

論 文 内 容 要 旨

題目 P219L substitution in human D-amino acid oxidase impacts the ligand binding and catalytic efficiency

(ヒト D-アミノ酸酸化酵素の P219L 置換が与えるリガンド結合と触媒効率に対する影響)

著者 Wanitcha Rachadech, Yusuke Kato, Rabab M. Abou El-Magd, Yuji Shishido, Soo Hyeon Kim, Hirofumi Sogabe, Nobuo Maita, Kazuko Yorita, Kiyoshi Fukui

令和 2 年 11 月 1 日発行 The Journal of Biochemistry 第 168 巻第 5 号
557 ページから 567 ページに発表済

内容要旨

ヒト D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) は、神経変性疾患の病態への関与が示唆されているフラビン酵素である。D-セリン (D-Ser) は、ヒト DAO の生理的基質として機能し、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体 (NMDAR) の神経調節因子としての役割を果たすことが知られている。したがって、NMDAR の機能不全は、DAO 活性によって制御される D-Ser 濃度の変化に関連している可能性がある。本研究は、DAO の構造と機能の詳細な解析を目的として行った。ブタの DAO とヒト DAO の一次構造を比較した結果、活性部位の蓋の位置 219 番目のアミノ酸に種間変異があることが明らかとなった。そこで、対応する位置のプロリン (ヒト型) をロイシン (ブタ型) に置換する (P219L) ことが、構造的・酵素的特性にどのような影響を与えるかを解析した。

まず、野生型および P219L 変異型 DAO プラスミドを保持する大腸菌を調製した。イソプロピル β-D-1-チオガラクトピラノシドを添加することにより、組換え野生型および P219L ヒト DAO の発現を誘導した。その後、熱処理 (53 °C、3 分間)、45%(w/v) 硫酸アンモニウム沈殿、および 2 種類のカラムクロマトグラフィー (DEAE Sepharose Fast Flow カラムおよび hydroxyapatite カラム) により、野生型または P219L ヒト DAO をそれぞれホロ形態で精製した。ヒト DAO 活性は、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) と基質となる D-アラニンを含むリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) 中で 25°C で測定した。DAO 活性の 1 単位は、1 分間に 1 マイクロモルの酸素を消費する酵素量と定義した。アポ DAO を調製するために、臭化カリウムを含む緩衝液に対してホ

様式(8)

ロ DAO を透析し、ホロおよびアポ酵素から再構成した P219L ヒト DAO の酵素化学的性質を解析し、野生型ヒト DAO と比較した。その後、Centriprep を用いて、Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) と阻害剤安息香酸を混合したホロ型の濃縮 P219L ヒト DAO を調製した。結晶化条件のスクリーニングは、ハンギングドロップ蒸気拡散法により行った。

その結果、野生型と比べて P219L のターンオーバー数 (k_{cat}) は変化しないが、 K_m 値は減少し、触媒効率 (k_{cat}/K_m) が上昇することがわかった。さらに、安息香酸は野生型 (1.2-2.0 mM) に比べて低い K_i 値 (0.7-0.9 mM) で阻害した。FAD と安息香酸とを含んだ複合体の結晶化 DAO は 2.25Å 分解能で解析され、P219L 置換により活性部位と蓋の両方に構造変化がもたらされる事が観察された。アルギニン 283 と安息香酸の水素結合形成原子間の距離、およびチロシン 224 と安息香酸の芳香環間の相対位置が変異型で変化した。さらに、P219L 複合体では、FAD のアデニン環の近くに酢酸が存在していることも明らかとなった。

これらの構造変化により、P219L の置換は触媒効率の向上と基質/阻害剤に対する結合親和性の向上をもたらすことがわかった。P219L 複合体中の酢酸分子の存在は、FAD の結合親和性に影響を与える可能性がある。本研究は、ヒト DAO の構造と機能の関係について新たな知見を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1483 号	氏名	Wanitcha Rachadech
審査委員	主査 富田 江一 副査 木戸 博 副査 松本 満		

題目 P219L substitution in human D-amino acid oxidase impacts the ligand binding and catalytic efficiency
(ヒト D-アミノ酸酸化酵素の P219L 置換が与えるリガンド結合と触媒効率に対する影響)

著者 Wanitcha Rachadech, Yusuke Kato, Rabab M. Abou El-Magd, Yuji Shishido, Soo Hyeon Kim, Hirofumi Sogabe, Nobuo Maita, Kazuko Yorita, Kiyoshi Fukui
令和 2 年 11 月 1 日発行 The Journal of Biochemistry 第 168 巻 第 5 号 557 ページから 567 ページに発表済
(主任教授 坂口末廣)

要旨 D-アミノ酸酸化酵素(D-amino acid oxidase, DAO)は脳や肝臓、腎臓で発現が報告されており、精神神経疾患治療のターゲットとして研究が行われている。申請者らは、先行研究よりヒトとブタのDAOでは補酵素Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) との親和性に差があり酵素反応特性に違いがあることから、両者の一次構造の比較より219番(ヒト;Pro、ブタ;Leu)にあるアミノ酸残基の差異が酵素反応に影響があるかについて解析を行っている。酵素反応速度論に基づく詳細なパラメーターの解析および結晶構造解析を行い、本酵素の構造と機能に関して考察を行った。

得られた結果は以下の如くである。

1. 申請者らは、基質や補酵素の取り込みに機能していると考え

- られる active side lid 領域に注目し、この領域内にアミノ酸置換導入 (P219L) を行った。大腸菌での発現系を用いて大量精製を行い、酵素化学的解析および結晶構造解析を行った。
2. 酵素活性測定は酸素電極法による測定を行なった。その結果、野生型酵素と比べて置換型では、ターンオーバー数 (k_{cat}) は変化しないが、 K_m 値は減少し、触媒効率 (k_{cat}/K_m) が上昇することを明らかにしている。この結果より DAO の酵素触媒効率が置換導入により向上したことを示した。
 3. 安息香酸による阻害定数の解析により野生型 (1.2-2.0 mM) に比べて置換型で低い K_i 値 (0.7-0.9 mM) を示すことを明らかにし、P219L置換が阻害剤に対する結合親和性の向上をもたらすことを示した。
 4. 2.25Å の分解能で行った結晶構造解析では、Arg283 と安息香酸の水素結合原子間距離、および Tyr224 と安息香酸の芳香環間の相対位置が置換型で変化する事を示した。
 5. さらに、FAD のアデニン環の近傍に酢酸が存在していることを新たに発見し、酢酸分子の存在が FAD の基質結合親和性に影響を与える可能性を考察している。

本研究は、新たなアミノ酸置換型酵素の作成により、DAO の酵素反応機構の分子レベルでの理解に貢献するとともに、結晶構造に基づいた分析結果により、酵素反応阻害剤の新たな開発による創薬への展開に構造的基盤を提供し、本酵素の病態生理学的意義の解明に資する知見であり、学位授与に値すると判定した。