

酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 における D-アスパラギン酸酸化酵素の生理機能解析

環境生物化学研究室 角一 大樹

指導教官 山田 良平, 解良 芳夫, 高橋 祥司

1. はじめに

D-アスパラギン酸酸化酵素(DDO, EC 1.4.3.1)は、D-アスパラギン酸(D-Asp)やD-グルタミン酸(D-Glu)などの酸性D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する酵素であり、酵母からヒトに至る多くの真核生物に存在していることが知られている。現在までに、いくつかの生物種由来のDDOの酵素学的諸特性が詳細に解析され、哺乳動物においてその生理機能に関する研究が進行中である。しかし、真核微生物におけるDDOの生理機能に関する報告はない。

我々はDDOを多量に生産する酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 を単離し、微生物由来としては初めて完全精製した *C. humicola* UJ1 のDDO (ChDDO) について、その酵素学的諸特性を明らかにしてきた。また、*C. humicola* UJ1 はD-Aspを唯一の窒素源として生育させた時にChDDOを生産し、他のD, L-アミノ酸では明らかな生産はみられなかったことから、ChDDOはD-Aspを窒素源として生育に利用する役割を担っていることが示唆された。しかし、ChDDOの発現条件のより詳細な解析はなされておらず、また、ChDDO遺伝子破壊株が得られていなかったこともあり、その生理機能は完全には明らかとされていない。

本研究では、*C. humicola* UJ1 のChDDO遺伝子破壊株(*ddo*)を構築し、その生育特性を解析するとともにChDDOの発現条件を詳細に解析することにより、本酵母における本酵素の生理機能を明らかにすることを目的としている。

2. 材料と方法

2-1. 実験に用いた酵母と培地組成、培養方法

C. humicola UJ1 は、野生株として用いた。*C. humicola* UJ1 の *Chura3* 株である *C. humicola* UM3 は、*ddo* 株を作製するための宿主として用いた。酵母菌株は、YPD培地(1% yeast extract (w/v), 2% polypeptone (w/v), 2% glucose (w/v)) 或いはSD培地(0.67% yeast nitrogen base (w/v), 2% glucose (w/v)) で培養した。平板培地は、2% (w/v)の寒天の添加により作製した。また、*C. humicola* UJ1 と *ddo* 株の生育特性を比較するために、Wickerhamの酵母用合成培地を基本として必要に応じて窒素源と炭素源を変えた完全合成培地を作製した。窒素源と炭素源は、pH 7.0 に調製した塩化アンモニウム、グ

ルコース、D-Asp、D-Glu、D-アラニン(D-Ala)の1M溶液をろ過滅菌(孔径0.2- μ m)して使用時に無菌的に必要量を培地に添加した。培養は30℃の好気的条件下で振とう培養により行い、生育は波長600nmでの吸光度(OD₆₀₀)を測定した。

2-2. ChDDO 遺伝子の破壊と確認

ddo 株の作製のために、*in vitro*でChDDO遺伝子内に選択マーカーとして *C. humicola* UJ1 のオロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素遺伝子(*ChURA3* 遺伝子)を挿入したChDDO遺伝子破壊ベクター pSKdDU を構築した(図1)。そして、*C. humicola* UM3 を制限酵素 *Kpn*I と *Hind*III で消化したChDDO遺伝子破壊ベクターにより形質転換した。酵母の形質転換は、電気穿孔法により行った。

形質転換体におけるChDDO遺伝子破壊の確認は、制限酵素 *Pvu*II で消化した形質転換体ゲノムDNAについて、ChDDO遺伝子と *ChURA3* 遺伝子に対するサザンブロット解析により行った。

