

平成 30 年度
順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科 修士論文

Phe 脱炭酸と PDXDC1

学籍番号 4117025
氏名 鈴木 大輔
研究指導教員 鈴木 良雄

合格年月日 平成 31 年 2 月 18 日

論文審査員 主査 久保原 禪

副査 佐々木 啓

副査 鈴木 良雄

目次

第1章 緒言	1
第2章 先行研究	3
第1節 IAAO 法	3
第2節 Phe の脱炭酸	4
第3節 Decarboxylase	5
第4節 PDXDC1 に関する報告	6
第3章 研究目的	7
第4章 研究方法	8
第1節 細胞 homogenate の調整	8
第2節 タンパク濃度の定量	8
第3節 抗体を用いたタンパク発現の確認	8
第4節 Benzerazide がヒト細胞の Phe 脱炭酸活性に及ぼす影響	9
第5節 HPLC によるフェネチルアミンの分析	10
第6節 大腸菌発現系による PDXDC1 の作製	11
第7節 E. coli でのタンパク発現誘導、タンパク抽出	11
第8節 E. coli の PDXDC1 の発現の確認	12
第9節 PDXDC1 を発現した E. coli の Extract の Phe 脱炭酸活性	13
第5章 結果	14
第1節 ヒト細胞での PDXDC1、DDC のタンパク発現の確認	14
第2節 Benzerazide がヒト細胞の Phe 脱炭酸活性に及ぼす影響	14
第3節 E. coli の PDXDC1 の発現の確認	15
第4節 PDXDC1 を発現した E. coli Extract の脱炭酸活性	15
第6章 考察	17
第7章 結論	21
謝辞	22
引用文献	23
英文要約	28
図	30

第1章 緒言

ヒトの必須アミノ酸必要量の測定には、従来、窒素出納法が用いられてきた。窒素出納法は、被検者の長期管理の必要性、測定値の個人差が大きいなど多くの問題点が指摘されていた。そこで、窒素出納法に代わる新たな測定法として、指標アミノ酸酸化法(Indicator Amino Acid Oxidation; IAAO 法)が日本人の食事摂取基準(2015 年版)にて用いられている。

IAAO 法は、制限アミノ酸が存在した場合に、タンパク合成に利用されなかった必須アミノ酸が制限アミノ酸のレベルまで分解される反応を利用している。着目する必須アミノ酸の摂取量を変化させた時の ^{13}C 標識した指標アミノ酸の分解の程度を、呼気中の $^{13}\text{CO}_2$ 濃度により測定し充足状態を評価する。摂取量の増加に伴って減少する傾きが負の回帰直線と、充足した際に達成される傾きがゼロの回帰直線の交点から、着目する必須アミノ酸の必要量を決定する方法である。このときの指標アミノ酸にはフェニルアラニン(Phe)がよいとされている³⁶⁾。しかし、バラつきが大きく理論通りの回帰直線を得ることは困難であり、改善が求められている²³⁾。

Phe は、脱炭酸酵素により CO_2 とフェネチルアミンに分解されるが、ヒトの代謝経路 (KEGG pathway; <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)では、この反応は DOPA decarboxylase (DDC; EC4.1.1.28) もしくは Phenylalanine decarboxylase (PheDC; EC4.1.1.53)が触媒するとされている。しかし、ヒトを含む動物界では、PheDC は同定されていない。つまり PheDC の存在は示唆されているにも関わらず未同定である。一方、DDC の阻害剤を用いた *in vivo* の実験から、Phe の脱炭酸は DDC を阻害しても起こることが示されている¹⁰⁾。

また、安藤らの研究により、pyridoxal-dependent decarboxylase domain containing 1 (PDXDC1)がヒト PheDC であることが示唆されている⁴⁷⁾。安藤らの研究では PDXDC1 を発現し、DDC を発現していないヒト胎児腎細胞株 HEK293 細胞で、siRNA により

PDXDC1 をノックダウンすると Phe 脱炭酸が減少することを見出し、これにより PDXDC1 がヒトの PheDC である可能性が示唆された。しかし、安藤らの研究では、HEK293 細胞での DDC の発現の確認は Polymerase Chain Reaction (PCR)で行われており、DDC が脱炭酸に関与していることは完全に否定できない。DDC がタンパクレベルで発現していないことが確認されたうえで脱炭酸活性を測定する必要がある。

また、PDXDC1 は N 末端側の短い機能未知領域に次いで約 40 kDa の pyridoxal-5'-phosphate (PLP)依存性の脱炭酸酵素ドメイン、その後約 30 kDa の機能未知領域を有したタンパクである。Furuta らは、マウスの Histidine decarboxylase (HDC; EC:4.1.1.22) が、全長(74 kDa)では活性がなく、Caspase-9 により C 末端側の領域がプロセッシングを受けて活性化すると報告している²⁰⁾。同じように、PDXDC1 の C 末端側の機能未知領域が活性調節に関与している可能性がある。さらに、PDXDC1 は細胞内でゴルジ体に局在するという特徴を持つ。DDC は一次構造の大部分が脱炭酸酵素ドメインで占められており、細胞質に存在している。この細胞内局在の違いも C 末端側の配列が関与している可能性が考えられる。

したがって、Phe を指標アミノ酸とした IAAO 法では、Phe の脱炭酸のメカニズムの理解が重要である。本研究では PDXDC1 がヒト Phe 脱炭酸酵素であることを確認し、PDXDC1 の C 末端側の切断が酵素活性に及ぼす影響を検討することを目的とした。

第2章 先行研究

第1節 IAAO法

IAAO法は、体内の必須アミノ酸バランスに不均衡が生じたときに、充足されている指標アミノ酸を不足している必須アミノ酸(制限アミノ酸)のレベルにまで分解し不均衡を解消する反応を利用している。このとき指標アミノ酸は脱炭酸を受け、 $^{13}\text{CO}_2$ として呼気中に排泄される。体内で指標アミノ酸を充足させ、注目するアミノ酸の摂取量を段階的に変化させたときの呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ を測定し充足状態を評価する。注目するアミノ酸の摂取量が増えていくにつれ、指標アミノ酸はタンパク合成に利用されていくので、呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 排泄量は減少してゆき、注目するアミノ酸が必要量に達すると指標アミノ酸の分解も一定のレベルになる。 $^{13}\text{CO}_2$ 排泄が一定となった点が Break point とされ、そのときの注目するアミノ酸の量が必要量とされる。このときの指標アミノ酸は Phe が良いとされている³⁶⁾。

従来、必須アミノ酸の必要量測定には窒素出納法が用いられていたが、代謝適応のための厳格な食事管理や、尿や糞便の複数回の24時間採取など、倫理的に厳しいものであった。加えて、個人差が大きく、尿や糞便以外の体分泌物による損失の影響や、尿素代謝の適応まで数日かかるなど多くの課題点が議論されている^{34,33)}。一方でIAAO法では、被検者の長期管理、実験食への適応を必要とせず、より簡便で日常的な食生活に近い状態での測定が可能である¹⁴⁾。さらには、減量期、調整期、試合期といった代謝変動の激しいアスリートでの充足状態の確認が可能であり、個々のアスリートにあった食事計画を設定することができる^{3,28)}。そのため日本人の食事摂取基準(2015年版)の必須アミノ酸必要量の策定には、現在IAAO法で得られた値が用いられている。

また、IAAO法はたんぱく質必要量測定への適用も報告されている。現在、WHOによるたんぱく質の必要量の測定には、窒素出納法を用いており、成人で推奨量は 0.83 g/kg と定められている。これをIAAO法にて再評価すると、成人男性では 0.93 g/kg と報告され、窒素出納法で算出された値より49%高い²³⁾。さらに、成人女性では 0.91 g/kg ⁴¹⁾、高齢期女性で 0.85 g/kg ⁴⁰⁾、学童期では 1.03 g/kg ¹⁶⁾であるとされ、いずれも窒素出納法で定められた値よりそれぞれ40%、29%、71%高い。

このように、IAAO 法は必須アミノ酸必要量だけでなく、たんぱく質の必要量測定としても窒素出納法に代わる新たな測定法として注目されている。しかし、その一方で、IAAO 法で得られた結果の信頼性が議論されている³²⁾。先行研究では、個人間変動が大きいことが報告され^{15,37,43)}、理論通りの回帰直線を得ることが困難であることが示唆されている。従来法と比較し、より優れた反面で IAAO 法の改善が現在求められている。より変動の少ない正確な値を算出するために、IAAO 法で利用されている“アミノ酸インバランス”の認識機構を明らかにする必要がある。

第 2 節 Phe の脱炭酸

Phe の脱炭酸は DDC もしくは PheDC により触媒され、フェネチルアミンと CO₂ に分解される³⁸⁾。DDC は KEGG のデータベースにて hsa1644 と同定されている。また、L-DOPA からドーパミンへ、5-ヒドロキシトリプトファンからセロトニンへの脱炭酸反応を触媒する。このことから、神経伝達物質の産生に重要な役割を担っており、この DDC の欠損による先天性代謝異常の芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素欠損症が知られている²⁴⁾。このほかにも、DDC はチロシン(Tyr)、ヒスチジン(His)などの脱炭酸反応を触媒するなど、広い基質特異性を有する^{26,13,31)}。

その一方で、PheDC はヒトを含む動物界では同定されていない。植物では Phe を選択的に脱炭酸し、次いで phenylacetaldehyde まで酸化する酵素 phenylacetaldehyde synthase (PAAS)が確認されている²⁷⁾が、この酵素のオルソログは動物界では確認されていない。

以上のことから、動物界にて Phe の脱炭酸は DDC が行っていると考えられることができるが、ラットにて DDC を選択的に阻害する Benseraside を用いた研究から、Phe の脱炭酸は DDC を阻害しても起こることが示されている¹⁰⁾。つまり、これは PheDC の存在を意味する。

Phe の脱炭酸酵素については明確な知見が得られていないのが現状であり、第一節で述べた IAAO 法改善のためにはこの脱炭酸機構の理解が重要であると考えられる。

一方で、安藤らの研究により PDXDC1 というタンパクがヒト PheDC である可能性が示唆されている⁴⁷⁾。この PDXDC1 は具体的な機能の報告がない機能未知なタンパクである。

第3節 Decarboxylase

脱炭酸は有機化合物のもつカルボキシル基(-COOH)から二酸化炭素(CO₂)を生成する反応であり、アミノ酸の脱炭酸反応によりアミンが生成される。生体内にて、主にヒスタミンやドーパミン、セロトニン、γ-アミノ酪酸(GABA)などが生理活性アミンとしてホルモンや神経伝達物質など重要な役割を担っている。これらの生理活性アミンは、His、L-DOPA、トリプトファン、グルタミン酸(Glu)からアミノ酸脱炭酸酵素の触媒作用により生成される。His は HDC、L-DOPA は DDC、Glu は glutamic acid decarboxylase (GAD; EC 4.1.1.15) による脱炭酸を受け生理活性アミンが生成されるが、これらの触媒反応には補酵素として PLP が必要とされる¹⁷⁾。PLP 酵素は、アミノ酸代謝に関わる多様な反応に関与し、アミノ酸脱炭酸酵素をはじめ、トランスアミナーゼ、アミノ酸ラセマーゼなどが知られている。この PLP 酵素は立体構造の観点から 5 種(Fold type I ~V)に大別することができる¹⁷⁾。この中で Fold type I に属するものが最も多く、アミノ酸脱炭酸酵素は主に Fold type I に属している。HDC、DDC、GAD はそのドメインも高い相同性を有しており、実際に Fold type I のアミノ酸脱炭酸酵素でドメインをもとに 4 種に分類できるが、すべて同じグループ(Group II)に位置する³⁹⁾。

