、触媒ループ上の Tyr334 をフェニルアラニンに置換した変異体では、活性を失ってしまうことが報告されている [7]。このことから、Tyr334 は、活性部位に結合した基質の近くに位置し、触媒作用に重要な役割を果たしていると考えられた。したがって、エラジタンニン類が、触媒ループに結合することによって、*hHDC* 活性を阻害することが考えられた。Rugosin G の分子量(Mw:2802)は、*hHDC* (Mw:~54,000) よりも約 20 倍小さい。Rugosin G 濃度が 0.23 μM の時の Rugosin G と *hHDC* のモル比は~10 : 1 であり、*hHDC* の分子表面全体カバーできるほど十分な濃度ではない。したがって、Rugosin G が *hHDC* の触媒ループに選択的に結合することで、*hHDC* を阻害している可能性が考えられた。Eucarpanin T₁ も Rugosin G と同様であると考えられた。

mHDC は、Rugosin G により 90%以上の脱炭酸反応活性が阻害されても(図 12)、酸化的脱アミノ化反応は生じなかった。さらに、Y260F/*mHDC* は、Rugosin G とのモル比 1:1 で 90%以上の酸化的脱アミノ化反応活性が阻害された。これらのことから、Rugosin G は、*HDC* の触媒ループに選択的に結合することによって、チロシン残基や溶存酸素が基質 Ca にアプローチできないような構造の変化をもたらしているのではないかと推測する。

