

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11137

研究課題名(和文) フェニルアラニン脱炭酸反応におけるPDXDC1の役割の解明

研究課題名(英文) Roles of PDXDC1 in the decarboxylation of phenylalanine.

研究代表者

鈴木 良雄 (Suzuki, Yoshio)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：30612395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：人の組織に広く発現し、脱炭酸酵素ドメインを持つPDXDC1の機能を調べた。ヒト胎児腎由来HEK293細胞のPDXDC1をsiRNAでノックダウンすると培地中のPheの減少が抑制されたことから、PDXDC1はPheの脱炭酸に関与していると考えられた。HEK293のPDXDC1をpET28ベクターにクローニングし、E. coliでの発現系を作成した。精製したPDXDC1は、全長でも脱炭酸酵素ドメインのみでも、Phe, Tyr, Trp, Hisに対する脱炭酸活性を確認できなかった。以上の結果から、PDXDC1の活性発現には補助因子や翻訳後修飾が必要である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内の遊離アミノ酸濃度にはそれぞれのアミノ酸に標準範囲があることが知られており、アミノ酸濃度のインバランスと体調や疾病との関連が注目されている。しかし、生体内でアミノ酸バランスの認識・生成のメカニズムにはまだ明らかになっていない。本研究では、Pheの細胞内濃度の維持に脱炭酸酵素ドメインをもつPDXDC1が関与していると考え、PDXDC1の活性を検討した。PDXDC1がPheの代謝に関与している可能性が示唆されたが、PDXDC1は単独では活性を示さず、また細胞内での活性は構成的ではなく誘導的であることが示唆された。本研究の結果は細胞内のアミノ酸濃度の維持に関する新たな知見である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the function of PDXDC1, which is widely expressed in human tissues and has a decarboxylase domain. Knockdown of PDXDC1 in the human fetal kidney-derived HEK293 cells by siRNA suppressed the reduction of Phe in the culture medium, suggesting that PDXDC1 is involved in the decarboxylation of Phe. We cloned PDXDC1 from HEK293 into pET28 vector and established an expression system in E. coli. The purified PDXDC1, both full-length and decarboxylase domain only, did not show any decarboxylation activity against Phe, Tyr, Trp, and His. These results suggest that auxiliary factors or post-translational modifications may be necessary for the expression of PDXDC1 activity.

研究分野：栄養学

キーワード：フェニルアラニン 脱炭酸 アミノ酸バランス HEK293 大腸菌発現系

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体内の遊離アミノ酸濃度にはそれぞれのアミノ酸に標準範囲(アミノ酸バランス)があることが知られており、アミノ酸濃度のインバランスと体調や疾病との関連が注目されている。一方、アミノ酸必要量を測定する指標アミノ酸酸化法(IAAO法)では必須アミノ酸バランスの不均衡に応答したフェニルアラニン(Phe)の脱炭酸を測定している。このように生体内でアミノ酸バランスが保たれていることは当然のことと考えられているが、アミノ酸バランスの認識・生成のメカニズムにはまだ明らかになっていない。

一方、ドーパ脱炭酸酵素(DDC)もPheの脱炭酸を行うことが知られているが、発現している組織が限られており、全身の細胞で細胞内のアミノ酸バランスに応じたPhe脱炭酸に関与しているとは考えられない。

一方、ヒトには脱炭素酵素ドメインを持つ機能未知のPDXDC1(pyridoxal-dependent decarboxylase domain containing 1, KIAA0251)が存在する。PDXDC1は人体で広く発現し、ヒト由来の細胞株のほぼ全てで発現が確認されている。標準配列(NP\_001272373.1)の全長は761 a.aで、145 - 367 a.a.に脱炭素酵素ドメインがあるが、他の部分の機能は明らかでない。そして細胞内では小胞体、ゴルジ体や細胞膜に結合した細胞小器官に存在している。しかし、その機能は明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