これらのアミノ酸脱炭酸酵素はドメイン内に PLP 依存性の脱炭酸酵素ドメインを持つ。DDC は全長 480 アミノ酸中の 35-414 残基に脱炭酸酵素ドメインを有する。そして、HDC は 662 アミノ酸から構成されるが、36-414 残基に脱炭酸酵素ドメインを有し、その後ろに約 180 残基が付加されている。一方で、GAD には GAD67 と GAD65 の 2 つのアイソフォームが存在する。GAD65 は 584 アミノ酸から構成され、N 末端側の 100 残基について 138-518 残基に脱炭酸酵素ドメインを有している。HDC では、Caspase-9 により C 末端側の約 180 残基が切断されることで酵素活性が上昇することが報告されている²⁰⁾。す

なわち、HDCのC末端側は脱炭酸酵素活性を阻害するドメインとして働いている可能性がある¹⁹⁾。また、GADの2種類のアイソフォームでは、N末端側100残基の有無にかかわらず活性が確認されているが⁹⁾、C末端側を切断することで酵素活性が上昇するとの報告がある⁵⁾。植物のGADにはC末端側にカルモジュリン結合部位が存在し、カルモジュリンによる酵素活性の調節機構が存在している⁴⁾。さらに、イネのGADにはカルモジュリン結合部位が存在するOsGAD1と存在しないOsGAD2の2種のアイソフォームがあり¹⁾、このうちOsGAD2もC末端領域を欠失することで活性が上昇することが示唆されている²⁾。つまり、OsGAD2のC末端領域はカルモジュリンに依存しないが酵素活性を調節している。

以上から、これらの脱炭酸酵素は脱炭酸酵素ドメイン以外の領域によって酵素活性が調節されていることがある。

第4節 PDXDC1に関する報告

PDXDC1は、788アミノ酸残基から構成される分子量87 kDaのタンパクで、30-397残基と426-483残基にPLP結合ドメインが含まれる。PDXDC1は、PLP酵素の立体構造に基づいた5種の分類上、Fold type Iに属し、さらにアミノ酸脱炭酸酵素のドメインをもとに4種に分類したときにHDCやDDC、GADと同じグループIIに分類されている。PDXDC1はヒトやマウスなどの高等生物だけでなく、ハエや線虫など広範囲の動物の細胞で発現している。

現在、PDXDC1はゲノムワイド解析から、血中のリン脂質・スフィンゴ脂質¹¹⁾、 ω -3系脂肪酸²⁹⁾、加齢に伴う脱毛²²⁾、メタボリックシンドローム³⁰⁾、さらには統合失調症¹⁸⁾などとの関連が示唆されている。しかし、具体的な機能に関する報告はない。

第3章 研究目的

PDXDC1 が Phe 脱炭酸酵素であることを確認する。そして、PDXDC1 の C 末端の機能未知ドメインの切断が酵素活性に及ぼす影響を検討する。

第4章 研究方法

第1節 細胞 homogenate の調整

ヒト胎児腎細胞由来の HEK293 細胞、ヒト肝癌由来の HepG2 細胞を組織培養用フラスコ(付着性細胞用) 25 cm²(3100-025; 旭硝子、東京)を用いて培養した。細胞培養培地は、D-MEM (Low Glucose)(041-29775; 富士フイルム和光純薬株式会社、大阪)に、10%量の Fetal Bovine Serum (S182H; Biowest、Nuaille、France)、1%量の Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (09367-34; ナカライテスク、京都)を加えたものを使用し、培養条件を 37 °C、5% CO₂として培養した。培養中、必要に応じて細胞培養培地の交換を行った。細胞がコンフルエントになるまで培養した後、培地を取り、5 ml の PBS でピペッティングを繰り返し、細胞を剥離させ回収した。回収した細胞をマイクロチューブホモジナイザー(BC-G10SET; バイオメディカルサイエンス、東京)を用いて破碎し、12,700 rpm (18,213×g)で 10 分遠心分離した。この遠心分離して得られた上清を細胞 homogenate とした。

第2節 タンパク濃度の定量

タンパク濃度の定量にはブラッドフォード法⁹⁾を用いた。測定に使用する試薬として、ブラッドフォード試薬は Bradford Reagent for 1-1, 400 µg/ml protein (B6916; SIGMA-ALDRICH、St. Louis、USA)、標準タンパクとして Protein standard-liquid, 2 mg protein/ml (P0834; SIGMA-ALDRICH、St. Louis、USA)を用いた。吸光度測定に Appliskan (SPECRRA 190、Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)を用いた。

第3節 抗体を用いたタンパク発現の確認

HEK293 細胞、HepG2 細胞での PDXDC1 と DDC の発現を Western blotting により確認した。ブラッドフォード法にてタンパク濃度を測定した Cell homogenate を 50 µg のタンパク量となるように採取した。この Cell homogenate に Cell homogenate と同量

のサンプルバッファークット [SDS-PAGE] (SP-3021; アプロサイエンス、徳島)を加え、95 °Cで5分間加熱した。加熱後のサンプルを SDS-PAGE (200 V、約 57 mA)にてタンパクを分離した。使用した試薬・装置は全てアプロサイエンス(徳島)のもので、ゲルはシヤープゲル[中性ゲル]10% (GEL02-10100)、泳動バッファークは泳動バッファーク(10×) [SDS-PAGE](SP-3010)、分子量マーカーは 3-color Prestained XL-Ladder (SP-2140)を用いた。

その後、Western blotting にてタンパク質の存在を検出した。PVDF 膜への転写には iBlot Dry Blotting System (IB1001; Life Technologies、Carlsbad、USA)を用い、メーカーのプロトコルに従って転写を行った。転写後の膜を TBS-T (B11-500; GBI Labs、Bothell、USA)にスキムミルク粉末(190-12865; 和光純薬工業、大阪)を5%になるように溶解した5%スキムミルク/TBS-T (10 ml) に浸漬して1時間室温にて振盪した。その後、TBS-T 10 ml で5分振盪の洗浄を3回行った。一次抗体反応として、5 mL の5%スキムミルク/TBS-T で 1/1000 に希釈した抗体に膜を浸漬し1時間室温にて振盪した。抗体は、PDXDC1 Polyclonal Antibody (SAB1410401-100UG; SIGMA、Saint Louis、USA)あるいは DOPA decarboxylase Polyclonal Antibody (10166-1-AP; Proteintech、Rosemont、USA)をそれぞれ用いた。反応後、TBS-T 10 ml で5分振盪の洗浄を3回行った。二次抗体反応として、5 mL の5%スキムミルク/TBS-T で 1/1000 に希釈した抗体に膜を浸漬し1時間室温にて振盪した。抗体は Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (7074S; Cell signaling Technology、東京)を用いた。その後、TBS-T (10 ml) で5分振盪の洗浄を3回行った。発色には XL-ECL for Western (BW-2030; アプロサイエンス、徳島)を用い、5分間室温にて incubate したのち ChemiDoc MP (Bio-Rad、Hercules、USA)を用いて発色したタンパクを検出した。

第4節 Benzerazide がヒト細胞の Phe 脱炭酸活性に及ぼす影響

細胞 homogenate と Phe を混合し、Phe の脱炭酸反応を検討した。補酵素として 1 mM PLP 40 μ l (終濃度 100 μ M)、細胞 homogenate を 600 μ g 量のタンパク量となるよ

うに加え、100 mM Phe 40 μ l (終濃度 10 mM)、DDC inhibitor として 100 μ M Benserazide を 40 μ l (終濃度 10 μ M)加えた。そして、反応液の全体量が 400 μ l となるように PBS で調整した。37 $^{\circ}$ C で 60 分間 incubate した後、98 $^{\circ}$ C、10 分で heat denature し酵素反応を停止させた。この反応液を 12,700 rpm (18,213 \times g)で 10 分の遠心分離を行い、上清を測定に用いた。

脱炭酸活性の測定は高速液体クロマトグラフィー(High Performance Liquid Chromatography; HPLC)を用いて、フェネチルアミンの生成を確認した。

第 5 節 HPLC によるフェネチルアミンの分析

フェネチルアミンを Gardner ら²⁰⁾の方法に従って *o*-phthalaldehyde (OPA)により誘導体化して測定した。誘導体化反応に用いた OPA 誘導体化試薬を以下のように調製した。0.05 g の OPA (P0280; 東京化成工業、東京)を 1 ml のエタノールに溶解し、50 μ l の 2-Mercaptoethanol (M0058; 東京化成工業、東京)を加え、vortex でよく混和し均一にした。この溶液 33 μ l と 1 ml の Buffer Solution pH 10.4 (NaHCO₃-NaOH)(B0193;東京化成工業、東京)を混和したものを OPA 誘導体化試薬として用いた。

第 4 章第 2 節にて得られた細胞 homogenate と Phe の反応混合液 50 μ l にメタノールを 50 μ l 添加し、除タンパクを行った。除タンパク後の反応液 100 μ l を採取し、100 μ l の OPA 誘導体化試薬を加え、vortex にてよく混和した。OPA 誘導体化試薬の添加後、約 3 分間室温に保ち、12,700 rpm (18,213 \times g)で 5 分間遠心分離を行った。遠心分離後の上清を HPLC 分析に供した。標準として 100 μ l の 1 mM フェネチルアミンに等量の OPA 誘導体化試薬 を加えたもの、100 μ l の 100 mM Phe に等量の OPA 誘導体化試薬を加えたもの、そして OPA 誘導体化試薬を用い、反応液中のフェネチルアミンのピークの同定を行った。

HPLC システムは全て JASCO 製のものを用いた。脱気装置は DG-2080-54、ミキサーは MX-2080-32、送液ポンプは PU-2086、カラムオーブンは CO-2065、紫外可視検出器は UV-2070、蛍光検出器は FP-2020 を用い、chrom NAV によりクロマトグラムを記録

した。また、カラムは PROMOSIL C18 PM951505-0 (5 μ 、4.1x150mm、Agela Technologies、Wilmington、USA)を用いた。

移動相 A として 0.01% トリクロロ酢酸(pH3.7)、移動相 B にメタノールに 0.01% のトリクロロ酢酸を溶解したものをを用いた。グラジエントプログラムは、①0-15 分:移動相 B を線型的に 95%まで漸増、②15-25 分:移動相 A を 5%、B を 95%で維持、③25-30 分:移動相 B を線型的に 60%まで漸減、と 3 段階のプログラムとした。

これを流速 1.0 ml/min で送液し、カラム温度を 40 $^{\circ}$ C、反応液の HPLC への注入量を 10 μ l とした。蛍光検出器の励起波長および蛍光波長はそれぞれ 340 nm 及び 455 nm に設定し検出を行った。

第 6 節 大腸菌発現系による PDXDC1 の作製

ベクターとして pET28a (カナマイシン耐性遺伝子有)に HEK293 細胞から増幅した PDXDC1 を連結したものをを用いた。このベクターは平成 27 年順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科修士課程修了生の安藤秀が作成したもので、HEK293 細胞から増幅した全長の PDXDC1 の cDNA の 5'側に NcoI、3'側に NotI 認識配列を付加し、pET-28a ベクターの Xho I -Not I に導入したものである。このベクターを BL21(DE3)の形質転換に使用した(Wild-type PDXDC1)。全長の cDNA を組み込んだプラスミドを用いて、C 末端部 608-788 アミノ酸残基を欠く変異体遺伝子を連結したベクターを作製し、BL21 (DE3)の形質転換を行った(Δ C PDXDC1)。ベクターの形質転換、欠失変異導入体の作成は株式会社 Bex (東京)にて行った。