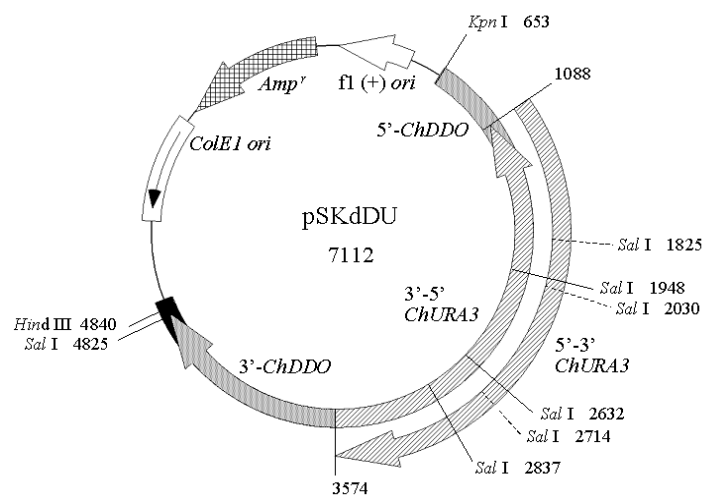


図1 ChDDO 遺伝子破壊ベクター pSKdDU のプラスミド地図

2-3. 無細胞抽出液の調製とDDO活性の測定

酵母細胞は、ガラスビーズ(直径0.45-0.5mm)を含む破碎バッファー(50 mM KPi, 2 mM EDTA, pH 7.0)に懸濁して1分間のボルテックスと氷上での1分間の冷却を10回繰り返すことで破碎した。そして、遠心分離(15,000 x g, 20分間, 4℃)して回収した上清を無細胞抽出液とした。

DDOの活性測定は、無細胞抽出液と50 mM KPi バッファー(pH 7.5), 20 μ M FAD と 20 mM D-Asp を含む混合液において、基質であるD-Aspから酵素反応により生じるオキサロ酢酸を2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(2,4-DNPH)と反応させて生じたヒドラゾンの吸光を波長445 nmで測定して決定した。DDO活性の1 Uは、1分間に1 μ molのD-Aspを消費する酵素量として定義した。

2-4. タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度の測定は、フェノール試薬とタンパク質(チロシン、トリプトファン)が結合する際の吸光の変化を測定するLowryらの方法により行った。

2-5. 酸性D-アミノ酸の毒性と *ddo* 株の生育

SD培地でOD₆₀₀が1.5~2.0になるまで生育させた*C. humicola* UJ1と*ddo*株を酵母細胞数が10,000、1,000、100、10となるように、それぞれ異なるアミノ酸を添加したSD平板培地に接種して、30℃で24時間の培養を行った。SD平板培地に添加するアミノ酸は、D-Asp, D-Glu, L-Asp, L-Gluを用いた。

異なるアミノ酸を含むSD平板培地は、pH 7.0に調整した必要量のSD培地に1 M D-Asp 溶液、1 M D-Glu 溶液、1 M L-Asp 溶液、1 M L-Glu 溶液を無菌的に最終濃度が50 mM、100 mM、200 mMとなるように添加して作製した。

3. 結果と考察

3-1. *ChDDO* 遺伝子の破壊と確認

C. humicola UJ1における*ChDDO*の生理機能を解析するために、*ChDDO*遺伝子を破壊した*ddo*株は重要な役割を担う。

図1に示すように構築した*ChDDO*遺伝子破壊ベクター pSKdDUは、*ChDDO*遺伝子と*ChURA3*遺伝子をそれぞれ制限酵素処理したのち、互いのDNA末端を平滑化して連結しているために*ChURA3*遺伝子の挿入される方向が異なることが予想される。このpSKdDUにより大腸菌DH5 α を形質転換したところ、いくつかの大腸菌形質転換体を得られた。得られた大腸菌形質転換体から無作為に16個のコロニーを選択してプラスミドを回収したのち、制限酵素*Sal*消化によるアガロースゲル電気泳動解析を行った。その結果、*ChDDO*遺伝子の5'から3'方向に対して逆方向に*ChURA3*遺伝子(図1, 3'→5' *ChURA3*)が挿入されたpSKdDU11と、*ChDDO*遺伝子の5'から3'方向に対して同方向に*ChURA3*遺伝子(図1, 5'→3' *ChURA3*)が挿入されたpSKdDU12およびpSKdDU13と名付けた*ChDDO*遺伝子破壊ベクターを確認した(data not shown)。なお、*ddo*株作製のために*C. humicola* UM3へ導入する*ChDDO*遺伝子破壊ベクターは、*ChDDO*遺伝子と*ChURA3*遺伝子の連続した発現の可能性を避けるためpSKdDU11を用いた。

