

ヒスタミンとドーパミン生成酵素の変遷

新田 陽子¹，小森 博文²，植野 洋志³

生理活性アミンとして知られるヒスタミンとドーパミンはそれぞれ，ピリドキサル5'-リン酸を補酵素とするヒスチジン脱炭酸酵素（HDC），芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AroDC）の触媒作用により生成する．HDC, AroDCともに基質特異性が高く，HDCによるドーパミン生成およびAroDCによるヒスタミン生成の触媒作用はどちらもきわめて低い．ヒスチジンメチルエステルとヒト由来C末端欠損HDC（活性型とされる）との複合体，CarbiDOPA（カルビドーパ）とブタ由来AroDCとの複合体のX線結晶構造解析結果を比較すると，活性中心部位ではアミノ酸1残基（それぞれS354とG354に相当）のみが両酵素間で異なっていた．その残基をセリンからグリシンに置換したHDCの変異体はヒスチジンよりもDOPAとの反応をより触媒するようになり，酵素機能がAroDCに近づくことが明らかとなった．脱炭酸反応とその後の生成物の放出に至るメカニズムはAroDCとHDCとで共通していると考えられた．

1. はじめに

高等動物において，ヒスタミンやドーパミン，セロトニン， γ -アミノ酪酸（GABA）などの生理活性アミンは，神経伝達物質として働いている他，さまざまな生理作用に関与することが知られている．これらの生理活性アミンは，ヒスチジン，DOPA（ドーパ），5-ヒドロキシトリプトファン，グルタミン酸といったアミノ酸から，ビタミンB₆誘導体であるピリドキサル5'-リン酸（PLP）を補酵素とするアミノ酸脱炭酸酵素の触媒作用により生成する．ヒスタミンはヒスチジン脱炭酸酵素（HDC），ドーパミン，セロトニンは芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AroDC），GABAはグルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）によってそれぞれ生成される．表1にHDC, AroDC, GADそれぞれの特徴を記した．3種類の酵素はいずれも高等動物のみならず，微生物

においても見いだされている．この場合脱炭酸反応は微生物が酸性にさらされたときに細胞内で蓄積するプロトン（H⁺）を中和する酸耐性機構における中核的な役割を果たすと考えられている．これらの酵素は，PLP依存型酵素の立体構造を七つに分類したときにフォールドタイプIに属し，さらに進化的な関係からアミノ酸脱炭酸酵素を四つに分類したときにグループIIに属する．すなわち，構造的にも進化の観点からもかなり共通点が多い．それに関わらず，これらの酵素は基質特異性が高いことが知られている．中でも，HDCとAroDCはヒトのアミノ酸配列で比較すると高い相同性（アミノ酸一致度は52%）がみられるが，HDCによるドーパミンやセロトニン生成の触媒作用およびAroDCによるヒスタミン生成の触媒作用はどちらもきわめて低い．HDCあるいはAroDC単独の研究は多くなされているが，両者を扱った研究はあまりなされてこなかった．最近の研究によってHDCのアミノ酸残基を一つ置換させることで基質特異性が変化し，ドーパミン生成の触媒作用が100倍以上高まることがわかった¹⁾．本稿ではその意義について考察する．

PLP依存型酵素（以下，PLP酵素）は，基質であるアミノ酸と Schiff塩基を介した複合体を形成し，その α 位では脱炭酸の他に，アミノ基転移，ラセミ化，逆アルドール縮合，そして， β 位もしくは γ 位では脱離反応，置換反応など多岐の反応を触媒する．PLP酵素のタンパク質部分は，触媒反応を促進する役割の他に，目的の反応以外の副反応

¹岡山県立大学保健福祉学部（〒719-1197 岡山県総社市窪木111）

²香川大学教育学部

³龍谷大学農学部

Relationship between histamine and dopamine synthesizing enzymes

Yoko Nitta¹, Hirofumi Komori² and Hiroshi Ueno³ (¹Okayama Prefectural University, 111 Kuboki, Soja-shi, Okayama 719-1197, Japan,

²Kagawa University, ³Ryukoku University)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870321