第 7 節 E. coli でのタンパク発現誘導、タンパク抽出

100 ml の LB 培地にカナマイシン(50 mg/ml)を 40 μ l 添加し(終濃度 200 μ g/ml)、これに第 6 節より得られたそれぞれの E. coli の単一コロニーを添加し 37 $^{\circ}$ C で 4 時間振盪しながら培養した。その後、0.1 M の IPTG を 200 μ l (終濃度 200 μ M)添加し、室温で 16 時間振盪しながら培養した。その後、この培地を 50 ml 採取し、7,000 rpm (5800 \times g)で

10 分間遠心分離を行い、分離した上清の培地を除いた。沈殿した E. coli に PBS を 5 ml 加えよくピペッティングにて懸濁した後、超音波にて破碎した。7,000 rpm (5800×g) で 10 分遠心分離を行い、これを E. coli の Extract とした。得られた Extract の上清とペレットで PDXDC1 の発現を確認し、Phe の脱炭酸活性を検討した。

第 8 節 E. coli の PDXDC1 の発現の確認

タンパクの発現の確認は Western blotting により行った。ブラッドフォード法にて E. coli の Extract の上清およびペレットのタンパク濃度を測定した。各 Extract のタンパク量が 5 µg になるよう採取し、Extract と同量のサンプルバッファー(2×)(SP-3021; アプロサイエンス、徳島)を加え、95 °C で 5 分間加熱した。加熱後のサンプルを SDS-PAGE (200 V、約 57 mA)にてタンパクを分離した。使用した試薬・装置は全てアプロサイエンス(徳島)のもので、ゲルはシャープゲル[中性ゲル] 10% (GEL02-10100)、泳動バッファーは泳動バッファー(10×) [SDS-PAGE] (SP-3010)、分子量マーカーは 3-color Prestained XL-Ladder (SP-2140)を用いた。

その後、Western blotting でタンパクの存在を検出した。PVDF 膜への転写には iBlot Dry Blotting System (IB1001; Life Technologies、Carlsbad、USA)を用い、メーカーのプロトコルに従って転写を行った。転写後の膜を TBS-T (B11-500; GBI Labs、Bothell、USA)にスキムミルク粉末(190-12865; 和光純薬工業、大阪)を 5%になるように溶解した 5%スキムミルク/TBS-T (10 ml) に浸漬して 1 時間室温にて振盪した。その後、TBS-T (10 ml) で 5 分振盪の洗浄を 3 回行った。一次抗体反応として、5 mL の 5%スキムミルク/TBS-T で 1/1000 に希釈した抗体に膜を浸漬し 1 時間室温にて振盪した。1 次抗体には、PDXDC1 Polyclonal Antibody (HPA047369; Funakoshi、東京)を用いた。一次抗体との反応後、TBS-T (10ml) で 5 分振盪の洗浄を 3 回行った。二次抗体反応として、5 mL の 5%スキムミルク/TBS-T で 1/1000 に希釈した抗体に膜を浸漬し 1 時間室温にて振盪した。抗体は Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (7074S; Cell signaling Technology、東京)を用いた。その後、TBS-T 10 ml で 5 分振盪の洗浄を 3 回行った。発色には XL-ECL for Western (BW-2030; アプロサイエンス、徳島)を用い、5 分間室温にて incubate したのち ChemiDoc MP (Bio-Rad、Hercules、USA)を用いて発

色したタンパクを検出した。

第9節 PDXDC1を発現した E. coli の Extract の Phe 脱炭酸活性

第7節により得られた Extract の上清を Phe と混合し活性を検討した。Extract (600 μg タンパク量) に、40 μl の 1 mM PLP (終濃度 100 μM) に、40 μl の 100 mM Phe (終濃度 10 mM) を加え反応液の全体量が 400 μl となるように PBS で調整した。37 $^{\circ}\text{C}$ にて 60 分間 incubate した後、98 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分で heat denature し酵素反応を停止させた。これを 12,700 rpm (18,213 $\times g$) で 10 分遠心分離し、上清を測定に用いた。脱炭酸活性は、フェネチルアミンの生成を HPLC にて確認した。

第5章 結果

第1節 ヒト細胞での PDXDC1、DDC のタンパク発現の確認

HEK293、HepG2 細胞での PDXDC1 および DDC の発現を確認した結果、PDXDC1 から予想される約 87 kDa のバンドは HEK293 細胞と HepG2 細胞どちらも確認され (Fig. 2 a)、DDC から予想される約 54 kDa のバンドは HepG2 細胞のみに確認された (Fig. 2 b)。この結果から、以後のヒト細胞の脱炭酸活性の測定は、HEK293 細胞と HepG2 細胞を用いて行われた。

第2節 Benzerazide がヒト細胞の Phe 脱炭酸活性に及ぼす影響

細胞 homogenate と Phe の反応液に OPA 誘導体化処理を加え HPLC により分析したクロマトグラム、また、反応液中の成分のクロマトグラムを Fig. 3 A-G に示す。フェネチルアミン(1 mM)誘導体のピークは、リテンションタイム(RT) 10.633 分に観察され、面積は $5942195 \mu\text{V}\cdot\text{sec}$ であった (Fig. 3 A)。また、Phe と OPA 誘導体化試薬の反応混合液 (Fig. 3 B)、OPA 誘導体化試薬のみ (Fig. 3 C) のクロマトグラムでは 10~11 分の間にピークは観測されなかった。

HEK293 細胞の homogenate と Phe の反応混合液のクロマトグラムを Fig. 3 D に示す。反応により、RT 10.467 分 (面積 $19158 \mu\text{V}\cdot\text{sec}$) にピークが観測され、これをフェネチルアミンの誘導体と同定した。このときのフェネチルアミン生成量は 580.5 nmol/ml と算出され、 $1 \mu\text{g protein}$ あたりのフェネチルアミン生成量は 0.07 nmol であった。Benzerazide を添加した反応混合液では、10.588 分 (面積 $4993 \mu\text{V}\cdot\text{sec}$) にピークが観測され、これをフェネチルアミンの誘導体とした (Fig. 3 E)。このときのフェネチルアミン生成量は 151.3 nmol/ml と算出され、 $1 \mu\text{g protein}$ あたりのフェネチルアミン生成量は 0.02 nmol であった。以上から、HEK293 細胞の Phe 脱炭酸活性は Benzerazide により 26% に抑制された。

HepG2 細胞の homogenate と Phe の反応混合液のクロマトグラムを Fig. 3 F に示す。RT 10.508 分 (面積 $4293 \mu\text{V}\cdot\text{sec}$) にピークが観測され、これをフェネチルアミンの誘導体と同定した。このときのフェネチルアミン生成量は 333.7 nmol/ml と算出され、 $1 \mu\text{g protein}$ あたりのフェネチルアミンの生成量は 0.03 nmol であった。

Benzerazide を添加した HepG2 細胞 homogenate の反応混合液では、10.558 分 (面積 $4970 \mu\text{V}\cdot\text{sec}$) にピークが観測され、これをフェネチルアミンの誘導体とした (Fig. 3 G)。こ

のときのフェネチルアミン生成量は 150.6 nmol/ml と算出され、1 μ g protein あたりのフェネチルアミンの生成量は 0.01 nmol であった。

以上から、HepG2 細胞の Phe 脱炭酸活性は Benserazide により 45%に抑制された。

第 3 節 E. coli の PDXDC1 の発現の確認

E. coli にて発現した PDXDC1 を Western blotting により確認した(Fig. 4)。Wild-type PDXDC1 を発現した E. coli の Extract の上清とペレットで、PDXDC1 から予想される約 87 kDa のバンドが確認された。C 末端部 608-788 アミノ酸残基を欠く PDXDC1 を発現した E. coli の Extract の上清とペレットで、約 70 kDa の付近にバンドが確認された。Phe 脱炭酸活性の測定は、Extract の上清を用いて行われた。

第 4 節 PDXDC1 を発現した E. coli Extract の脱炭酸活性

PDXDC1 を発現した E. coli Extract と Phe の反応液に、OPA 誘導体化処理を加え HPLC により分析したときのクロマトグラム、また、反応液中の成分のクロマトグラムを Fig. 5 A-G に示す。フェネチルアミン(1 mM)誘導体のピークは、RT 10.633 分、面積 5942195 μ V \cdot sec であった(Fig. 5 A)。また、Phe と OPA 誘導体化試薬との反応混合液(Fig. 5 B)、OPA 誘導体化試薬のみ(Fig. 5 C)のクロマトグラムでは、10~11 分の間にピークは観測されなかった。

E. coli Extract と Phe の反応液に OPA 誘導体化処理を加えたときのクロマトグラムを Fig. 5 D-E に示した。Wild-type PDXDC1 を発現した E. coli の Extract の反応液では、RT 10.808 分(面積 22657 μ V \cdot sec)にピークが観測され、これをフェネチルアミンの誘導体と同一した(Fig. 5 D)。このときのフェネチルアミン生成量は 469.0 nmol/ml と算出され、1 μ g protein あたりのフェネチルアミンの生成量は 0.23 nmol であった。

△C PDXDC1 を発現した E. coli の Extract では、10.708 分(面積 65708 μ V \cdot sec)にピークが観測され、これをフェネチルアミンの誘導体とした(Fig. 5 E)。このときのフェネチルアミン生成量は 1360.2 nmol/ml と算出され、1 μ g protein あたりのフェネチルアミンの生成量は 0.66 nmol であった。これらの値を、Western blotting の Wild-type PDXDC1 のバンド強度で標準化すると、フェネチルアミンの生成量は 610.0 nmol/ml、1 μ g protein あたりのフェネチルアミンの生成量は 0.30 nmol と算出された。

したがって、E. coli Extract を用いた活性の測定では、PDXDC1 の C 末端側の切断に

より、脱炭酸活性は約 131%に上昇した。

第6章 考察

PDXDC1 の機能は依然として明らかとなっていない。PDXDC1 は DDC や HDC、GAD などに見られる PLP 依存性の脱炭酸酵素ドメインを有しており、脱炭酸酵素としての機能を持つことが予想される。

Phe の脱炭酸によって生じるフェネチルアミンは、覚せい剤として知られるアンフェタミンと類似した構造をしており、神経伝達物質としての役割をもち²⁵⁾、さらには統合失調症との関連性が示唆されている³⁵⁾。統合失調症の生理学的指標としてプレパルス・インヒビションの低下があり⁷⁾、マウスにて PDXDC1 をノックダウンすることによって、プレパルス・インヒビションが増加するとの報告から、PDXDC1 が Phe の脱炭酸に関与していることが考えられる¹⁸⁾。

DDC を発現せず PDXDC1 を発現するヒト HEK293 細胞にて、siRNA により PDXDC1 をノックダウンすると Phe 脱炭酸が抑制されることから、PDXDC1 がヒト PheDC であることが示唆されている⁴⁷⁾。しかし、HEK293 細胞での DDC の発現の確認はタンパクレベルでは行われていない。したがって HEK293 で DDC が脱炭酸に関与している可能性も完全には否定できない。本研究での Western blotting の結果から、HEK293 細胞にて DDC を発現しないことがタンパクレベルで確認され、PDXDC1 が Phe の脱炭酸に関与する事が明確となった (Fig. 2 a)。

