

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07272

研究課題名(和文) ヒスタミン合成酵素の分子機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of histidine decarboxylase

研究代表者

小森 博文 (Komori, Hirofumi)

香川大学・教育学部・准教授

研究者番号：30382261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：新規の基質類似阻害剤と酵素の複合体のX線回折データ処理を進め、結晶構造を決定した。これまでに解析されているヒスチジンメチルエステルと活性部位の比較検討を行い、構造の違いを確認した。その結果、基質認識機構と触媒ループ上に存在するチロシン(Y334)の重要性が明らかとなった。この重要なチロシン残基をフェニルアラニンに置換したY334F変異体について、野生型と同様に結晶化を行い、基質ヒスチジンをソーキングすることによって、脱炭酸反応の進んでいない反応中間体の構造を解析することに成功した。また、他のビタミンB6酵素と比較することによって、共通の役割をしていることも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒスタミンは多様な生理作用を有し、花粉症や皮膚炎といったアレルギー性疾患において重要な役割を担う生理活性物質である。ヒスタミンは、必須アミノ酸であるヒスチジンから一段階の脱炭酸反応で合成されるが、薬理上の重要な標的となるにもかかわらず、ヒスタミン合成に関する医薬は開発途上にあり、体内でヒスタミンを合成する唯一の酵素である分子の機能解明は進んでいない。本研究によって明らかにした阻害剤と酵素の複合体の構造と反応機構の解明などの重要な構造化学的基礎データを蓄積すれば、医薬品の開発だけでなく、生体内におけるヒスタミンの動態を明らかにするための基礎研究にも貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have processed the X-ray diffraction data and determined the crystal structure of human histidine decarboxylase (HDC) in complex with a novel inhibitor, aminoxy analog of histamine. By comparing it with the HDC complex with histidine methyl ester, we confirmed that the tyrosine (Y334) existing on the catalytic loop plays an important role in decarboxylation reaction. The Y334F mutant were crystallized under the same crystallization conditions used for wild type HDC-inhibitor complex. By soaking the substrate histidine into the crystal of Y334F mutant, the structure of the reaction intermediate has been determined. Furthermore, by comparing with the structures of vitamin B6 dependent enzymes, we suggest that the corresponding tyrosine residue of all decarboxylases has a common catalytic function.

研究分野：構造生物学

キーワード：ヒスタミン 脱炭酸酵素

1. 研究開始当初の背景

ヒスタミンは多様な生理作用を有し、花粉症や皮膚炎といったアレルギー性疾患において重要な役割を担う生理活性物質である。中でも花粉症の症状であるくしゃみ、鼻水や眼のかゆみにはヒスタミンの作用が大きく関与している。現在、ヒスタミンの働きを抑制することを目的に、主にヒスタミン受容体を標的として多くの抗ヒスタミン薬が開発されている。それらはすべてヒスタミン受容体の拮抗剤であり、その作用を抑制する事で、アレルギー症状を抑えている。従来開発されている抗ヒスタミン薬は、中枢神経のレセプターに作用することで眠気等の副作用を伴うという問題がある。従って、そのような副作用のない抗ヒスタミン薬の開発が期待されている。ヒスタミンは、必須アミノ酸であるヒスチジンから一段階の脱炭酸反応で合成されるが、薬理上の重要な標的となるにもかかわらず、ヒスタミン合成に関する医薬は開発途上にあり、体内でヒスタミンを合成する唯一の酵素である分子の機能解明は進んでいない。

ヒスタミン合成酵素は、同じモノアミン神経伝達物質であるドーパミンや アミノ酪酸 (GABA) を合成する酵素と同様にビタミン B6 を補酵素として含む脱炭酸酵素である。一次配列の相同性より、活性中心にはリジン残基が保存されており、補酵素のピリドキサルリン酸 (PLP) とシッフ塩基結合を形成する事で触媒作用に関与するとされている。これまでに、ドーパミン合成酵素 (参考文献 1) と GABA 合成酵素 (参考文献 2) の結晶構造が決定されており、基質認識の詳細も明らかにされている。ドーパミン合成酵素については、パーキンソン病の治療薬として既に利用されている阻害剤 (カルビドーパ) との複合体の詳細な解析も進められており、その結晶構造をもとにした新たな新薬開発も期待されている。しかし、ヒスタミン合成酵素については、長い間、立体構造に関する情報がなく、生化学的な解析も進んでいなかった。それは、ヒスタミン合成酵素の精製が極めて困難であることが主な原因であった。しかし、近年、我々は X 線結晶構造解析も可能な酵素の精製に成功し (参考文献 3,4) 現在、純度の高い精製酵素を利用した阻害剤の探索及び X 線結晶構造解析を進めている。