サプリメントデータ

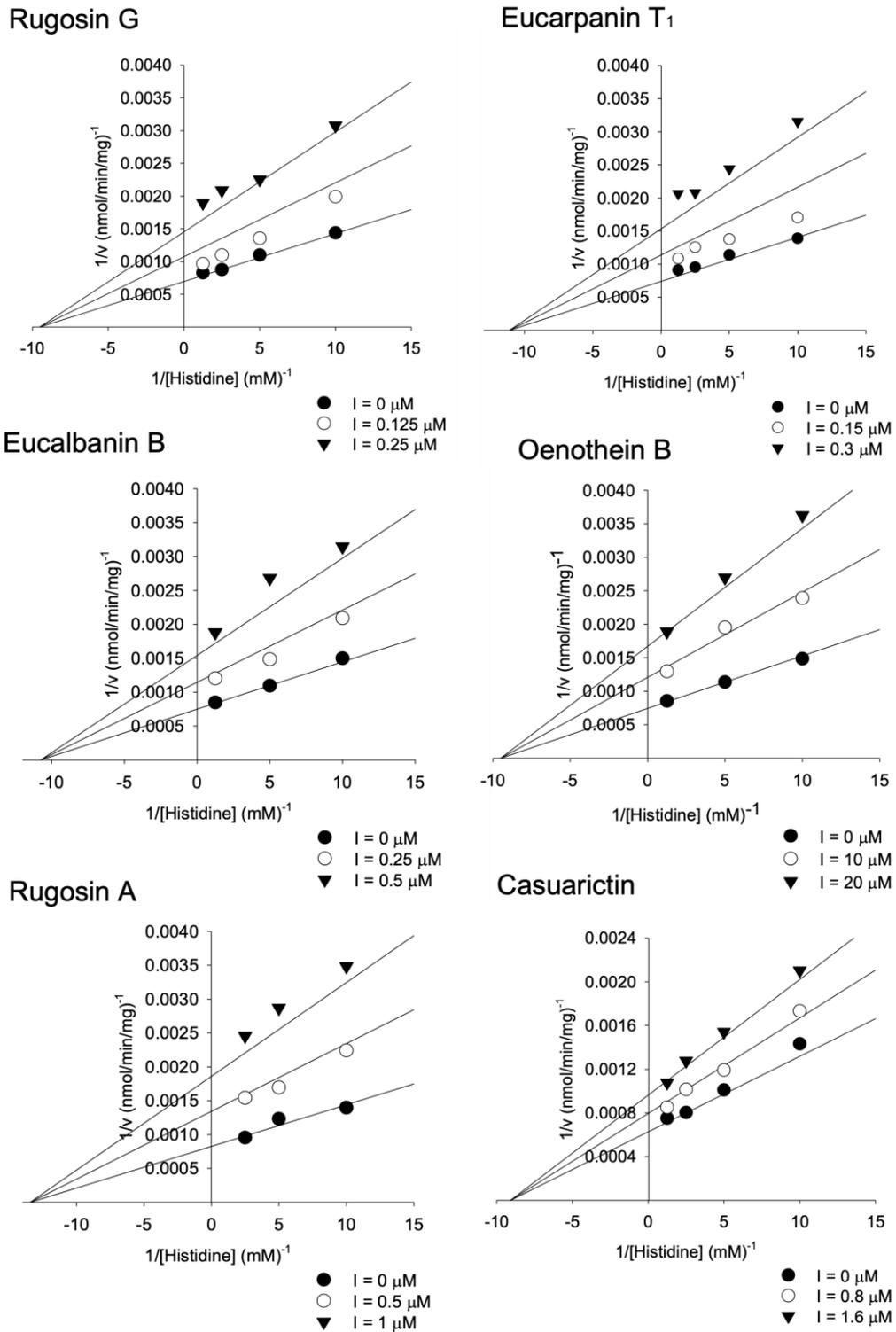


図 S3 様々なエラジタンニンによる hHDC 活性阻害の Lineweaver-Burk プロット

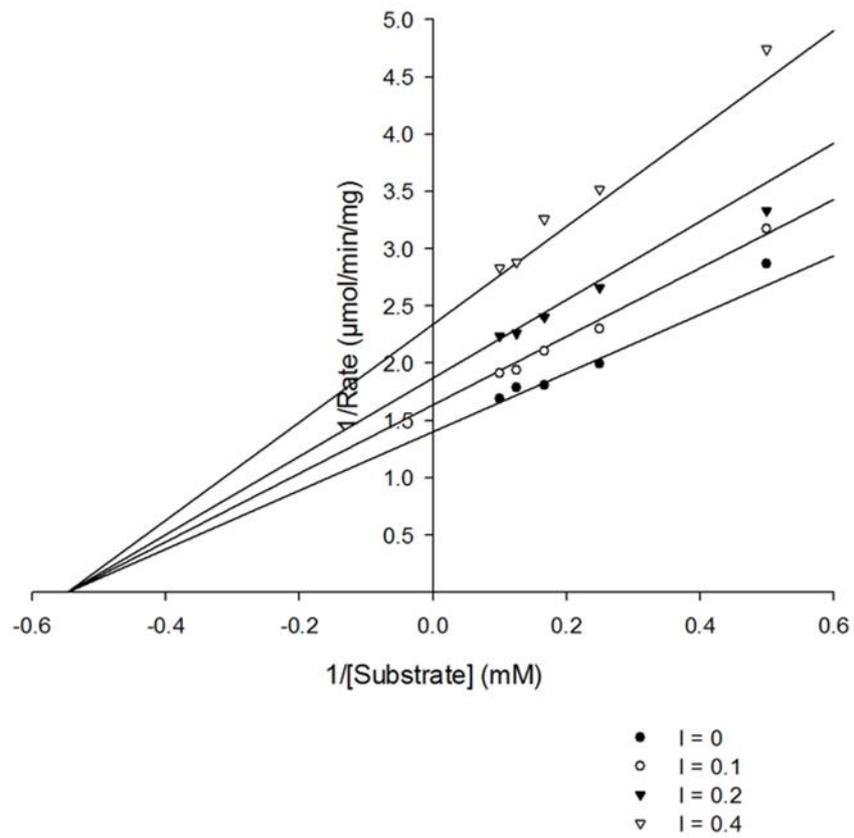


図 S4 Rugosin G による Y260F/mHDC 活性阻害の Lineweaver-Burk プロット

第四章 総括

アレルギー反応やアレルギー様食中毒に関与するヒスタミンは、HDCによるヒスチジンの脱炭酸反応によって合成される。したがって、HDCの阻害によりヒスタミン量を制御できれば、アレルギー疾患やアレルギー様食中毒の治療や予防に貢献できる。本研究では、有用なHDC阻害物質を豊富な天然資源から効率的にスクリーニングするために、HDCの触媒機構と、HDC阻害作用を持った天然由来化合物のHDC阻害機構に関する新たな知見を得ることを目的とした。