David ら¹⁰⁾の in vivo の研究から、Phe の脱炭酸は Benserazide で DDC を阻害しても生じることが報告されている。本研究の Western blotting から、HepG2 細胞にて DDC と PDXDC1 のタンパクの発現が確認され、Phe と反応させるとフェネチルアミンの生成が確認された (Fig. 3F)。Benserazide の存在下でも Phe の脱炭酸活性は生じたことから、David ら¹⁰⁾が観察した Phe の脱炭酸を in vitro でも確認することができた (Fig. 3G)。一方で、DDC を発現せず PDXDC1 を発現する HEK293 細胞にて Phe の脱炭酸が観察された (Fig. 3D)。このことから、David らが観察した Phe の脱炭酸には PDXDC1 が関与していたと考えられるが、PDXDC1 も Benserazide の影響を受けることが示唆された (Fig. 3E)。

生体内でのフェネチルアミン濃度は極微量であり、主に Monoamine oxidase B (MAO-B) によって迅速に Phenylacetic acid に変換される⁴⁶⁾。フェネチルアミンの半減期は約 0.4 分であるとされている¹²⁾。RefEX (<http://refex.dbcls.jp/>)から、今回用いた HepG2 細胞で MAO-B の遺伝子発現が確認され、よって反応で生じたフェネチルアミンが phenylacetic acid へと分解されてしまっている可能性がある。また、Phe の脱炭酸には DDC もしくは PheDC によりフェネチルアミンとなる経路のほか、phenylpyruvate になった後に脱炭酸して phenylacetaldehyde となる経路もある^{27,45)}。ほかにも、Phe が脱炭酸せずに Tyr や trans-cinnamate へと変換される経路もあり^{8,44)}、代謝物をより網羅的に分析する必要がある。

PDXDC1 は脱炭酸酵素ドメインのほかに C 末端側に機能未知な配列が付加されている。先行研究にて、GAD、HDC は C 末端側の切断により酵素活性が上昇することが報告されており、C 末端側に脱炭酸活性を阻害するドメインを含んでいることが示唆されている^{19,2)}。GAD ではカルモジュリン結合ドメインに依存した活性調節のほか、イネやリンゴでは新たなタイプの GAD が同定され、この活性調節が議論されている。イネの GAD はアイソフォームの OsGAD1 では C 末端側にカルモジュリン結合部位を持つが OsGAD2 は持たず、C 末端を欠失させることで活性が上昇することから、カルモジュリン非依存性の活性調節を受けていることが示唆されている²⁾。また、リンゴの MdGAD3 もカルモジュリン結合部位を持たず、さらにはこの C 末端側は自己阻害ドメインとして機能しないことが報告されている⁴²⁾。

E. coli にて PDXDC1 を発現させ、この *E. coli* の Extract を Phe と反応させるとフェネチルアミンの生成が確認された(Fig. 5 D)。さらに、C 末端の 608-788 残基を欠いた PDXDC1 を発現した *E. coli* の Extract では、フェネチルアミンの生成は約 131%に増加した(Fig. 5 E)。*E. coli* では DDC と PheDC の存在は確認されていないことから、PDXDC1 はヒト Phe 脱炭酸酵素であり、PDXDC1 の C 末端側は酵素活性を抑制している可能性が示唆された。

PDXDC1 の C 末端側の配列は、Pfam (<https://pfam.xfam.org/>)や InterPro

(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)によっても特定の機能ドメインはなく、NCBI データベースの BLAST 検索(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)を使用し、PDXDC1 の 488-788 アミノ酸残基を検索しても、この配列と相同性のある配列を持つタンパクを確認できなかった。

HDC、DDC、PDXDC1、今回の *E. coli* により生成された PDXDC1 のアミノ酸シーケンスを比較すると (Fig. 4)、どのタンパクにも共通して PLP 依存性の脱炭酸酵素ドメインが存在するが、PDXDC1 には脱炭酸酵素ドメインの中に HDC や DDC には見られないシーケンスがいくつか insert されている。これらの insert が他のタンパクと相互作用し、酵素活性が上昇することも考えられる。insert されているシーケンスで BLAST 検索を行ったが、機能を推測することができなかった。そして、この各 insert のアミノ酸に膜貫通ドメインに見られる特有の疎水性アミノ酸クラスターはみられない。PDXDC1 と相互作用するタンパクを BioGRID (<https://thebiogrid.org/>) で検索したところ、54 個のタンパクがヒットした。このなかには、翻訳後修飾として糖鎖付加に関与する α -1,4-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼや、リソソームのマーカートの LAMP2、トランスポーターとして知られる SLC ファミリーに属するタンパクがいくつか見出された。Uniprot(<https://www.uniprot.org/>)では、ドメインの大部分が脱炭酸酵素ドメインで占められている DDC は細胞質に局在しているが、PDXDC1 はゴルジ体に局在するとされている。この局在の違いも C 末端側の機能未知領域、あるいは insert が関与していると考えられる。今後も引き続きこの機能未知領域や insert に焦点を当て、翻訳後修飾や補助因子の有無を検討する必要がある。

本研究では、*E. coli* で発現した PDXDC1 を精製せずに *E. coli* Extract として測定に使用していた。*E. coli* のゲノム上には DDC もしくは PheDC は存在していないが、*E. coli* の未知なる脱炭酸酵素の影響を否定できない。したがって、現在 BL21-AI の脱炭酸活性を測定中である。

現在、必須アミノ酸バランスの認識から Phe の脱炭酸に至るメカニズムはまったく明らかになっていない。Phe の脱炭酸の調節機構を明らかにすることで、IAAO 法のメカニ

ズムのみならず、アミノ酸バランスの生成・認識機構の解明にも寄与することができる。

第7章 結論

PDXDC1 はヒトの Phe 脱炭酸酵素であり、PDXDC1 の C 末端側の機能未知領域は酵素活性を抑制している可能性が示唆された。また DDC 阻害剤 Benzerazide は PDXDC1 も阻害する可能性が示唆された。

謝辞

本稿の執筆にあたり、多くの先生の方々にご指導、ご協力をいただきました。久保原禅先生、佐々木啓先生には実験に関しまして多くのご指導をいただきました。また、鈴木良雄先生には、実験及び、論文の作成に際し、多大なるご協力をいただきました。深く感謝を申し上げます。

引用文献

1. Akama K, Akihiro T, Kitagawa M, Takaiwa F. (2001). Rice (*Oryza sativa*) contains a novel isoform of glutamate decarboxylase that lacks an authentic calmodulin-binding domain at the C-terminus. *Biochim Biophys Acta*. 1522(3), pp. 143-150.
2. Akama K, Takaiwa F. (2007). C-terminal extension of rice glutamate decarboxylase (OsGAD2) functions as an autoinhibitory domain and overexpression of a truncated mutant results in the accumulation of extremely high levels of GABA in plant cells. *J Exp Bot*. 58(10), pp. 2699-2707.
3. Bandegan A, Courtney-Martin G, Rafii M, Pencharz PB, Lemon PW. (2017). Indicator Amino Acid-Derived Estimate of Dietary Protein Requirement for Male Bodybuilders on a Nontraining Day Is Several-Fold Greater than the Current Recommended Dietary Allowance. *J Nutr*. 147(5), pp. 850-857.
4. Baum G, Chen Y, Arazi T, Takatsuji H, Fromm H. (1993). A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain. Cloning, sequence, and functional analysis. *J Biol Chem*. 268(26), pp. 19610-19617.
5. Baum G, Lev-Yadun S, Fridmann Y, Arazi T, Katsnelson H, Zik M, Fromm H. (1996). Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. *EMBO J*. 15(12), pp. 2988-2996.
6. Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 7(72), pp. 248-254.
7. Braff DL, Geyer MA. (2015). Gating and habituation of the startle reflex in schizophrenic patients. (1992). *Arch Gen Psychiatry* 49(3), pp. 206-15.
8. Camm EL, Towers GHN. (1973). Phenylalanine ammonia lyase. *Phytochemistry*. 12(5), pp. 961-973.
9. Chu Wc, Metzler DE. (1994). Enzymatically active truncated cat brain glutamate decarboxylase: expression, purification, and absorption spectrum. *Arch Biochem Biophys*. 313(2), pp. 287-295.
10. David J, Wallace SU. (1974). On the importance of decarboxylation in the metabolism of phenylalanine, tyrosine, and tryptophan. *Arch Biochem Biophys*. 160(2), pp. 561-568.
11. Demirkan A, van Duijn CM, Ugocsai P, Isaacs A, Pramstaller PP, Liebisch G, Wilson JF, Johansson Å, Rudan I, Aulchenko YS, Kirichenko AV, Janssens AC, Jansen RC, Gnewuch C, Domingues FS, Pattaro C, Wild SH, Jonasson I, Polasek O,

- Zorkoltseva IV, Hofman A, Karssen LC, Struchalin M, Floyd J, Igl W, Biloglav Z, Broer L, Pfeufer A, Pichler I, Campbell S, Zaboli G, Kolcic I, Rivadeneira F, Huffman J, Hastie ND, Uitterlinden A, Franke L, Franklin CS, Vitart V, Nelson CP, Preuss M, Bis JC, O'Donnell CJ, Franceschini N, Witteman JC, Axenovich T, Oostra BA, Meitinger T, Hicks AA, Hayward C, Wright AF, Gyllenstein U, Campbell H, Schmitz G. (2012). Genome-wide association study identifies novel loci associated with circulating phospho- and sphingolipid concentrations. *PLoS Genetics*. 8(2), doi. 10.1371/journal.pgen.1002490.
12. Durden DA, Philips SR. (1980). Kinetic measurements of the turnover rates of phenylethylamine and tryptamine in vivo in the rat brain. *J Neurochem*. 34(6), pp. 1725-1732.
 13. Dyck LE, Yang CR, Boulton AA. (1983). The biosynthesis of p-tyramine, m-tyramine, and beta-phenylethylamine by rat striatal slices. *J Neurosci Res*. 10(2), pp. 211-220.
 14. Elango R. (2012). Recent advances in determining protein and amino acid requirements in humans. *Br J Nutr*. 108(2), pp. 22-30.
 15. Elango R, Humayun M a, Ball RO, Pencharz PB. (2007). Lysine requirement of healthy school-age children determined by the indicator amino acid oxidation method. *Am J Clin Nutr*. 86(2), pp. 360-365.
 16. Elango R, Humayun MA, Ball RO, Pencharz PB. (2011). Protein requirement of healthy school-age children determined by the indicator amino acid oxidation method. *Am J Clin Nutr*. 94(6), pp. 1545-1552.
 17. Eliot AC, Kirsch JF. (2004). Pyridoxal Phosphate Enzymes: Mechanistic, Structural, and Evolutionary Considerations. *Annu Rev Biochem*. 73(1), pp. 383-415.
 18. Feldcamp LA, Boutros PC, Raymond R, Fletcher PJ, Nobrega JN, Wong AHC. (2017). Pdxdc1 modulates prepulse inhibition of acoustic startle in the mouse. *Transl Psychiatry*. 7(5), doi. 10.1038/tp.2017.85.
 19. Fleming JV, Fajardo I, Langlois MR, Sánchez-Jiménez F, Wang TC. (2004). The C-terminus of rat L-histidine decarboxylase specifically inhibits enzymic activity and disrupts pyridoxal phosphate-dependent interactions with L-histidine substrate analogues. *Biochem J*. 381(3), pp.769-778.
 20. Furuta K, Nakayama K, Sugimoto Y, Ichikawa A, Tanaka S. (2007). Activation of histidine decarboxylase through post-translational cleavage by caspase-9 in a mouse mastocytoma P-815. *J Biol Chem*. 282(18), pp. 13438-13446.