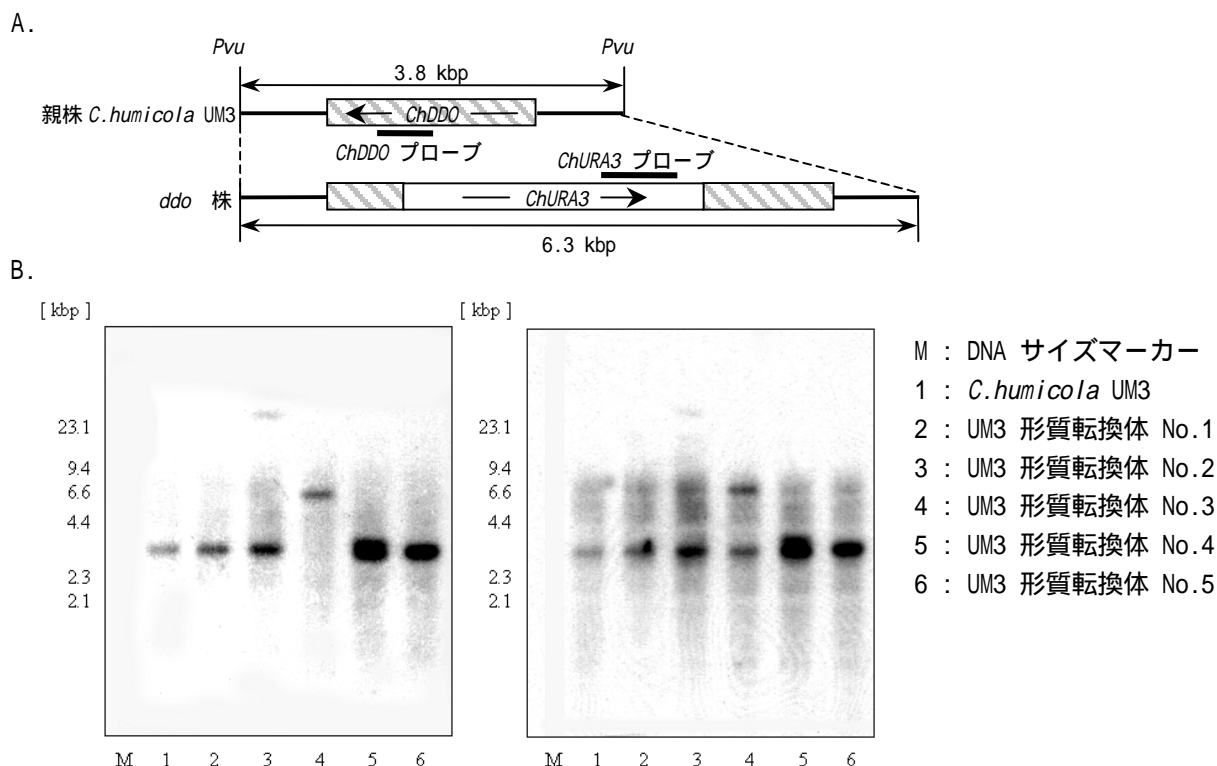


図2 制限酵素 *Pvu* 消化による UM3 形質転換体のゲノム DNA のサザンブロット解析

C. humicola UM3 を制限酵素 *Kpn* と *Hind* 消化した pSKdDU11 で形質転換したところ、いくつかの UM3 形質転換体が得られた。得られた UM3 形質転換体から無作為に5個のコロニーを選択して、それぞれ UM3 株形質転換体 No.1 から No.5 と名付けて、そのゲノム DNA 上の *ChDDO* 遺伝子の形態をサザンプロット解析により確認した (図2)。