© 2015 公益社団法人日本生化学会

表1 哺乳類グループII脱炭酸酵素

	基質	生成物	アイソフォームの数	タンパク質サイズ (kDa)
ヒスチジン 脱炭酸酵素 (HDC)	ヒスチジン	ヒスタミン	1	~74
芳香族アミノ酸 脱炭酸酵素 (AroDC)	DOPA 5-ヒドロキシトリプトファン	ドーパミン セロトニン	1	~54
グルタミン酸 脱炭酸酵素 (GAD)	グルタミン酸	GABA	2	~65 ~67

を抑制する働きを担っていると考えられる。今回PLP酵素のHDC（活性型）としては初めてのX線結晶構造解析を行ったので（すでに*Lactobacillus* 30a由来HDCの結晶構造解析は行われているが、この酵素はピルビン酸を触媒中心とする）、構造から推察される反応機構についても考察する。

2. 活性型HDCの結晶構造解析に基づく基質特異性改変

1) C末端欠損HDCの結晶構造解析¹⁾

1992年にヒト好塩基球白血病細胞（KU-812-F細胞）からHDCのcDNAがクローニングされ、そのcDNAにより予測されたHDCのタンパク質の大きさは74kDaであった。ヒトHDCに先立って、1990年にラットHDCのcDNAがクローニングされたが、そのとき予測されたタンパク質の大きさは73kDaであった。その後さまざまな高等動物のゲノム情報から予測されたHDCのタンパク質群のアミノ酸配列を並べると、N末端側に相同性の高い配列が並び、C末端側に相同性の低い配列が並ぶ。たとえば、ヒトHDCのアミノ酸配列に類似した配列をBLASTで検索すると、ショウジョウバエHDCのアミノ酸配列とヒトHDCの477残基までのN末端側が相同領域として示される。ヒトHDCの1~477残基までと、ショウジョウバエHDCとの一致度は62%であるのに対し、C末端側185残基の一致度は19%である。また、AroDCとGADの配列を比較すると、これもN末端側の477残基に共通の領域（コアドメイン）を持っている²⁾。3種類の酵素では、AroDCの全長配列（コアドメインに相当）が最も短く、コアドメインに対してC末端に約180残基付加しているのがHDCであり、N末端側に約100残基付加しているのがGADである。ヒトHDCの477残基までのペプチドは54kDaに相当する。ヒトHDCの全長型74kDaに相当するmRNAから翻訳されるタンパク質は前駆体であり、そのC末端はプロセッシングを受けて54kDaのペプチドに変換され、これが活性型HDCとして機能していると考えられている。この54kDaのサイズのHDCを組換え体タンパク質として大腸菌内で発現させ、大量精製を試みた。

精製したHDCをSDS-PAGEで調べると、還元剤なしでは単量体のHDC由来と思われるメインバンドが50kDa付

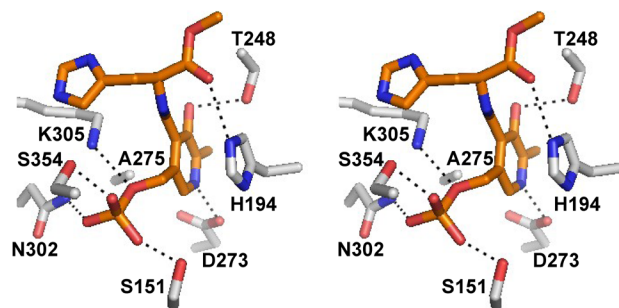


図1 PLPとHMEの複合体のステレオ図

近に現れた他、150kDaより大きなサイズのバンドが現れた。還元剤共存下では高分子量のサイズのバンドが消失したため、ジスルフィド結合による多量体が生じていると考えられた。179と417残基目のシステインをセリンに置換した変異体を作製し、精製したものをSDS-PAGEで調べると、還元剤なしでの高分子量のサイズのバンドはみられず、単量体のサイズのバンドのみが現れた。この二つの変異の導入が多量体化を抑制し、均一な試料を作製するのに有効であったため、この変異体ヒトHDCについて大量精製を行うこととした。なお、PLP酵素に特徴的な吸収スペクトルや酵素活性において、変異の導入によって大きな変化はみられなかった。精製した組換え体C179SC417SヒトHDC (hHDC) について、基質アナログであるヒスチジンメチルエステル (HME) との共存下で結晶が得られたため²⁾、X線結晶構造解析を行った。