21. Gardner, Miller. (1980). Reverse-phase liquid chromatographic analysis of amino acids after reaction with o-phthalaldehyde. *Anal Biochem.* 101(1), pp 61-65.
22. Haraksingh RR, Jahanbani F, Rodriguez-Paris J, Gelernter J, Nadeau KC, Oghalai JS, Schrijver I, Snyder MP. (2014). Exome sequencing and genome-wide copy number variant mapping reveal novel associations with sensorineural hereditary hearing loss. *BMC Genomics.* 15(1), doi. 10.1186/1471-2164-15-1155.
23. Humayun MA, Elango R, Ball RO, Pencharz PB. (2007). Reevaluation of the protein requirement in young men with the indicator amino acid oxidation technique. *Am J Clin Nutr.* 86(4), pp. 995-1002.
24. Hyland K, Clayton PT. (1990). Aromatic amino acid decarboxylase deficiency in twins. *J Inherit Metab Dis.* 13(3), pp. 301-304.
25. Irsfeld M, Spadafore M, Prüb BM. (2013). β -phenylethylamine, a small molecule with a large impact. *Webmedcentral.* 4(9), pp. 1-15.
26. Juorio A V, Greenshaw AJ, Wishart TB. (1988). Reciprocal changes in striatal dopamine and β -phenylethylamine induced by reserpine in the presence of monoamine oxidase inhibitors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 338(6), pp. 644-648.
27. Kaminaga Y, Schnepf J, Peel G, Kish CM, Ben-Nissan G, Weiss D, Orlova I, Lavie O, Rhodes D, Wood K, Porterfield DM, Cooper AJ, Schloss JV, Pichersky E, Vainstein A, Dudareva N. (2006). Plant phenylacetaldehyde synthase is a bifunctional homotetrameric enzyme that catalyzes phenylalanine decarboxylation and oxidation. *J Biol Chem.* 281(33), pp. 23357-23366.
28. Kato H, Nakano S, Inoue Y, Takeda T, Miura K, Nakamura T, Suzuki K, Bannai M. (2016). Greater Amino Acid Intake Is Required to Maximize Whole-Body Protein Synthesis Immediately after Endurance Exercise Than at Rest in Endurance-Trained Rats, as Determined by an Indicator Amino Acid Oxidation Method. *J Nutr.* 146(8), pp. 1546-1551.
29. Kettunen J, Tukiainen T, Sarin AP, Ortega-Alonso A, Tikkanen E, Lyttikäinen LP, Kangas AJ, Soininen P, Würtz P, Silander K, Dick DM, Rose RJ, Savolainen MJ, Viikari J, Kähönen M, Lehtimäki T, Pietiläinen KH, Inouye M, McCarthy MI, Jula A, Eriksson J, Raitakari OT, Salomaa V, Kaprio J, Järvelin MR, Peltonen L, Perola M, Freimer NB, Ala-Korpela M, Palotie A, Ripatti S. (2012). Genome-wide association study identifies multiple loci influencing human

- serum metabolite levels. *Nat Genet.* 44(3), pp. 269-276.
30. Kraja AT, Chasman DI, North KE, Reiner AP, Yanek LR, Kilpeläinen TO, Smith JA, Dehghan A, Dupuis J, Johnson AD, Feitosa MF, Tekola-Ayele F, Chu AY, Nolte IM, Dastani Z, Morris A, Pendergrass SA, Sun YV, Ritchie MD, Vaez A, Lin H, Ligthart S, Marullo L, Rohde R, Shao Y, Ziegler MA, Im HK, Schnabel RB, Jørgensen T, Jørgensen ME, Hansen T, Pedersen O, Stolk RP, Snieder H, Hofman A, Uitterlinden AG, Franco OH, Ikram MA, Richards JB, Rotimi C, Wilson JG, Lange L, Ganesh SK, Nalls M, Rasmussen-Torvik LJ, Pankow JS, Coresh J, Tang W, Linda Kao WH, Boerwinkle E, Morrison AC, Ridker PM, Becker DM, Rotter JI, Kardina SL, Loos RJ, Larson MG, Hsu YH, Province MA, Tracy R, Voight BF, Vaidya D, O'Donnell CJ, Benjamin EJ, Alizadeh BZ, Prokopenko I, Meigs JB, Borecki IB. (2014). Pleiotropic genes for metabolic syndrome and inflammation. *Mol Genet Metab.* 112(4), pp. 317-338.
 31. Lovenberg W, Weissbach H, Udenfriend S. (1962). Aromatic L-Amino Decarboxylase. *J Biol Chem.* 237(1), pp. 89-93
 32. Millward DJ. Identifying recommended dietary allowances for protein and amino acids: A critique of the 2007 WHO/FAO/UNU report. (2012). *Br J Nutr.* 108(SUPPL. 2), doi. 10.1017/S0007114512002450.
 33. Millward DJ. (1998). Metabolic Demands for Amino Acids and the Human Dietary Requirement: Millward and Rivers (1988) Revisited. *J Nutr.* 128(12), S. 2563-2576.
 34. Millward DJ, Roberts SB. Protein requirements of older individuals. (1996). *Nutr Res Rev.* 9(1), pp. 67-87.
 35. O'reilly RL, Davis BA. Phenylethylamine and schizophrenia. (1994). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 18(1), pp. 63-75.
 36. Pencharz PB, Ball RO. (2003). Different approaches to define individual amino acid requirements. *Annu Rev Nutr.* 23(1), pp. 101-116.
 37. Pillai RR, Elango R, Muthayya S, Ball RO, Kurpad AV, Pencharz PB. (2010). Lysine Requirement of Healthy, School-Aged Indian Children Determined by the Indicator Amino Acid Oxidation Technique. *J Nutr.* 140. 140(1), pp. 54-59.
 38. Saavedra JM. (1974). Enzymatic isotopic assay for and presence of beta-phenylethylamine in brain. *J Neurochem.* 22(2), pp. 211-216.
 39. Sandmeier E, Hale TI, Christen P. (1994). Multiple evolutionary origin of

- pyridoxal-5'-phosphate-dependent amino acid decarboxylases. *Eur J Biochem.* 221(3), pp. 997-1002.
40. Tang M, McCabe GP, Elango R, Pencharz PB, Ball RO, Campbell WW. (2014). Assessment of protein requirement in octogenarian women with use of the indicator amino acid oxidation technique. *Am J Clin Nutr.* 99(4), pp. 891-898.
 41. Tian Y, Liu J, Zhang Y, Piao J, Gou L, Tian Y, Li M, Ji Y, Yang X. (2011). Examination of chinese habitual dietary protein requirements of chinese young female adults by an indicator amino acid method. *Asia Pac J Clin Nutr.* 20(3), pp. 390-396.
 42. Trobacher CP, Zarei A, Liu J, Clark SM, Bozzo GG, Shelp BJ. (2013). Calmodulin-dependent and calmodulin-independent glutamate decarboxylases in apple fruit. *BMC Plant Biology.* 13(1), pp. 1-10.
 43. Turner JM, Humayun MA, Elango R, Rafii M, Langos V, Ball RO, Pencharz PB. (2006). Total sulfur amino acid requirement of healthy school-age children as determined by indicator amino acid oxidation technique. *Am J Clin Nutr.* 83(3), pp. 619-623.
 44. Udenfriend S, Cooper JR. (1952). The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J Biol Chem.* 194(2), pp. 503-511.
 45. Vuralhan Z, Morais MA, Tai SL, Piper MDW, Pronk JT. (2003). Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 69(8), 4534-4541.
 46. Yang H, Neff N. (1973). Beta-phenylethylamine: a specific substrate for type B monoamine oxidase of brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 187(2). pp. 365-371.
 47. 安藤秀 (2016). フェニルアラニンの脱炭酸酵素の探索 順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科修士論文, pp. 1-28.

英文要約

Phenylalanine decarboxylation and PDXDC1

Suzuki Daisuke

Background: Essential amino acid requirements have been assessed by indicator amino acid oxidation (IAAO) measuring the decarboxylation of an indicator amino acid. Preferably, the IAAO uses phenylalanine (Phe) as an indicator amino acid. However, the mechanism of the phenylalanine decarboxylation is not fully clarified. DOPA decarboxylase (DDC) and Phe decarboxylase (PheDC) are considered to decarboxylate Phe in *Homo sapiens*. However, PheDC is not identified in *Homo sapiens* nor the other animals. In contrast, an animal study suggested that Phe could be decarboxylated by enzymes other than DDC. Pyridoxal-dependent decarboxylase domain containing 1 (PDXDC1) is a putative decarboxylase having decarboxylase domain followed by a domain consisted of about 300 amino acid residues with unknown function. We found that PDXDC1 knockdown by siRNA decreased Phe decarboxylation in human HEK293 cells, expressing PDXDC1 but not DDC, leading to the possibility PDXDC1 is a human PheDC. Therefore, we aim to clarify the relevance of Phe decarboxylation and PDXDC1.

Methods: Expressions of PDXDC1 and DDC were determined by Western blotting in human HEK293 and HepG2 cells. The influence of benserazide, an inhibitor of DDC, on Phe decarboxylation in these cells was examined by incubating Phe, pyridoxal phosphate, and cell homogenate with or without benserazide. Phenethylamine assay was carried out by HPLC. PDXDC1 with or without the uncharacterized domain on C-terminus were constructed in pET28 plasmid and expressed in *E. coli* BL21(DE3). The expression was determined by Western blotting. Phe decarboxylation activity was determined using the *E. coli* extract expressing the PDXDC1s.

Results: HEK293 cells were confirmed to express PDXDC1 but not DDC, whereas HepG2 cells expressed both. Phe decarboxylation was inhibited to 26% and 45% in HEK293 and HepG2 cell

homogenates respectively, in the presence of benzerazide. Expression of PDXDC1 with or without the uncharacterized domain was determined by Western blotting. The Phe decarboxylation activities in the *E. coli* extracts expressing the PDXDC1s increased to 131% by truncating C-terminus.



```
hsa_23042      MDASLEKI ADPTLAEMGKNLKEAVKMLEDSQRRTEEENGKKLISGDI PGPLQG----- 53
c21-fixed-AA  MDASLEKI ADPTLAEMGKNLKEAVKMLEDSQRRTEEENGKKLISGDI PGPLQGSGQDMVS 60
*****

hsa_23042      -----RIQNI GEQGHMALLGHSLGAYISTLDKEKLRKLTTRILSD 93
c21-fixed-AA  I LQLVQNL MHGDEDEEPQSPRIQNI GEQGHMALLGHSLGAYISTLDKEKLRKLTTRILSD 120
*****

hsa_23042      TTLWL CRI FRYENGCA YFHEEEREGLAKI CRLAI HSRYEDFVVDGFNVLYNKKPVI YLSA 153
c21-fixed-AA  TTLWL CRI FRYENGCA YFHEEEREGLAKI CRLAI HSRYEDFVVDGFNVLYNKKPVI YLSA 180
*****

hsa_23042      AAR PGL GQYL CNQL GL PFPCL CRVPCNTVFGSQHQMDVAFLEKLI KDDI ERGRL PLLLVA 213
c21-fixed-AA  AAR PGL GQYL CNQL GL PFPCL CRVPCNTVFGSQHQMDVAFLEKLI KDDI ERGRL PLLLVA 240
*****

hsa_23042      NAGTAAVGHTDKI GRLKELCEQYGI WLHVEGVN L ATLALGYVSSSVLAAAKCDSMTMTPG 273
c21-fixed-AA  NAGTAAVGHTDKI GRLKELCEQYGI WLHVEGVN L ATLALGYVSSSVLAAAKCDSMTMTPG 300
*****

hsa_23042      PWLGL PAVPAVTLYKHDDPAL TLVAGLTSNKPTDKLRALPLWLSLQYGLDGFVERIKHA 333
c21-fixed-AA  PWLGL PAVPAVTLYKHDDPAL TLVAGLTSNKPTDKLRALPLWLSLQYGLDGFVERIKHA 360
*****
```