C. humicola UM3 のゲノム DNA を制限酵素 *Pvu* で消化すると、*ChDDO* 遺伝子を含む約 3.8 kbp のゲノム DNA 断片が得られる。一方、*ddo* 株では *ChDDO* 遺伝子内に挿入された *ChURA3* 遺伝子を含む約 6.3 kbp のゲノム DNA 断片が得られる (図2-A)。

図2-B から、*ChDDO* 遺伝子に対するサザンプロット解析は、UM3 形質転換体 No.3 において *ChDDO* 遺伝子破壊株に特異的な約 6.3 kbp 程度のバンドを検出した。一方、*ChURA3* 遺伝子に対するサザン解析は、*ChDDO* 遺伝子の場合と同様に UM3 形質転換体 No.3 において約 6.3 kbp 程度のバンドを検出した。また、UM3 形質転換体 No.3 のゲノム DNA 中の *Chura3* 遺伝子が、コントロールとした *C. humicola* UM3 の *Chura3* 遺伝子のバンドと同じ位置に検出された。

また、UM3 形質転換体 No.3 は D-Asp を唯一の窒素源とした平板培地で生育しなかったこと (data not shown) と液体培地で *ChDDO* を誘導したときの DDO 活性が測定されなかったこと (data not shown) から、*ChDDO* の機能不全が確認されたため、サザン解析の結果とあわせて UM3 形質転換体 No.3 を *ddo* 株と決定した。

3-2. *C. humicola* UJ1 と *ddo* 株の生育特性の比較

現在までに、*C. humicola* UJ1 は D-Asp を唯一の窒素源としたときに、*ChDDO* を大量に生産することが明らかとされている。しかしながら、D-Asp を唯一の炭素源もしくは窒素および炭素源としたときの *C. humicola* UJ1 における *ChDDO* の発現は明らかとされていない。また、D-Asp が本酵素のみで代謝されているのかについても明らかとされていない。そのため、窒素源や炭素源の違いによる *C. humicola* UJ1 と *ddo* 株の生育特性を比較して (図3) *ChDDO* 遺伝子破壊の影響について考察した。

窒素源の違いによる生育特性の比較は、D-Asp、D-Glu、D-Ala をそれぞれ唯一の窒素源として最終濃度が 10 mM になるように添加した完全合成培地 (炭素源はグルコースを最終濃度 55.5 mM 添加) で行った。

炭素源による生育特性については、D-Asp を最終濃度が 83.25 mM になるように添加した完全合成培地 (窒素源は塩化アンモニウムを最終濃度 10 mM 添加)