第二章では、HDCを含むPLP依存性アミノ酸脱炭酸酵素の活性中心に共通して保存されるチロシン残基に着目し、その変異体酵素の機能解析を行った。チロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した変異体は、HDC本来の脱炭酸反応(ヒスタミン合成反応)を触媒せず、脱炭酸依存酸化的脱アミノ化反応(アルデヒド合成反応)を触媒していた。この結果から、チロシン残基が脱炭酸反応に重要な役割を果たすことが明らかとなった。HDCを含むPLP依存性アミノ酸脱炭酸酵素の触媒機構の未解明な部分のひとつが、基質C α 位のカルボキシル基離脱(脱炭酸)後に生じる同C α 位へのプロトン付与の仕組みである。ヒスタミン合成反応とアルデヒド合成反応は、基質結合から脱炭酸までは同様に進行するが、チロシン残基の有無によって、別々の経路へと進行すると考えられている。したがって、チロシン残基は、触媒機構におけるプロトン付与に関与する重要な残基である。このチロシン残基がC α 位近傍に位置できないように動きを制限したり、チロシン残基と溶媒が接しないようにHDCに結合する化合物は、HDCの活性を阻害できると考えられる。しかしながら、C α 位へプロトンが付与されない場合、酸素分子が代わりに付与され、アルデヒド合成反応を触媒する可能性が考えられる。したがって、HDC阻害剤としての有用性を評価するためには、ヒスタミン合成反応の阻害作用とともに、アルデヒド合成反応が触媒されていないことも確認する必要がある。

第三章では、HDC阻害剤に関する過去の研究で、HDC阻害剤としての有用性を見出した天然由来化合物エラジタンニンのHDC阻害に関する知見を深めるために、エラジタンニンが持つ多様な構造に着目し、様々なエラジタンニンを用いてヒト由来HDCを阻害させた。その結果、Rugosin Gが最も強力なHDC阻害化合物であり、エラジタンニンの多様な構造において、直鎖状にオリゴマー化することがHDC阻害に重要な要因であると考えられた。エラジタンニンの構造の多様性は、その基本構造であるヘキサヒドロキシジフェノイル(HHDP)基によるD-グルコースのヒドロキシ基の架橋位置や数、過剰酸化、修飾などによってもたらされている。オリゴマー化においても、同様に直鎖状に結合しているわけではなく、例えば同じ三量体であるRugosin GとEucarpanin T1では、モノマー間を繋ぐガロイ

ル基の D グルコースへの結合位置が異なっている。このような構造上の違いを、スクリーニング条件に設定することで、より効率的に阻害剤を探索できるかもしれない。

また、エラジタンニン¹は、HDC の基質であるヒスチジンに比べると、はるかに大きな分子構造を持つことから、活性中心ではなく、タンパク質表面で相互作用して HDC 活性を阻害していると考えられる。このことから、第二章で着目したチロシン残基の動きがエラジタンニンによって直接制限されているとは考えにくい。このチロシン残基は、フレキシブルループという構造を構成するアミノ酸残基であり、このループはタンパク質表面に曝されている。また、HDC 阻害時の Rugosin G 濃度では、HDC タンパク質表面を覆いきれるほどの濃度ではないことから、特定の位置で相互作用することで HDC を阻害している可能性が考えられる。したがって、エラジタンニンがフレキシブルループの動きを制限するようにタンパク質表面の特定の部位で相互作用した結果、チロシン残基が関与するプロトン付与が起きにくくなっていると思われる。また、チロシン残基の動きを制限することによって、アルデヒド合成反応が起きる可能性があった。しかしながら、Rugosin G でモルガン菌 HDC を阻害してもアルデヒド合成反応は触媒されず、またモルガン菌 HDC のチロシン変異体ではアルデヒド合成反応も阻害された。このことから、Rugosin G がアレルギー様食中毒の予防に有用であることが示唆された。

ヒスタミンが関与するアレルギー様食中毒は、ヒスタミン生成菌により生成されたヒスタミンが食品中に蓄積することが原因だが、たとえ、ヒスタミン生成菌を殺菌できたとしても、食品中に HDC が残存していれば、ヒスタミンが生成される。よって、食品中に HDC 阻害物質を添加しておけば、食品中へのヒスタミン蓄積を抑制できると考えられる。過去の報告で、バラ科植物のメドウスイート熱水抽出液には、Rugosin A や Rugosin D、Tellimagrandin II などのエラジタンニンが含まれ、モルガン菌 HDC 活性を阻害することが報告されている[43]。さらにサバ肉を 2%メドウスイート熱水抽出液に浸漬させると、リン酸緩衝食塩水に浸漬させたコントロール群に比べて、ヒスタミン蓄積が有意に減少することを確認している[43, 44]。また、約 20 μM の Rugosin G を含むローズペタルの 2%熱水抽出液では、ヒト由来 HDC 活性を阻害することを確認している(no shown data)。したがって、Rugosin G を含むローズペタル熱水抽出液は、メドウスイート熱水抽出液と同様に、モルガン菌 HDC 活性も阻害することが期待される。また、既存添加物名簿にバラを含む香辛料抽出物が収録されていることから、Rugosin G を含むローズペタル熱水抽出液を、ヒスタミン様食中毒の予防を目的とした食品添加物として応用できると期待する。