ヒスタミンそのものの合成量を減少させる薬剤は、アレルギー症状を緩和する全く新しいタイプの薬となる可能性があるが、現在知られている阻害活性物質は、*in vivo* で作用しないものや副作用が問題となっており、実用化に至っていない。生体内で唯一ヒスタミンを合成する酵素の働きを特異的に抑制できる阻害剤の開発には、詳細な立体構造情報と反応機構の解明は不可欠である。ヒスタミンはアレルギー反応でよく知られているが、同時に重要な神経伝達物質でもあり、脳の様々な機能に関わっていると考えられている。脳機能障害の 1 つトゥレット症候群 (Tourette's Syndrome) は、ヒスタミン合成酵素遺伝子の変異体が病気の原因の 1 つであることも明らかとなってきた (参考文献 5)。このように、ヒスタミンはアレルギー反応だけではなく、脳内の神経伝達物質として重要な役割を担っている。また、胃酸の分泌反応や平滑筋収縮、血管透過性亢進など、様々な生理機能にも関与している。ヒスタミン合成酵素の研究の進展は、アレルギー症状を改善する新薬の開発のほか、トゥレット症を含めた脳機能障害などの様々な病気の治療の新しい手がかりとなる。そのためにも生体内におけるヒスタミンの役割については今後も分子レベルでの研究が必要である。ヒスタミン合成酵素の阻害剤を開発することは、医薬品としての利用だけではなく、生体内におけるヒスタミンの動態を明らかにするための基礎研究にも重要である。新しいタイプの阻害剤の開発に成功すれば、酵素レベルの生化学的な解析の他に、将来的には細胞レベルでヒスタミンのはたらきを調べる研究も展開することが可能となる。

参考文献

1. "Structural insight into Parkinson's disease treatment from drug-inhibited DOPA decarboxylase" *Nat Struct Biol.* 8, 963-967 (2001)
2. "GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop" *Nat Struct Mol Biol.* 14, 280-286 (2007)
3. "Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of human histidine decarboxylase" H. Komori et al. *Acta Cryst. F.* 68, 675-677 (2012)
4. "Structural study reveals Ser345 determine substrate specificity on human histidine decarboxylase" H. Komori et al. *J. Biol. Chem.* 287,29175-29183 (2012)
5. "L-histidine decarboxylase and Tourette's syndrome" *N Engl J Med.* 362, 1901 (2010)

2. 研究の目的

本研究は、ヒスタミン合成酵素の立体構造を基に、医薬品としても応用可能な新規阻害剤を開発するために、X 線結晶構造解析法によってヒスタミン合成反応の分子機構を原子レベルで解明することを目的とする。ヒト由来酵素の活性に関わる重要な変異体や反応中間体、阻害候補化合物複合体の X 線結晶構造解析をおこなう他に、食中毒などの健康被害も報告されているヒスタミン産生菌の酵素についても構造解析を進めることによって、ヒスタミン合成酵素の働きを特異的に抑制する新規阻害剤開発の基盤となる構造化学的な研究を推し進める。

3. 研究の方法

本研究は、ヒスタミン合成酵素の立体構造を基に、医薬品としても応用可能な新規阻害剤を開発するために、主にX線結晶構造解析法によって新たに阻害剤の構造決定と脱炭酸反応機構の解明を行う。ヒト由来ヒスタミン合成酵素の他に、アレルギー様食中毒の原因となるヒスタミン産生菌 *Morganella morganii* (モルガン菌) 由来のヒスタミン合成酵素の精製にも成功しており、その結晶化及びX線結晶構造解析を行う。ヒト由来酵素とモルガン菌由来酵素の解析と比較を行い、分子機構を原子レベルで解明する