hHDCの結晶構造はホモ二量体として得られ、PLPのピリジン環は275残基目のアラニン (A275) のメチル基と、H194のイミダゾール環にはさまれている形をとっていた (図1)。D273とT248はPLPピリジン環の窒素原子およびフェノール性ヒドロキシ基の酸素原子と相互作用していると思われた。PLPのリン酸基はS151、N302、S354と水素結合による相互作用が、リン酸基の負の電荷はリン酸基の近くに位置しているヘリックス $\alpha 5$ の双極子との相互作用が考えられた。HMEのイミダゾール環はPLP-HME複合体のピリジン-イミンで作る π 電子平面に対して*si*面に向いており、イミダゾール環のN_δとN_εはそれぞれY81の主鎖のアミノ基と水分子との間で水素結合している位置にみられた (図2)。イミダゾール環は、この二つの水素結合を除いて、疎水残基 (W72, Y80, L102, F104) に囲まれていた。

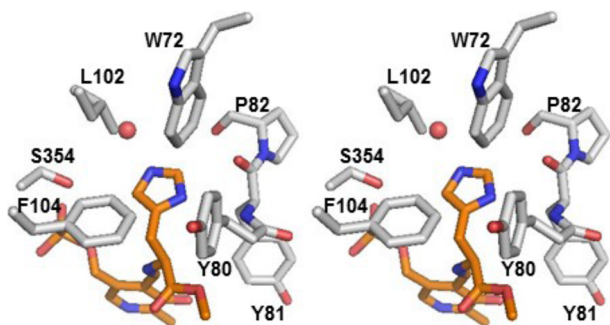


図2 hHDC内の基質結合部位

HMEのカルボキシ基の酸素原子と水素結合できる位置にH194がみられた。HMEのカルボキシ基は π 電子平面に対して垂直方向にみられ、Dunathan仮説では、PLPの平面に垂直に位置する結合が切断されるとされており、その仮説に従えばヒスチジンが活性中心でPLPと複合体結合した後、PLPの平面に対して垂直の向きに配位しているカルボキシ基が切断されて脱炭酸反応がなされると考えられる。

アスパラギン酸アミノ基転移酵素に代表されるフォールドタイプIでは、PLPの si 面が活性中心部位すなわチロシン残基のある側を向き、 re 面が溶媒にさらされる側を向いていることが共通している³⁾。hHDCについても例に違わずPLPの si 面が活性中心のリシン残基がある側を向いていた。アミノ基転移酵素では α 位の反応はプロトンの引き抜きから始まり、それは si 面で行われることが共通してみられる。反応の際には酵素の構造がclosed conformationとなり、基質が溶媒（水分子）にさらされるのを抑制することで、 re 面からのプロトン付与によるラセミ化の副反応を防ぐようになっている⁴⁾。フォールドタイプIに属する脱炭酸酵素の*Lactobacillus* 30a由来オルニチン脱炭酸酵素（ODC）についても、カルボキシ基は si 面を向いているとされる⁵⁾。一方ブタ由来AroDCとドーパミン脱炭酸酵素阻害薬CarbiDOPA（カルビドーパ）との複合体のX線結晶構造解析では、PLPと結合したCarbiDOPAのカルボキシ基は re 面を向いており⁶⁾、今回のhHDCとHMEとの複合体においても、PLPと結合したHMEのカルボキシメチル基は re 面を向いていた。N末端が約100残基欠損したヒト由来GAD67もGABAとの複合体でX線結晶構造が解析されており、その解析から予測される脱炭酸される前のカルボキシ基も re 面を向いている形で報告された⁷⁾。マウス由来ODCは、フォールドタイプIIIに属するPLP酵素で、そのX線結晶構造は活性中心部位のPLPの re 面がリシン残基側に向いており、 si 面が溶媒にさらされるという、フォールドタイプIとは逆の向きであったが、このときの基質のカルボキシ基は si 面、すなわち溶媒にさらされる側に向いていると解析された⁵⁾。脱炭酸反応において、 α 位の反応の面に規則性があるかどうかまだ明確ではないが、グループII脱炭酸酵素については、後述するように共通して保存されているチロシン残基が存在し、そのヒドロキシ基が脱炭酸後にプロトンをもつ炭素に付与するという説が唱えら