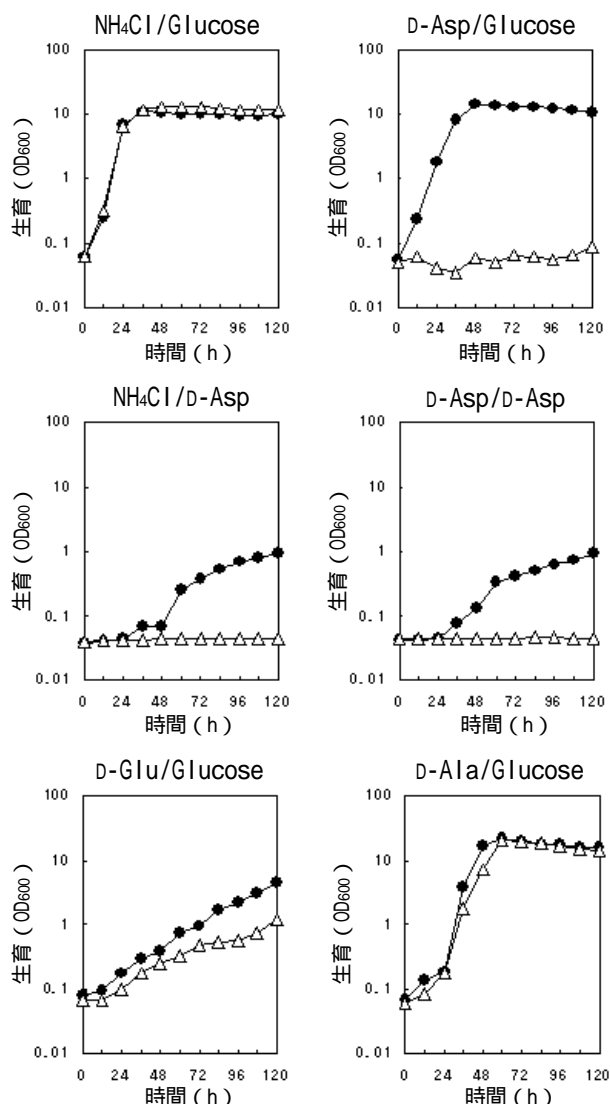


図3 様々な窒素源と炭素源での *C. humicola* UJ1 と *ddo* 株の生育

C. humicola UJ1 (●), *ddo* 株 (○)

で行った。このときの D-Asp の最終濃度は、コントロールとした 55.5 mM のグルコースの炭素数と等しい。また、窒素源と炭素源の両方については、D-Asp を最終濃度 93.25 mM 添加した完全合成培地で行った。D-Asp を窒素源 (D-Asp/Glucose 培地) としたとき、炭素源 (NH₄Cl/D-Asp 培地)、窒素および炭素源 (D-Asp/D-Asp 培地) としたとき、いずれにおいても *C. humicola* UJ1 は生育したが *ddo* 株は生育しなかった。このことから、*ChDDO* は D-Asp を窒素源や炭素源として別々に、もしくは同時に代謝出来る唯一の酵素であることが明らかとされた。

窒素源を D-Glu (D-Glu/Glucose 培地) や D-Ala (D-Ala/Glucose 培地) としたとき、*C. humicola* UJ1 と *ddo* 株は共に生育した。しかし、窒素源が D-Glu

のとき、*ddo* 株の生育は *C.humicola* UJ1 よりも劣っていた。このことは、*ChDDO* 遺伝子破壊による D-Glu 代謝への何らかの影響を示唆する。事実、D-Glu を唯一の窒素源としたときの *C.humicola* UJ1 と *ddo* 株の DDO 活性を測定したところ、僅かに *C.humicola* UJ1 で *ddo* 株には見られない DDO 活性を確認した (data not shown)。

3-3. *C.humicola* UJ1 における ChDDO の発現解析

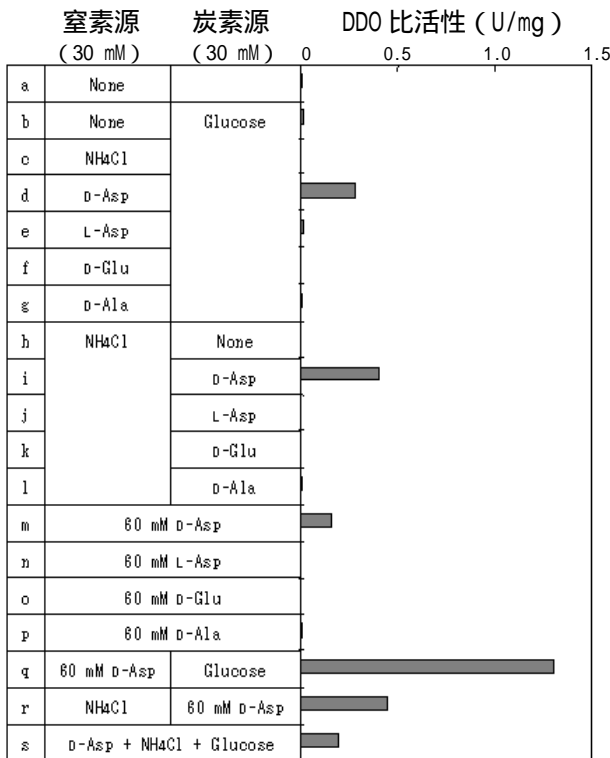


図4 様々な窒素源と炭素源の組み合わせにおける *C.humicola* UJ1 の DDO 活性

C.humicola UJ1 における DDO の発現条件のより詳細な解析を行うために、図4に示す窒素源と炭素源の組み合わせにおける DDO 活性について検討した。