謝辞

本論文は、岡山県立大学大学院 保健福祉科学研究科 保健福祉科学専攻 博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたもので、多くの方々にご協力いただきました。

特に、岡山県立大学 保健福祉科学部 教授 伊東秀之先生、お茶の水女子大学 基幹研究院 准教授 新田陽子先生には、指導教員として、大変お世話になりました。

伊東秀之先生には、本研究の遂行および本論文の執筆においてご尽力いただき、深く感謝いたします。新田陽子先生には、本研究の実施の機会を与えて頂き、その遂行及び本論文執筆に至るまで終始、熱心にご指導を頂きました。龍谷大学 農学学部 教授 植野洋志先生、香川大学 教育学部 小森博文先生には、共同研究者として、本研究の遂行において、多くのご助言を頂きました。博士前期課程 森彩夏さんには、質量分析による化合物同定でお力添えいただきました。

また、社会人学生として、温かく迎え入れて頂きました栄養学科の先生方、学生の皆様にも、感謝申し上げます。

参考文献

- [1] S.J. Galli, M. Tsai, A.M. Piliponsky, The development of allergic inflammation, *Nature* 454 (7203) (2008) 445–454.
- [2] K. Andersson, D. Chen, H. Mattsson, F. Sundler, R. Hakanson, Physiological significance of ECL-cell histamine, *Yale J. Biol. Med.* 71 (3–4) (1998) 183–193.
- [3] S. Nuutinen, P. Panula, Histamine in neurotransmission and brain diseases, *Adv. Exp. Med. Biol.* 709 (2010) 95–107.
- [4] Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. 2014. Public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products. Meeting report. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- [5] 谷内和彦, 櫻井映子, 岡村信行, 倉増敦朗 抗ヒスタミン薬の薬理学 日耳鼻 112 (2009) 99-103
- [6] E. Sandmeier, T.I. Hale, P. Christen. Multiple evolutionary origin of pyridoxal-5'-phosphate-dependent amino acid decarboxylases. *Eur. J. Biochem.* 221 (1994) 997-1002
- [7] H. Komori, Y. Nitta, H. Ueno, Y. Higuchi, Structural study reveals that Ser-354 determines substrate specificity on human histidine decarboxylase, *J. Biol. Chem.* 287 (34) (2012) 29175–29183.
- [8] J. Nishino, H. Hayashi, S. Ishii, H. Kagamiyama. An anomalous side reaction of the Lys303 mutant aromatic L-amino acid decarboxylase unravels the role of the residue in catalysis. *J. Biochem.* 121(3) (1997) 604-611
- [9] M. Bertoldi, C.B. Voltattorni. Reaction of dopa decarboxylase with L-aromatic amino acids under aerobic and anaerobic conditions. *J. Biochem.* 352 (2000) 533-538
- [10] M. Bertoldi, C.B. Voltattorni. Dopa decarboxylase exhibits low pH half-transaminase and high pH oxidative deaminase activities toward serotonin (5-hydroxytryptamine) *Protein Sci.* 10(6) (2001) 1178-1186
- [11] M. Bertoldi, M. Gonsalvi, R. Contestabile, C.B. Voltattorni, Mutation of tyrosine 332 to phenylalanine converts dopa decarboxylase into a decarboxylationdependent oxidative deaminase, *J. Biol. Chem.* 277 (39) (2002) 36357–36362.
- [12] Y. Nitta, J. Ohshita, H. Liu, Y. Kuronuma, H. Ueno, Expression of recombinant human histidine decarboxylase with full length and C-terminal truncated forms in yeast and bacterial cells, *J. Biol. Macromol.* 10 (2010) 73–82.