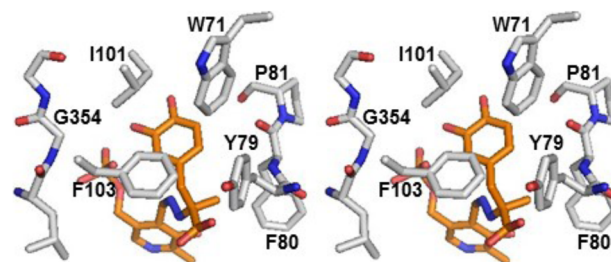


図3 AroDC内の基質結合部位

れている^{7,8)}。このチロシン残基が作用するには、 α 位の反応は re 面で生じる方が効率が良い。しかし、たとえプロトンの付与が re 面で行われるとしても、脱炭酸が si 面で行われる可能性を否定するわけではない。

AroDCは基質アナログのCarbiDOPAとの複合体の形ですでに構造解析されているので、基質結合部位についてAroDCとhHDCの比較を行った（図3）。活性部位の構造は類似していたが、354残基目の部分については違いがみられ、hHDCではセリン、AroDCではグリシンであった。この残基の影響を調べるために変異体を作製し、その酵素特性を調べることにした。

2) 変異体S354GhHDCの特性

hHDCの354残基目のセリンをグリシンに置換した変異体S354GhHDCについて、精製した試料のSDS-PAGEではhHDCと同様に約50kDaのバンドのみが確認できた。また、吸収スペクトルについてもhHDCと同様にPLP酵素に特徴的なピーク（335nmと425nm付近）を確認した。酵素活性についてはhHDCに比べて、ヒスチジンに対する親和性が著しく低下し、 K_m 値が10倍以上大きくなった。L-DOPA（L-ドーパ）との反応を調べると、ドーパミンの生成がLC/MS/MSで確認できた。hHDCではドーパミンの生成は微量であり（ヒスタミン生成の約200分の1、表2）、また検出感度の問題もあり K_m 値や k_{cat} 値を得るために必要な量の酵素を準備できなかったが、S354GhHDCについてはドーパミンの生成量が多くなったので（hHDCの100倍以上、表2）、 K_m 値（0.13mM）、 k_{cat} 値（1.3s⁻¹）を得た（表2）。これらの値は、報告されているヒトAroDC（ K_m : 0.11mM, k_{cat} : 7.6s⁻¹）やブタAroDC（ K_m : 0.07mM, k_{cat} : 4.3s⁻¹）、ラットAroDC（ K_m : 0.086mM, k_{cat} : 5.0s⁻¹）の K_m 値、 k_{cat} 値と似た値となった。S354GhHDCのL-DOPAについての k_{cat}/K_m 値は9.9s⁻¹・mM⁻¹であり、ヒスチジンについての k_{cat}/K_m 値の1.4s⁻¹・mM⁻¹と比べると約7倍大きい値であったことから、L-DOPAに対する特異性の方がヒスチジンよりも高いといえる。このことから、酵素の機能という点で、hHDCの活性部位を形成するアミノ酸の一つである354残基目のセリンをグリシンに置換するだけで、本来のHDCよりもAroDCに近くなることがわかった。

3) ループ領域の解析

結晶構造解析からhHDCの330～340残基はループ構造

表2 活性型 HDC と S354G 変異体のヒスチジンと DOPA に対する酵素活性

	酵素活性 ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$)
ヒスチジン				
活性型 HDC	1880 ± 150	0.10 ± 0.01	1.73 ± 0.07	17.3 ± 1.9
S354G 変異体	620 ± 10	1.45 ± 0.21	2.01 ± 0.04	1.4 ± 0.2
L-DOPA				
活性型 HDC	10 ± 1	n.d.	n.d.	n.d.
S354G 変異体	1160 ± 20	0.13 ± 0.00	1.29 ± 0.01	9.9 ± 0.1

n.d.: not detected.