これまでヒト由来ヒスタミン合成酵素に関する生化学的な研究が進んでいなかった大きな要因は、解析に必要な純度の高い酵素の精製法が確立されていなかったことにある。ヒスタミン合成酵素には、他のモノアミン神経伝達物質合成酵素には保存されていないC末端領域(約180アミノ酸残基)が存在し、翻訳後にプロセッシングを受ける。全長の分子種は約74kDaであり、翻訳後プロセッシングにより分子種約54kDaとなる(参考文献6)。ヒスタミン合成酵素に二つの分子種74kDaと54kDaが存在することは、ドーパミンやGABAを合成する酵素とは異なる特徴であり、ヒスタミンが多様な生理活性作用を持つために必要な性質であると考えられる。どちらの分子種も活性があることから、二つの分子種の細胞内局在や活性制御における役割も注目されている。全長の分子種74kDaは不溶性となりやすく、翻訳後プロセッシング分子種54kDaは比較的安定ではあるが、時間とともに凝集する性質を持つ。これまでの研究の結果、我々はヒスタミン合成酵素の分子種54kDaの分子表面に変異を導入し、分子間相互作用を改良することで、凝集することなく均一で純度の高い酵素の精製に成功している。具体的には、精製を効率よく行うために、大腸菌による大量発現系を利用してN末端にグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)タンパク質をつけた組み換えタンパク質としてヒスタミン合成酵素を発現し、アフィニティークロマトグラフィー(グルタチオン)カラム、イオン交換クロマトグラフィーカラム、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いることによって、SDS-PAGE上で単一のバンドのレベルまで純度を上げる。補酵素ピリドキサルリン酸(PLP)の含有量についても紫外可視吸収スペクトルを測定することによりホロ酵素として十分な活性を持つことを確認する。遠心機を利用して、精製タンパク質を限外ろ過法によって濃縮し結晶化及び活性測定を試料として調整する。

このように精製した純度の高い酵素試料を利用して、阻害剤開発に重要な構造化学的基礎データを蓄積するために、次のテーマで研究をすすめる。

(1) 阻害剤複合体の構造決定

これまでには主に天然成分由来の阻害物質の探索を進めており、ハーブティーにも使われる薬草(メドウスイート)から抽出された成分の中からヒスタミン合成酵素を阻害する新たな化合物の同定にも成功している(参考文献7)。しかし、天然成分から抽出される阻害剤は化学構造が複雑であり、リード化合物として利用することは難しい。そのため、創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業の化合物ライブラリーを利用して、ヒスタミン合成酵素の阻害化合物のスクリーニングを行なっている。また、国内の化合物ライブラリーだけではなく、ヒスタミン合成酵素を阻害する可能性のある化合物を合成している海外のグループ(Prof. Sanchez at University of Malga)との共同研究を行い、ヒスタミン類似体(aminooxy analog)と酵素の複合体の解析を進めている。提供されたヒスタミン類似体(aminooxy analog)と複合体を調整する。酵素の複合体のPLPは、335nmと425nm付近に特徴的な吸収ピークを持ち、基質や阻害剤との反応過程の追跡も可能である。候補化合物による酵素の不活性化とPLPとの反応状態も紫外可視吸収スペクトルを測定することにより確認できる。候補化合物と酵素の複合体形成条件や結晶化条件を最適化し、X線結晶構造解析を行う。

(2) 脱炭酸反応機構の解明

これまでの研究の結果、ヒト由来ヒスタミン合成酵素の全体構造が明らかとなっているが、活性部位の出口近傍には触媒ループが配置しており、このはたらきが、脱炭酸反応においてもっとも重要であることが示唆されている。そこで、反応機構の解明もすすめる予定である。活性部位近傍の触媒ループの構造を決定することで、活性部位内部に直接作用する基質アナログだけではなく、間接的に脱炭酸反応を抑える効果のある化合物の設計も期待できると考えている。

既に、この触媒ループに変異を導入した酵素も作成しており、今後、X線結晶構造解析によって、その立体構造を決定し触媒ループのはたらきを明らかにする。さらに、この変異体と基質ヒスチジンを反応させることによって反応中間体の構造を解析することも可能である。X線回折強度データ測定は、大型放射光施設SPring-8のタンパク質専用ビームラインで行う。得られた回折パターンから指数付けを行い、結晶構造因子を算出し、電子密度図に変換する。これをもとにヒスタミン合成酵素の分子モデルを構築し、活性部位の精密化を進める。