Fig. 1 Human PDXDC1 (hsa_23042) と E. coli により産生された PDXDC1 (c21-fixed-AA) のアミノ酸シーケンスのアライメント

アライメントには clustalw (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>)を用いた。PDXDC1 の C 末端の 608-788 アミノ酸残基を欠失させた。この欠失残基部分を黄色マーカーで示した。全体のドメインでのそれぞれの共通アミノ酸残基をアスタリスク(*)で示した。

```

hsa_23042      CQLSQRLQESLKKVNYI KILVEDELSSPVVVFRRFFQELPGSDPVFKAVPVPNMTPSGVGR 393
c21-fixed-AA  CQLSQRLQESLKKVNYI KILVEDELSSPVVVFRRFFQELPGSDPVFKAVPVPNMTPSGVGR 420
*****

hsa_23042      ERHSCDALNRWLGEQLKQLVPASGLTVMDLEAEGTCLRFSPMLTAAVLGTRGEDVDQLVA 453
c21-fixed-AA  ERHSCDALNRWLGEQLKQLVPASGLTVMDLEAEGTCLRFSPMLTAAVLGTRGEDVDQLVA 480
*****

hsa_23042      CIESKLPVLCCTLQLREEFKQEVEATAGLLYVDDPNWSGI GVVRYEHANDDKSSLKSDPE 513
c21-fixed-AA  CIESKLPVLCCTLQLREEFKQEVEATAGLLYVDDPNWSGI GVVRYEHANDDKSSLKSDPE 540
*****

hsa_23042      GENIHAGLLKKLNELESDLTFKI GPEYKSMKSCLYVGMASDNVDAELVETIAATAREIE 573
c21-fixed-AA  GENIHAGLLKKLNELESDLTFKI GPEYKSMKSCLYVGMASDNVDAELVETIAATAREIE 600
*****

hsa_23042      ENSRLLLENMTEVVRKGI QEAQVELQKASEERLLEEGVLRQI PVVGSVLNWFSPVQALQKG 633
c21-fixed-AA  ENSRLLLENMTEVVRKGI QEAQVELQKASEERLLEEGVLRQI PVVGSVLNWFSPVQALQKG 660
*****

hsa_23042      RTFNLTAGSLESTEPI YVYKAQGAGVTL PPTPSGSRTKQRL PGQKPKRSLRGS DALSET 693
c21-fixed-AA  RTFNLTAGSLESTEPI YVYKAQGAGVTL PPTPSGSRTKQRL PGQKPKRSLRGS DALSET 720
*****

hsa_23042      SSVSHIEDLEKVERLSSGPEQITLEASSTEGHPGAPSPQHTDQTEAFQKGVPHPEDDHSQ 753
c21-fixed-AA  SSVSHIEDLEKVERLSSGPEQITLEASSTEGHPGAPSPQHTDQTEAFQKGVPHPEDDHSQ 780
*****

hsa_23042      VEGPESLR 761
c21-fixed-AA  VEGPESLR 788
*****

```

Fig. 1 (続き)

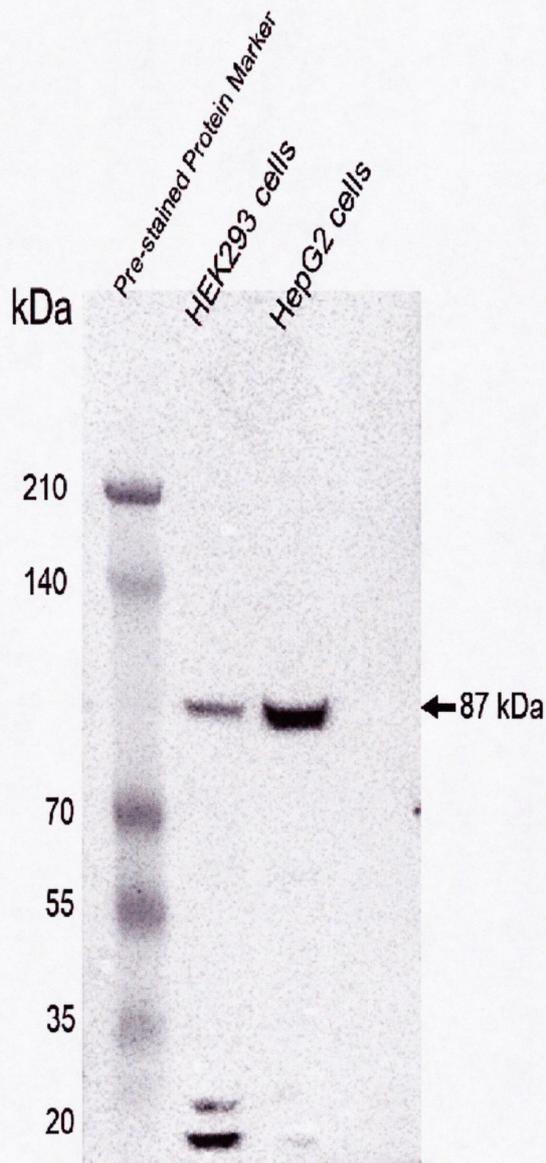


Fig. 2 a anti-PDXDC1 (約87 kDa)

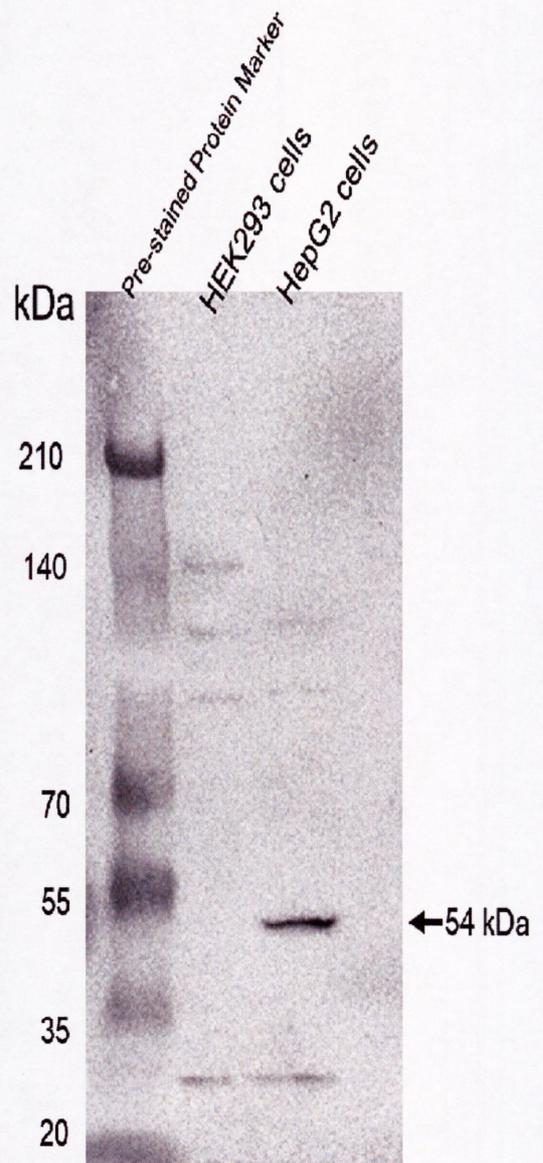


Fig. 2 b anti-DDC (約54 kDa)

Fig. 2 Western blottingによるヒト細胞でのPDXDC1、DDC発現確認

2 a:抗体はanti-PDXDC1を使用した。HEK293細胞、HepG2細胞の両方で発現が確認された。

2 b:抗体はanti-DDCを用いた。HepG2細胞にて発現が確認された。

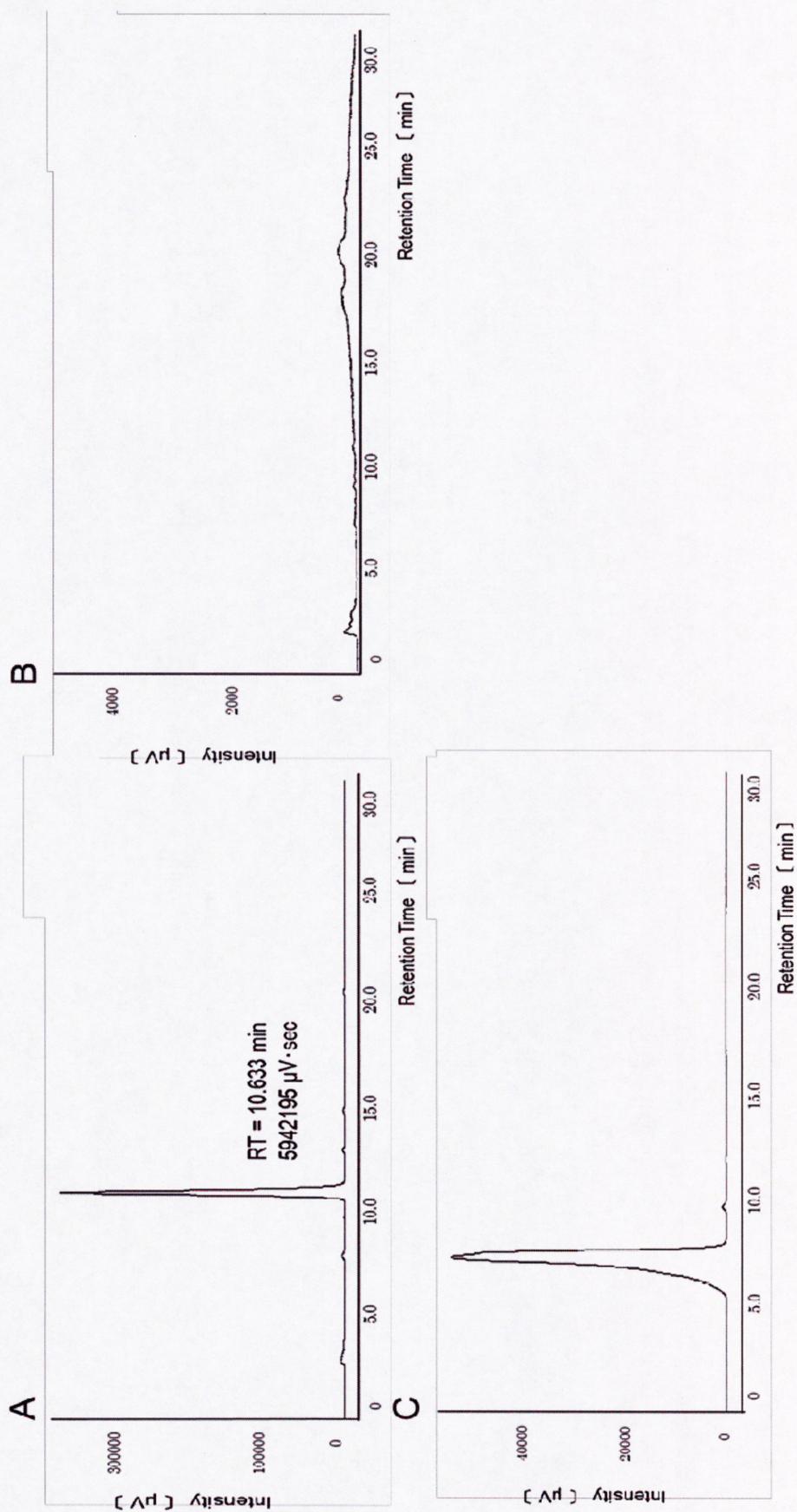


Fig. 3 Benzerazideがヒト細胞のPhe脱炭酸活性に及ぼす影響
細胞homogenateとPheの反応混合液に、フェネチルアミンの誘導体化処理を加えHPLCで分析した際のクロマトグラムと、
反応液中の成分に関するクロマトグラム
3A: フェネチルアミンとOPA誘導体化試薬を反応させたときのクロマトグラム。10.633分にピークを検出したため、
これをフェネチルアミンの誘導体とした。
3B: OPA誘導体化試薬のみのクロマトグラム。10～11分間にピークは観察されなかった。
3C: PheとOPA誘導体化試薬を反応させたときのクロマトグラム。10～11分間にピークは観察されなかった。