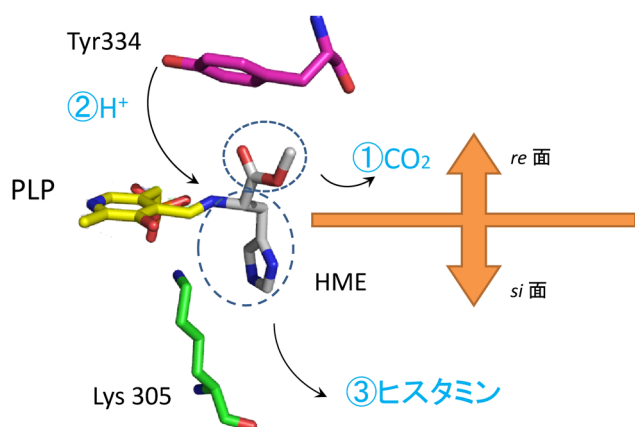


図4 HDCの反応機構の仮説

であり、二量体のもう一方の活性中心部位に向かって突き出した格好にみえる。ループ領域のアミノ酸残基は活性中心部位のPLPとの結合や、基質を取り込む入口に関与していると考えられた。Y334はループ領域内の残基で、フェニルアラニンに置換した変異体Y334FhHDCは、酵素活性が著しく低下し、ヒスチジンからのヒスタミンの生成を確認することができなかった。335nmと425nm付近の吸収はPLPと活性中心部位のリシン残基とのシッフ塩基の形成を示唆するもので、Y334FhHDCではその吸収がみられるが、活性中心部位のリシンをグリシンに置換した変異体K305GhHDCは330~430nmの領域で吸収がみられない。K305GhHDCも酵素活性が低いため、ヒスタミンの生成を確認することができなかった。すなわち、ヒスタミン生成においてY334はK305に匹敵するほど重要な残基であることがわかった。ループ領域の役割については、AroDC、GADについても調べられており^{7,8)}、これらの酵素間でおおむね同じ役目を果たしていると思われる。また、これらの酵素でHDCのY334に相当する残基が保存されている。チロシン残基は、これらの酵素内で基質が脱炭酸された後に、ヒドロキシ基を介して活性中心部位から生成物が放出される際のプロトンの供与に関与しているとの解釈がなされているが(図4)、AroDCではループ領域の結晶構造が解析されていないことや^{5,6)}、GADについてはhHDCと同様に結晶構造におけるチロシン残基の位置が α 位の炭素

原子にプロトンを与えられる位置に存在すること、フェニルアラニンに置換した変異体がGABAを生成しないことが示されている段階であることから⁷⁾、今後さらなる検討が必要である。ブタ由来AroDCでは、対象のチロシン(Y332)をフェニルアラニンに置換した変異体の組換え体タンパク質はドーパミンやセロトニンを生成せず、嫌気下で脱炭酸依存型アミノ基転移の副反応が生じることが示されており⁸⁾、GADについても脱炭酸依存型アミノ基転移の副反応が知られている⁹⁾。この副反応に際して、活性中心部位のリシン残基がプロトンに付与することでケチミンが生じ、 α -ケト酸とピリドキサミン5'-リン酸となりアポ酵素が生じる、と解釈されている⁴⁾。今後hHDCについても副反応について研究を進めることで、反応機構がさらに明らかになると思われる。

3. 動物のAroDCとHDCの系統樹

hHDCの結晶構造解析と変異体の解析から、hHDCの基質が入るポケットについて、その空間を形成している一つのセリンをグリシンに置換することで、ヒスチジンよりもL-DOPAを基質として取り込みやすくなったという結果は、セリンの場合には空間がイミダゾールの五員環に適するようになっており、セリンの側鎖がなくなることによってベンゼン環の六員環に適するようになったと考えられる。今回の解析からは、基質認識に直接関与する残基はみられず、基質の認識にはその基質に適した空間ができていのかどうかが必要であるという結論に達したが、今後さまざまな基質アナログを用いた結晶構造解析や、基質がない状態での構造の解析をすることによって別の解釈が得られるかもしれない。今回の結果からは、HDCにおける354番目のセリンが基質特異性を左右する重要な残基であり、さらにその置換によってHDCからAroDCへと酵素の機能を変化させることを示した。ヒスタミンやドーパミンは神経伝達物質であり、ゲノム解析などからデータベースに掲載されている神経を有する動物のAroDCとHDCの系統樹を作製してみると図5のようになる。この図からは進化の流れはAroDCからHDCの流れであると推察される。進化の過程で、変異によってアミノ酸残基の置換が生じて、あ