(3) ヒスタミン産生菌由来ヒスタミン合成酵素の精製と結晶化

ヒスタミン産生菌由来ヒスタミン合成酵素はヒト由来のものとは相同性がなく、異なる分子構造を持つ可能性がある。ヒト由来の酵素と異なり、C末端に余分な配列を持たないため、全長の酵素を大量精製することにも成功している。具体的には、大腸菌による大量発現系を利用してN末端にヒスチジンタグをつけた組み換えタンパク質として大量発現し、アフィニティークロマトグラフィーカラム及びイオン交換クロマトグラフィーカラム、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いることによって、十分な量のホロ酵素の調整を行い、結晶化条件を検討する。

参考文献

6. "Comparative studies of human recombinant 74- and 54-kDa L-histidine decarboxylases " *J. Biol. Chem.* 270, 30813 (1995)
7. "Inhibitory activity of *Filipendula ulmaria* constituents on recombinant human histidine decarboxylase" Y.Nitta, H.Kikuzaki, T.Azuma, Y.Ye, M.Sakaue Y.Higuchi, H.Komori&H.Ueno *Food Chemistry* 138, 1551 (2013)

4. 研究成果

本研究は、ヒスタミン合成酵素(HDC)の立体構造を基に、医薬品としても応用可能な新規阻害剤を開発するために、X線結晶構造解析法によってヒスタミン合成反応の分子機構を原子レベルで解明することを目的としている。これまでにヒト由来HDCのX線結晶構造解析を行い、その阻害剤の1つであるヒスチジンメチルエステルを含む構造を明らかにしている。ヒト由来酵素の活性に関わる重要な変異体や阻害候補化合物複合体のX線結晶構造解析をおこなう他に、食中毒などの健康被害も報告されているヒスタミン産生菌の酵素についても構造解析を進めることによって、ヒスタミン合成酵素の働きを特異的に抑制する新規阻害剤開発の基盤となる構造化学的研究を推し進める。

(1) 阻害剤複合体の構造決定

薬等支援技術基板プラットフォーム事業の化合物ライブラリーを利用して、ヒスタミン合成酵素の阻害化合物のスクリーニングを行なっている。しかし、今のところ有効な新規の阻害剤候補は見つかっていない。

スペインのマラガ大学 Sanchez 教授から提供されたヒスタミン類似体(aminooxy analog)と酵素の複合体のX線回折データ処理を進め、分解能1.8 Åで分子構造の精密化に成功した。これまでに解析されている基質類似体阻害剤(ヒスチジンメチルエステル)と活性部位の比較検討を行い、構造の違いを確認した。その結果、基質認識機構と触媒ループ上に存在するチロシンの役割について明らかにすることができた(図1)。

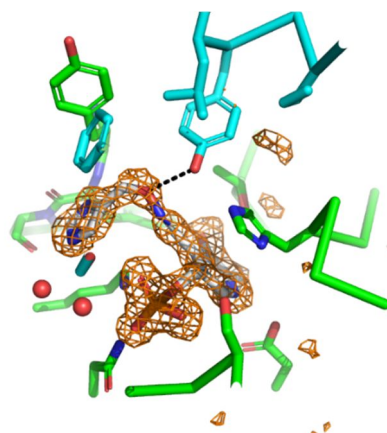


図1 ヒスタミン合成酵素とヒスタミン類似体(aminooxy analog)複合体の構造

このチロシンの役割について、他のビタミンB6酵素(アルデヒド合成酵素)との関係性が見つかり、結晶構造の比較検討を行い、触媒残基の役割について考察した。

2017年にヒト由来HDCの阻害剤として報告されたフラボノイドの一種であるpinocembinについて、これまでに解析されている競合阻害剤と構造の比較検討を行う目的で、結晶化を試みたが、X線回折実験に適する結晶は得られていない。

(2) 炭酸反応機構の解明

HDCと類似のビタミンB6酵素であるヒト由来ドーパミン合成酵素(AroDC)と活性部位を比較し、影響のあるアミノ酸残基を検討した。その結果、それぞれの活性部位に存在するセリン(S)354番(HDC)/グリシン(G)354番(AroDC)、セリン(S)304番(HDC)/ヒスチジン(H)302番(AroDC)