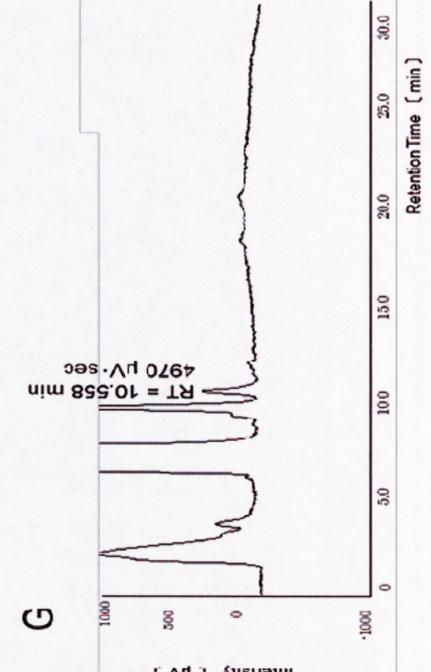
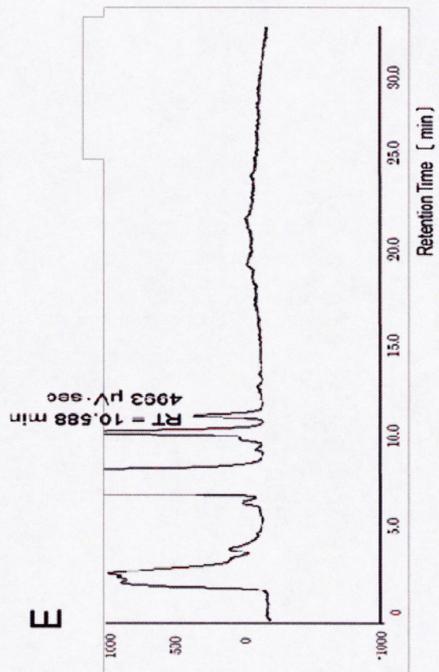
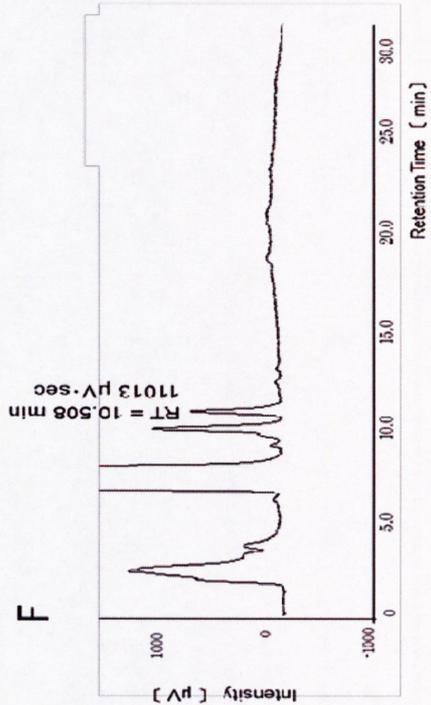
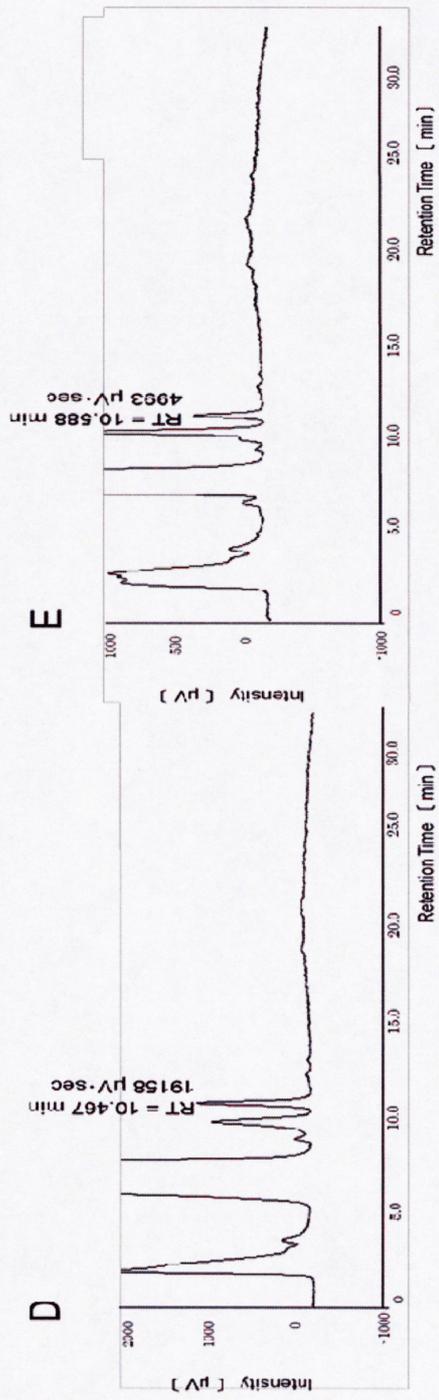


Fig.3 Benzerazideがヒト細胞のPhe脱炭酸活性に及ぼす影響(続き)
 3D: HEK293細胞のhomogenateとPheの反応混合液にOPA誘導体化処理を加え、HPLCに供したときのクロマトグラム。10.467分にピークが観察された。
 3E: HEK293細胞のhomogenateにBenzerazideを添加し、Pheを反応させた。反応液にOPA誘導体化処理を加えHPLCに供した。10.588分にピークが観察された。
 3F: HepG2細胞のhomogenateにBenzerazideを添加し、Pheを反応させた。反応液にOPA誘導体化処理を加え、HPLCに供したときのクロマトグラム。10.508分にピークが観察された。
 3E: HepG2細胞のhomogenateにBenzerazideを添加し、Pheを反応させた。反応液にOPA誘導体化処理を加えHPLCに供した。10.558分にピークが観察された。