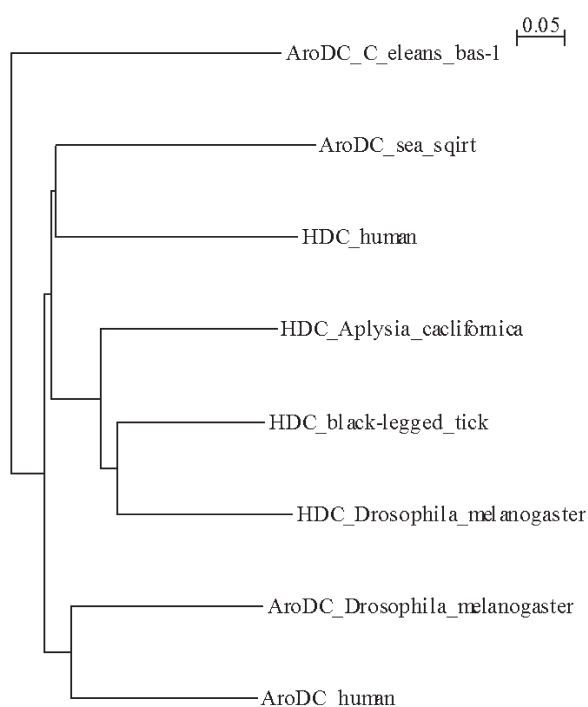


図5 AroDCとHDCの系統樹 (ClustalWを使用)

るときにAroDCからHDCが生じたのかもしれない。

4. おわりに

HDCのS354の塩基配列はagcであり、一塩基置換でggcとなればGに変化する。現在Nなど他のアミノ酸に変化したときの基質特異性などを調べている。一塩基多型としてS354の変異は報告されておらず、今回活性型HDCとするため切除したC末端側に位置するE644の一塩基多型が

アレルギー性鼻炎のリスクを高めるという報告がある¹⁰⁾。今後はAroDCとの相違点という観点からも、C末端を欠損させない全長型HDCについての構造および機能解析が必要であると考えている。

謝辞

研究を進めるにあたり、適切な環境を提供してくださいました、兵庫県立大学の樋口芳樹先生に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Komori, H., Nitta, Y., Ueno, H., & Higuchi, Y. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 29175–29183.
- 2) Komori, H., Nitta, Y., Ueno, H., & Higuchi, Y. (2012) *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **F68**, 675–677.
- 3) 林秀行, 鏡山博行 (1989) タンパク質核酸酵素, **34**, 1893–1903.
- 4) Eliot, A.C. & Kirsch, J.F. (2004) *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 383–415.
- 5) Kern, A.D., Oliveira, M.A., Coffino, P., & Hackert, M.L. (1999) *Structure*, **7**, 567–581.
- 6) Burkhard, P., Dominici, P., Borri-Voltattorni, C., Jansonius, J.N., & Malashkevich, V.N. (2001) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **8**, 963–967.
- 7) Bertordi, M., Gonsalvi, M., Contestabile, R., & Voltattorni, C.B. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 36357–36362.
- 8) Fenalti, G., Law, R.H., Buckle, A.M., Langendorf, C., Tuck, K., Rosado, C.J., Faux, N.G., Mahmood, K., Hampe, C.S., Banga, J.P., Wilce, M., Schmidberger, J., Rossjohn, J., El-Kabbani, O., Pike, R.N., Smith, A.I., Mackay, I.R., Rowley, M.J., & Whistock, J.C. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 280–286.
- 9) Porter, T.G., Spink, D.C., Martin, S.B., & Martin, D.L. (1985) *Biochem. J.*, **231**, 705–712.
- 10) Gervasini, G., Agúndez, J.A.G., García-Menaya, J., Martínez, C., Cordobés, C., Ayuso, P., Cornejo, J.A., Blanca, M., & García-Martín, E. (2010) *Allergy*, **65**, 1576–1584.