DDO 活性は、D-Asp の存在下 (図4, d, i, m, q-s) においてのみ検出され、塩化アンモニウムやグルコース (図4, c) 他、D, L-アミノ酸の存在下 (図4, e-g, j-l, n-p) では意味のある DDO 活性は検出されなかった。また、窒素源もしくは炭素源のない状況 (図4, a, b, h) で DDO 活性は検出されなかった。

以上のことから、*C.humicola* UJ1 における ChDDO の発現は、D-Asp の存在に依存して誘導され、他の窒素源や炭素源により誘導されないことが明らかとなった。また、他の窒素源や炭素源との共存下においても誘導されることが示唆された。そして、ChDDO の発現は窒素源もしくは炭素源異化抑制作用のような発現調節機構を受けないことが示唆された。

3-4 酸性D-アミノ酸の毒性と *ddo* 株の生存可能性

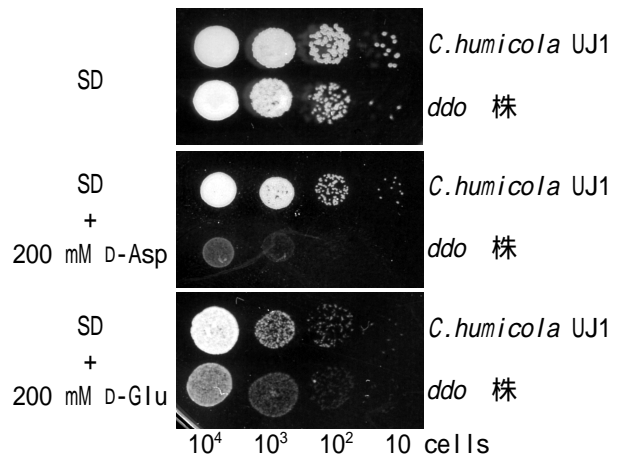


図5 酸性 D-アミノ酸を含む SD 平板培地での *C.humicola* UJ1 と *ddo* 株の生育

ChDDO の発現は、他の窒素源や炭素源に影響されることなく D-Asp の存在に依存することから、ChDDO は D-Asp を生体異物として分解する役割を担うことが示唆された。そのため、D-Asp の他に利用可能な窒素源と炭素源の共存下で、*C.humicola* UJ1 と *ddo* 株の生育を比較することにより D-Asp による生育阻害の影響を検討した (図5)。

D-Asp の添加は、*C.humicola* UJ1 の生育に影響は与えなかったが、*ddo* 株の生育は著しく阻害した。そして、*ddo* 株の生育阻害は D-Asp の濃度に依存して大きくなった (data not shown)。また、D-Asp と同じ酸性 D-アミノ酸の D-Glu の添加は、*C.humicola* UJ1 と *ddo* 株の生育を阻害した。しかし、D-Glu の濃度に関係なく同様に生育した *C.humicola* UJ1 に対して、*ddo* 株は D-Glu の濃度に依存して生育が阻害された (data not shown)。このことは、D-Glu の分解に ChDDO が関与している可能性を示唆している。

以上のように、D-Asp や D-Glu は *ddo* 株の生育を阻害することから、*C.humicola* UJ1 の ChDDO は、D-Asp や D-Glu を分解する解毒酵素としても機能していることが示唆された。

4. まとめ

C.humicola UJ1 の ChDDO は、D-Asp を代謝して生育に利用するために必須な酵素であることが明らかとなった。そして、本酵素の発現は D-Asp の存在に依存的であり、他の窒素源や炭素源との共存下でも誘導発現された。

また、本酵素は酸性 D-アミノ酸を分解する解毒酵素としても機能していることが示唆された。