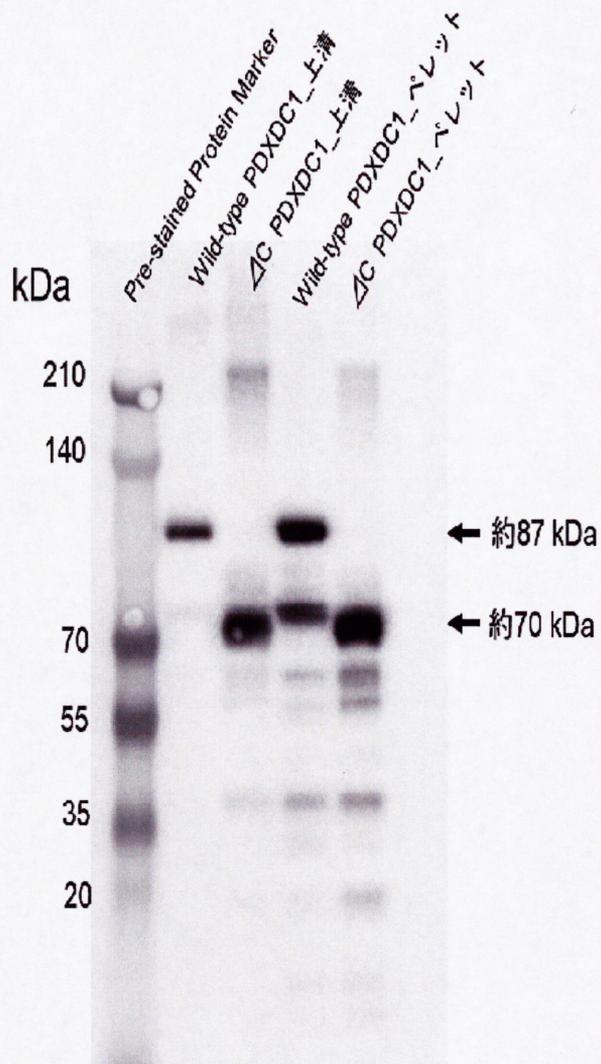


Fig. 4 E coliでのPDXDC1の発現

Western blottingにより、E. coliでのPDXDC1の発現を確認した。

IPTGによる発現誘導後、超音波にて破碎し、遠心分離して得られたE. coliのExtractの上清及びペレットを使用した。

1レーンにつき、5 μ gのタンパク量となるように供した。

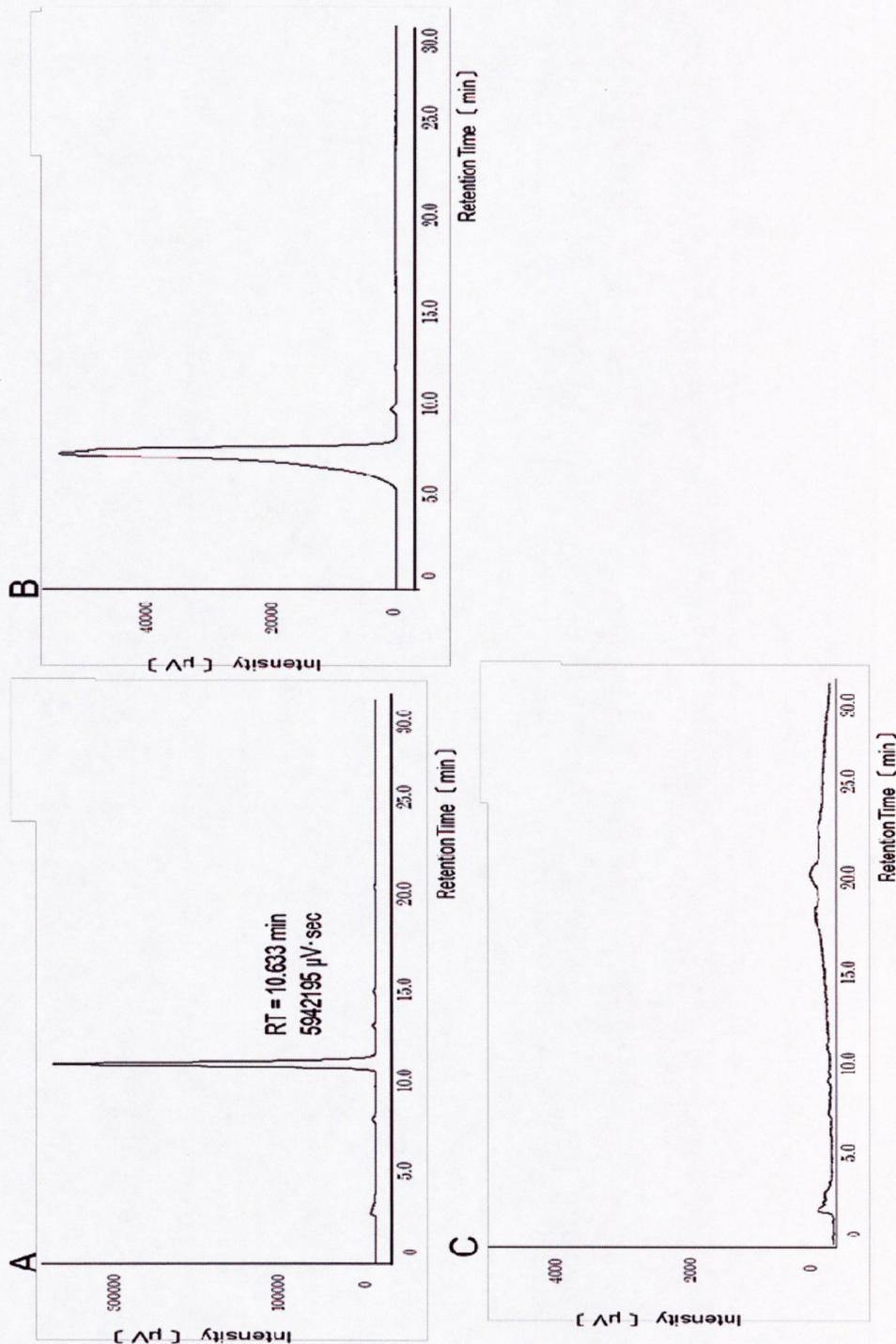


Fig. 5 PDXDC1を発現するE. coliのExtractのPhe脱炭酸活性測定
 PDXDC1を発現するE. coliのExtractとPheを反応させ、フェネチルアミンの生成をHPLCで分析した。反応液にOPA誘導体化試薬を加え、
 フェネチルアミンの蛍光誘導体化処理を行った。E. coliのExtractとPheの反応液のクロマトグラムと、反応液中の成分に関するクロマトグラムを示す。
 5A: フェネチルアミンとOPA誘導体化試薬を反応させたときのクロマトグラム。10.633分にピークが検出されたため、
 これをフェネチルアミンの誘導体とした。
 5B: OPA誘導体化試薬のみのクロマトグラム。10～11分の間にピークは観察されなかった。
 5C: PheとOPA誘導体化試薬を反応させたときのクロマトグラム。10～11分の間にピークは観察されなかった。

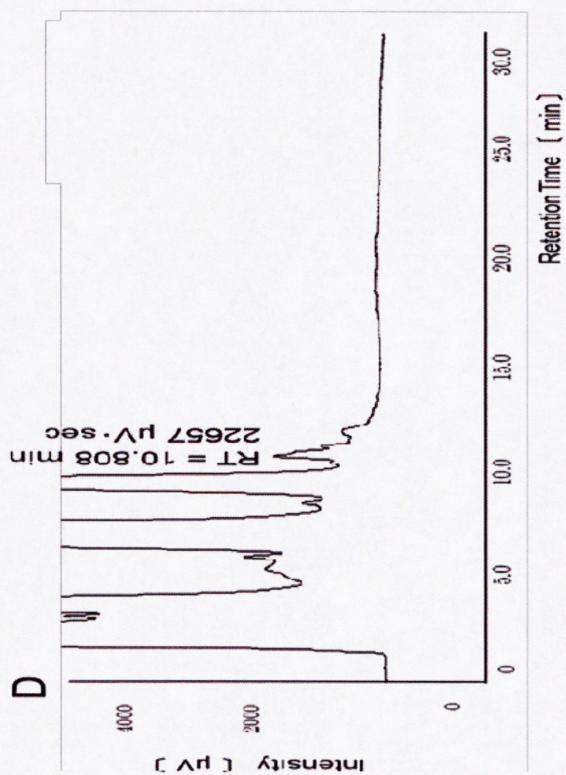
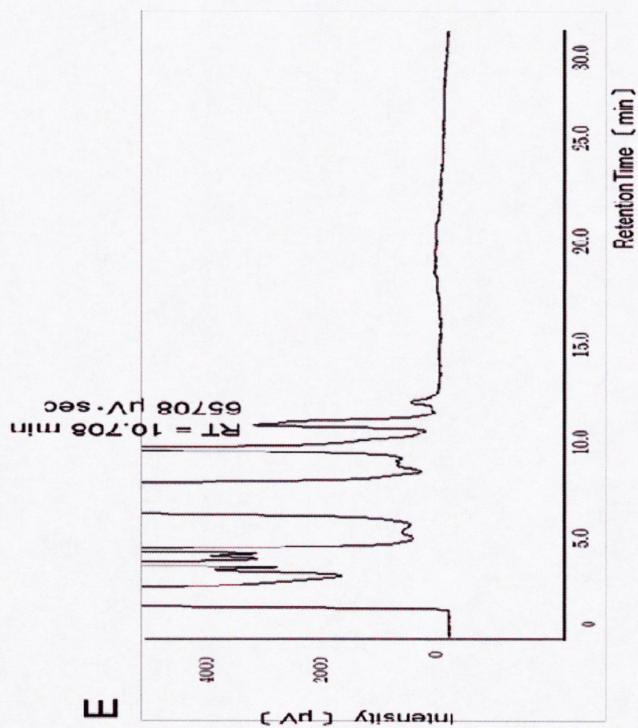


Fig. 5 PDXDC1を発現するE. coli のExtractのPhe脱炭酸活性測定(続き)
 5D: Wild-type PDXDC1を発現するE. coli Extractの上清とPheの反応混合液にOPA誘導体化試薬を加え、HPLCに供したときのクロマトグラム。10.808分にピークが観察された。
 5E: Δ C PDXDC1を発現するE. coli Extractの上清とPheの反応混合液にOPA誘導体化試薬を加え、HPLCに供したときのクロマトグラム。10.708分にピークが観察された。

HDC	E E D K Q R G L V P V F V C A T L G T T G V C A F D C L S E L G P I C A R E G L W L H I D A A Y A G	278
DDC	E R D K A A G L I P F F M V A T L G T T T C C S F D N L L E V G P I C N K E D I W L H V D A A Y A G	276
hsa_23042	G P W L G L P A V P A V T L Y K H D D P A L T L V A G L T S N K P T D K L R A L P L W L S L Q Y L G	322
c21-fixed-AA	G P W L G L P A V P A V T L Y K H D D P A L T L V A G L T S N K P T D K L R A L P L W L S L Q Y L G	349
	: * * . * . . : * : . * *	
HDC T A F L C P E F R G F L K G I E Y A D S F T F N P S K W M M V H F D C T G F W V	318
DDC S A F I C P E F R H L L N G V E F A D S F N F N P H K W L L V N F D C S A M W V	316
hsa_23042	L D G F V E R I K H A C Q L S Q R L Q E S L K K V N Y I K I L V E D E L S S P V V V F R F F Q E L P	372
c21-fixed-AA	L D G F V E R I K H A C Q L S Q R L Q E S L K K V N Y I K I L V E D E L S S P V V V F R F F Q E L P	399
	: . : . : . : * : : : . : : . : * *	
HDC	K D K - - Y K L Q Q T F S V N P I Y L R H A N - - S G V A T D F M H W Q I P L S R - - - - -	355
DDC	K K R - - T D L T G A F R L D P T Y L K H S H Q D S G L I T D Y R H W Q I P L G R - - - - -	355
hsa_23042	G S D P V F K A V P V P N M T P S G V G R E R H S C D A L N R W L G E Q L K Q L V P A S G L T V M D	422
c21-fixed-AA	G S D P V F K A V P V P N M T P S G V G R E R H S C D A L N R W L G E Q L K Q L V P A S G L T V M D	449
 : * : : : * :	
HDC R F R S V K L W F V I R S F G - - - - - V K N L Q A H V R H G T E M A K Y F	388
DDC R F R S L K M W F V F R M Y G - - - - - V K G L Q A Y I R K H V Q L S H E F	388
hsa_23042	L E A E G T C L R F S P L M T A A V L G T R G E D V D Q L V A C I E S K L P V L C C T L Q L R E E F	472
c21-fixed-AA	L E A E G T C L R F S P L M T A A V L G T R G E D V D Q L V A C I E S K L P V L C C T L Q L R E E F	499
	* * . : * : * : : . : : . : * *	
HDC	E S L V R N D P - S F E I P A K R H L G L V V F R L K G P N C L T E N V L K E I A K - - - A G R L F	434
DDC	E S L V R Q D P - R F E I C V E V I L G L V C F R L K G S N K V N E A L L Q R I N S - - - A K K I H	434
hsa_23042	K Q E V E A T A G L L Y V D D P N W S G I G V V R Y E H A N D D K S S L K S D P E G E N I H A G L L	522
c21-fixed-AA	K Q E V E A T A G L L Y V D D P N W S G I G V V R Y E H A N D D K S S L K S D P E G E N I H A G L L	549
	: . * . . : : * : * : * . . : . :	

Fig. 6 (続き)

HDC	L I P A T I Q D K L I I R F T V T S Q F T T R D D I L R D W N L I R D A A T L I L S Q H C T S Q P S	484
DDC	L V P C H L R D K F V L R F A I C S R T V E S A H V Q R A W E H I K E L A A D V L R A E R E - - - -	480
hsa_23042	K K L N E L E S D L T F K I G P E Y K S M K S C L Y V G M A S D N V D A A E L V E T I A A T A R E I	572
c21-fixed-AA	K K L N E L E S D L T F K I G P E Y K S M K S C L Y V G M A S D N V D A A E L V E T I A A T A R E I	599
	: : : : : : : : : : : * : :	
HDC	P R V G N L I S Q I R G A R A W A C G T S L Q S V S G A G D D P V Q A R K I I K Q P Q R V G A G P -	533
DDC	- - - - -	
hsa_23042	E E N S R L L E N M T E V V R K G I Q E A Q V E L Q K A S E E R L L E E G V L R Q I P V V G S V L N	622
c21-fixed-AA	E E N S R L L E N M T E V V R K G I Q E A Q V E L Q K A S E E R L L E E G V L R Q I P V V G S V L N	649
HDC	- M K R E N G L H L E T L L D P V D D C F S E E A P D A T K H K L S S - - - F L F S Y L S V Q T K K	579
DDC	- - - - -	
hsa_23042	W F S P V Q A L Q K G R T F N L T A G S L E S T E P I Y V Y K A Q G A G V T L P P T P S G S R T K Q	672
c21-fixed-AA	W F S P V Q A L Q K G R T F N L T A G S L E S T E P I Y V Y K A Q G A G V T L P P T P S G S R T K Q	699
HDC	K T V R S L S C N S V P V S A Q K P L P T E A S V K N G G S S R V R I F S R F P E D M M L K K S A	629
DDC	- - - - -	
hsa_23042	R L P G Q K P F K R S L R G S D A L S E T S S V S H I E D L E K V E R L S S G P E Q I T L E A S S T	722
c21-fixed-AA	R L P G Q K P F K R S L R G S D A L S E T S S V S H I E D L E K V E R L S S G P E Q I T L E A S S T	749
HDC	F K K L I K F Y S V P S F P E C S S Q C G L Q L P C C P L Q A M V - - - - -	662
DDC	- - - - -	
hsa_23042	E G H P G A P S P Q H T D Q T E A F Q K G V P H P E D D H S Q V E G P E S L R	761
c21-fixed-AA	E G H P G A P S P Q H T D Q T E A F Q K G V P H P E D D H S Q V E G P E S L R	788

Fig. 6 (続き)