が基質アミノ酸の側鎖領域を認識するのに重要であると予想された。そこで、ドーパミン合成酵素の点変異体 G354S 及び二点変異体 G354S・H302S の活性測定及び構造解析にむけた試料調製をおこなった。これまでに、大腸菌の発現系を利用して大量発現を行い、Ni アフィニティークロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィーによって、純度の高い AroDC の野生型(WT) 及び変異体 G354S、G354S・H302S の得ることに成功した。精製した標品を利用して幅広いスクリーニングを行ったが、X線回折実験に適する結晶は得られていない。

他のビタミン B6 酵素(アルデヒド合成酵素)との関係性が見つかった触媒残基であるチロシンの役割について、その役割を明らかにするために Y334F 変異体の構造解析と活性測定を行った。Y334F 変異体について、野生型と同様に結晶化を行い、結晶状態のまま基質ヒスチジンを含む結晶化溶液に数十秒浸した後、100K の窒素気流中で急速冷却した。その状態で X線回折実験を行うことによって、脱炭酸反応の進んでいない反応中間体の構造を解析することに成功した(図2)

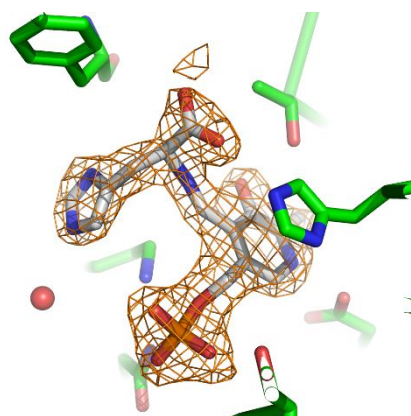


図2 . ヒスタミン合成酵素の反応中間体構造

活性測定の結果、ヒスタミンの代わりに、活性酸素を生成することが確認された。これは、脱炭酸後の反応中間体であるカルボアニオンにプロトンの代わりに、溶液中の酸素分子が反応していると考えられる。これは、他のビタミン B6 酵素(アルデヒド合成酵素)で報告されているように、ヒスタミン合成酵素でも、アミンの代わりにアルデヒドを合成することを示唆するものである。ヒト由来ヒスタミン合成酵素の X線構造解析で明らかとなった触媒残基のチロシンが、他のビタミン B6 酵素でも共通のはたらきをしていると予想される。

(3) ヒスタミン産生菌由来ヒスタミン合成酵素の精製と結晶化

食中毒などの健康被害も報告されているヒスタミン産生菌(モルガン菌)の酵素についても構造化学的な知見を与えるために、結晶化を進めてきた。野生型タンパク質に加えて会合状態に影響のあるシステイン残基をセリン残基に置換した変異体組換えタンパク質の精製した標品を利用して市販の結晶化キットを用いて結晶化スクリーニングを続けているが、X線回折実験に適する結晶は得られていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西田理央、松村 瑤子、Francisca Sanchez Jimenez、新田陽子、小森 博文
2. 発表標題 ヒスタミン合成酵素とヒスタミンアナログ阻害剤の構造解析
3. 学会等名 蛋白質科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹島大貴、小森博文、植野洋志、新田陽子
2. 発表標題 ヒスタミン合成酵素変異体の過酸化水素生成
3. 学会等名 生物高分子学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西田理央、松村 瑤子、Francisca Sanchez Jimenez、新田陽子、小森 博文
2. 発表標題 ヒスタミン合成酵素とヒスタミンアナログ阻害剤の結晶構造
3. 学会等名 結晶学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西田 理央、松村 瑤子、Francisca Jimenez、新田 陽子、小森 博文
2. 発表標題 アミノオキシメチルイミダゾールによるヒスタミン合成酵素の阻害機構
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松村 瑤子、西田 理央、Francisca Jimenez、新田 陽子、小森 博文
2. 発表標題 ヒスタミン合成酵素とヒスタミンアナログ阻害剤の構造解析
3. 学会等名 生物高分子学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森美幸、菊崎泰枝、植野洋志、小森博文、新田陽子
2. 発表標題 カロタンニン、エラジタンニンによるヒスチジン脱炭酸酵素の活性阻害の解析
3. 学会等名 日本ビタミン学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 森美幸、菊崎泰枝、宇野雄一、野口祐司、小森博文、植野洋志、新田陽子
2. 発表標題 イチゴ品種“桃薫”のヒスチジン脱炭酸酵素の活性阻害
3. 学会等名 日本生物高分子学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----