- [13] H. Komori, Y. Nitta, H. Ueno, Y. Higuchi, Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of human histidine decarboxylase, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 68 (Pt 6) (2012) 675–677.
- [14] Y. Nitta, F. Yasukata, N. Kitamoto, M. Ito, M. Sakaue, H. Kikuzaki, H. Ueno, Inhibition of *Morganella morganii* histidine decarboxylase activity and histamine accumulation in mackerel muscle derived from filipendula ulumaria extracts, *J. Food Protect.* 79 (3) (2016) 463–467.
- [15] E. Ohmori, T. Fukui, N. Imanishi, K. Yatsunami, A. Ichikawa, Purification and characterization of l-histidine decarboxylase from mouse mastocytoma P-815- cells, *J. Biochem.* 107 (6) (1990) 834–839.
- [16] W. Ambroziak, R. Pietruszko, Human aldehyde dehydrogenase: metabolism of putrescine and histamine, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 11 (6) (1987) 528–532.
- [17] W. Ambroziak, R. Pietruszko, Human aldehyde dehydrogenase. Activity with aldehyde metabolites of monoamines, diamines, and polyamines, *J. Biol. Chem.* 266 (20) (1991) 13011–13018.
- [18] B.M. Guirard, E.E. Snell, Purification and properties of pyridoxal-5'-phosphatedependent histidine decarboxylases from *Klebsiella planticola* and *Enterobacter aerogenes*, *J. Bacteriol.* 169 (9) (1987) 3963–3968.
- [19] S. Tanase, B.M. Guirard, E.E. Snell, Purification and properties of a pyridoxal 5'-phosphate-dependent histidine decarboxylase from *Morganella morganii* AM-15, *J. Biol. Chem.* 260 (11) (1985) 6738–6746.
- [20] P. Burkhard, P. Dominici, C. Borri-Voltattorni, J.N. Jansonius, V.N. Malashkevich, Structural insight into Parkinson's disease treatment from drug-inhibited DOPA decarboxylase, *Nat. Struct. Biol.* 8 (11) (2001) 963–967.
- [21] H.S. Fernandes, M.J. Ramos, N. Cerqueira, The catalytic mechanism of the pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme, histidine decarboxylase: a computational study, *Chem. Eur J.* 23 (38) (2017) 9162–9173.
- [22] E. Sandmeier, T.I. Hale, P. Christen, Multiple evolutionary origin of pyridoxal-5'-phosphate-dependent amino acid decarboxylases, *Eur. J. Biochem.* 221 (3) (1994) 997–1002.
- [23] K. Yamauchi, R. Sato, Y. Tanno, Y. Ohkawara, K. Maeyama, T. Watanabe, K. Satoh, M. Yoshizawa, S. Shibahara, T. Takishima, Nucleotide sequence of the cDNA encoding L-histidine decarboxylase derived from human basophilic leukemia cell line, KU-812-F,

Nucleic Acids Res. 18 (19) (1990) 5891.

[24] G.L. Vaaler, M.A. Brasch, E.E. Snell, Pyridoxal 5'-phosphate-dependent histidine decarboxylase. Nucleotide sequence of the HDC gene and the corresponding amino acid sequence, *J. Biol. Chem.* 261 (24) (1986) 11010–11014.

[25] H. Ichinose, Y. Kurosawa, K. Titani, K. Fujita, T. Nagatsu, Isolation and characterization of a cDNA clone encoding human aromatic L-amino acid decarboxylase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164 (3) (1989) 1024–1030.

[26] D.F. Bu, A.J. Tobin, The exon-intron organization of the genes (GAD1 and GAD2) encoding two human glutamate decarboxylases (GAD67 and GAD65) suggests that they derive from a common ancestral GAD, *Genomics* 21 (1) (1994) 222–228.

[27] T. Lehmann, S. Pollmann, Gene expression and characterization of a stress-induced tyrosine decarboxylase from *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett.* 583 (12) (2009) 1895–1900.

[28] M.P. Torrens-Spence, M. Lazear, R. von Guggenberg, H. Ding, J. Li, Investigation of a substrate-specifying residue within *Papaver somniferum* and *Catharanthus roseus* aromatic amino acid decarboxylases, *Phytochemistry* 106 (2014) 37–43.

[29] M.P. Torrens-Spence, P. Liu, H. Ding, K. Harich, G. Gillaspay, J. Li, Biochemical evaluation of the decarboxylation and decarboxylation-deamination activities of plant aromatic amino acid decarboxylases, *J. Biol. Chem.* 288 (4) (2013) 2376–2387.