PDXDC1が、細胞内のアミノ酸インバランスに応じたPheの脱炭酸に関与しているとの仮説に基づき、PDXDC1とPhe脱炭酸との関係を検討することを目的とした。

これにより、アミノ酸バランス認識・生成機構を探るための糸口が得られると期待した。

### 3. 研究の方法

- (1) ヒト胎児腎由来株 HEK293 とヒト肝がん細胞株 Hep-G2 の PDXDC1 と DDC の発現を mRNA レベル (PCR)、タンパクレベル (Western blotting) で確認した。
- (2) HEK293 の PDXDC1 を siRNA によりノックダウンし、培地中の Phe の変化を確認した。
- (3) HEK293 の PDXDC1 (全長) を pET28 にクローニングし、クローニングした PDXDC1 から C 末端側の機能未知のドメインを除いた炭酸脱炭酸酵素ドメインのみ (PDXDC1\_ C) を作成した。
- (4) 上記の PDXDC1 の E.coli での発現系を作成した。
- (5) Phe の脱炭酸で精製するフェネチルアミン (PheNH<sub>2</sub>) を、水酸化アンモニウムを含む塩基性溶出液で分離し、UV 及び MS で検出できる条件を検討した。
- (6) チラミンオキシダーゼを用いて PheNH<sub>2</sub> を定量する系を検討した。
- (7) E.coli で発現させた PDXDC1 (全長 & C) を His-Tag を用いて精製し、Phe と反応させたときの PheNH<sub>2</sub> の生成を検討した。

### 4. 研究成果

- (1) ヒト胎児腎由来株 HEK293 とヒト肝がん細胞株 Hep-G2 の PDXDC1 と DDC の発現

HepG2 では PDXDC1 と DDC の両者が発現しているが HEK293 では PDXDC1 のみが発現していることを、mRNA およびタンパクレベルで確認した。

- (2) siRNA によるノックダウン

HEK293 の PDXDC1 を siRNA によりノックダウンすると培地中の Phe の減少が抑制されることを確認した。

- (3) E.coli で発現させた PDXDC1 (全長 & C) の活性

His-Tag により生成した PDXDC1 (全長 & C) の Phe に対する脱炭酸活性を、PheNH<sub>2</sub> をチラミンオキシダーゼで検出する系で確認したが、Phe の脱炭酸活性は確認されなかった。また基質を His、Trp、Tyr とした場合にも脱炭酸活性は確認されなかった。以上より、E.coli で発現させた PDXDC1 (全長 & C) は Phe, Tyr, Trp, His に対する脱炭酸活性性を有していないと考えられた。

#### (4) LC-MS による PheNH<sub>2</sub> の定量

PheNH<sub>2</sub> を直接定量できる LC-MS 条件を確立した。

この系を用いて、Hep-G2 lysate による Phe から PheNH<sub>2</sub> の生成を確認した結果、incubate 時間に応じた経時的な増加が確認された。

一方、HEK293 lysate では、そのような結果は観察されなかった。

HEK293 では siRNA により PDXDC1 をノックダウンすると培地中の Phe の分解が抑制されたことから、PDXDC1 が Phe の単車に参与する可能性が示唆された。

そこで、PDXDC1 が Phe 脱炭酸酵素であることを確認するため、HEK293 から全長の PDXDC1 mRNA を pET28 にクローニングし、E.coli での発現系を作成した。PDXDC1 は膜に存在するタンパクであるが、明確な膜貫通ドメインを有しないことから、他の因子と結合していることが予想される。C 末端の機能未知ドメインが活性を負に調節している可能性を考慮して、全長と併せて C 末端側を除外した脱炭酸高度ドメインのみ ( \_C) も作成した。しかし、E.coli で発現させた PDXDC1 (全長 & C) は Phe, Tyr, Trp, His に対する脱炭酸活性を示さなかった。

活性の発現には補助因子あるいは翻訳語修飾が必要である可能性が考えられた。そこで、LC-MS により PheNH<sub>2</sub> を定量する条件を確立し生細胞での機能を検討した。

PDXDC1 と DDC を共に発現している Hep-G2 の lysate では Phe から PheNH<sub>2</sub> への変換が観察されたが、PDXDC1 しか発現していない HEK293 の lysate では Phe から PheNH<sub>2</sub> への変換は観察されなかった。

HEK293 は、intact な状態では Phe の分解が生じるが、lysate では確認できなかったことから、Phe の分解は constitutive ではなく inducible である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------