[30] M.P. Torrens-Spence, R. von Guggenberg, M. Lazear, H. Ding, J. Li, Diverse functional evolution of serine decarboxylases: identification of two novel acetaldehyde synthases that uses hydrophobic amino acids as substrates, *BMC Plant Biol.* 14 (2014) 247.

[31] Y. Kaminaga, J. Schnepf, G. Peel, C.M. Kish, G. Ben-Nissan, D. Weiss, I. Orlova, O. Lavie, D. Rhodes, K. Wood, D.M. Porterfield, A.J. Cooper, J.V. Schloss, E. Pichersky, A. Vainstein, N. Dudareva, Plant phenylacetaldehyde synthase is a bifunctional homotetrameric enzyme that catalyzes phenylalanine decarboxylation and oxidation, *J. Biol. Chem.* 281 (33) (2006) 23357–23366.

[32] M. Wang, Q. Zhao, Q. Zhang, W. Liu, Differences in PLP-dependent cysteinyl processing lead to diverse S-functionalization of lincosamide antibiotics, *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016) 6348–6351.

[33] Y. Nitta, K. Ito, H. Ueno. Inhibitory activity of medicinal plants toward human histidine decarboxylase, *J. Home. Econ. Jpn.* 12 (2008) 1011-1016

- [34] Y. Nitta, H. Kikuzaki, T. Azuma, Y. Ye, M. Sakaue, Y. Higuchi, H. Komori, H. Ueno. Inhibitory activity of *Filipendula ulmaria* constituents on recombinant human histidine decarboxylase, *Food. Chem.* 138 (2013) 1551–1556.
- [35] H. Kubota, H. Hayashi, T. Watanabe, Y. Taguchi, H. Wada. Mechanism of inactivation of mammalian L-histidine decarboxylase by (S)- α -fluoromethylhistidine, *Biochem. Pharmacol.* 33 (1984) 983–990.
- [36] C. Rodriguez-Caso, D. Rodriguez-Agudo, F. SanchezJimenez, M.A. Medina. Green tea epigallocatechin-3-gallate is an inhibitor of mammalian histidine decarboxylase, *Cell. Mol. Life. Sci.* 60 (2003) 1760–1763.
- [37] F. Wu, J. Yu, H. Gehring. Inhibitory and structural studies of novel coenzyme-substrate analogs of human histidine decarboxylase, *FASEB. J.* 22 (2008) 890–897.
- [38] T. Yoshida, M. Yoshimura, Y. Amakura. Chemical and biological significance of oenothien B and related ellagitannin oligomers with macrocyclic structure, *Molecules.* 23 (2018) E552.
- [39] H. Ito, P. Li, M. Koreishi, A. Nagatomo, N. Nishida, T. Yoshida. Ellagitannin oligomers and a neolignan from pomegranate arils and their inhibitory effects on the formation of advanced glycation end products, *Food. Chem.* 152 (2014) 323–330.
- [40] T. Hatano, N. Ogawa, T. Shingu, T. Okuda. Tannins of Rosaceous plants. IX. Rugosins D, E, F and G, dimeric and trimeric hydrolyzable tannins with valoneoyl group(s), from flower petals of *Rosa rugosa* thumb, *Chem. Pharm. Bull.* 38 (1990) 3341–3346.
- [41] Y. Nitta, H. Kikuzaki, H. Ueno. Food components inhibiting recombinant human histidine decarboxylase activity, *J. Agric. Food. Chem.* 55 (2007) 299–304.
- [42] M. Karonen, M. Oraviita, I. Mueller-Harvey, J.P. Salminen, R.J. Green. Binding of an oligomeric ellagitannin series to bovine serum albumin (BSA): analysis by isothermal titration calorimetry (ITC), *J. Agric. Food. Chem.* 63 (2015) 10647–10654.
- [43] Y. Nitta, F. Yasukata, N. Kitamoto, M. Ito, M. Sakaue, H. Kikuzaki, H. Ueno. Inhibition of *Morganella morganii* Histidine Decarboxylase Activity and Histamine Accumulation in Mackerel Muscle Derived from *Filipendula ulmaria* Extracts, *J. Food. Prot.* 79(3) (2016) 463-467.
- [44] 新田陽子, 菊崎泰枝. 薬用植物を使用したアレルギー様食中毒予防の研究, *アレルギーの臨床.* 40(14) (2020) 1199-1201.