

酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 の D-アスパラギン酸酸化酵素 遺伝子の異種細胞における発現と諸性質の解析

環境生物化学研究室 高橋俊之

指導教官 山田良平 解良芳夫 高橋祥司

背景

D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する酵素には、D-アラニン (D-Ala) などの中性 D-アミノ酸と塩基性 D-アミノ酸を基質とする D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) と、D-アスパラギン酸などの酸性アミノ酸を基質とする D-アスパラギン酸酸化酵素 (DDO) の 2 種類存在する。DDO はフラビン酵素であり、牛腎臓から世界で初めて完全精製され諸特性が解明された。DDO は多くの哺乳類のほか鳥類、両生類、魚類などの組織に存在することが明らかにされているが、当研究室では微生物由来としては初めて酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 (UJ1) から本酵素を均一に精製することに成功した。UJ1 由来の本酵素は牛腎臓などに由来する DDO とは明らかに異なる酵素学的諸特性をもつことが示されたが、未だに本酵素の構造面における知見は乏しいままである。

本酵素の構造面に関する知見を得ることができれば、既に多くが明らかになっている DAO の構造と比較することにより、それぞれの基質特異性の違いを決定しているアミノ酸残基の特定が期待できる。これが明らかになれば幅広い基質特異性を持つ、または逆に特定の D-アミノ酸に対してのみ特異性を示す D-アミノ酸酸化酵素の創出が可能である。この研究を行うためには容易に、かつ多量に本酵素を精製できる発現・精製系が必要である。そこで本酵素 cDNA を単離し、DNA 組換え技術を用いた異種細胞における大量発現系の構築を検討する。また、精製した組換え酵素が酵母 UJ1 から精製した本酵素と同様の酵素学的諸性質を持ち、今後構造面に関する研究に使用できるか検討する。

実験と結果

1. 酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 由来 DDO の cDNA の調製

酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 (UJ1) 由来 DDO (*ChDDO*) の cDNA を大腸菌に組込むことで組換え本酵素の大量発現が期待され、また、遺伝子に変異を導入してアミノ酸残基を置換することで酵素反応部位の研究を進めることが可能になる。本酵母の全 cDNA は、D-アスパラギン酸を唯一の窒素源として培養した細胞から調製した全 RNA を鋳型とし、逆転写酵素を用いて調製した。*ChDDO* cDNA の増幅は、明らかにされていたゲノム *ChDDO* 遺伝子の末端配列をもとに作成したプライマーを使用した PCR により行った。*ChDDO* cDNA の増幅はアガロースゲル電気泳動解析により確認した (Fig. 1)。予想された *ChDDO* 遺伝子の cDNA とゲノム DNA の長さの差

は 70 bp とわずかであることから、その差を確認することは困難である。そこで PCR 産物の長さを短くして電気泳動の分離を良くするため、イントロン配列を含むように制限酵素 *Pst* / *Xho* で切断した PCR 産物と未処理の PCR 産物をアガロースゲル電気泳動解析

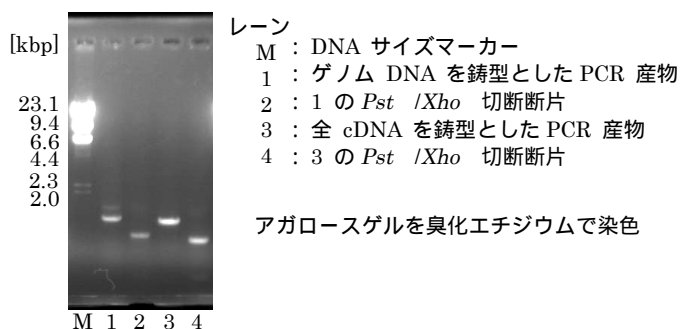


Fig. 1 *ChDDO* cDNA の PCR による増幅の確認

した。その結果、全 cDNA を鋳型にした PCR 産物の方は制限酵素未処理、処理済共にゲノム DNA を鋳型にした増幅産物よりも予想された長さだけ短かったことから、*ChDDO* cDNA が増幅されたことが明らかになった。また、この増幅産物の塩基配列はゲノム *ChDDO* 遺伝子から推測された cDNA の配列と一致したことから、この増幅産物を発現実験に用いることにした。

2. タグ融合組換え *ChDDO* 発現ベクター構築の検討

ChDDO の構造面における研究を行うためには容易、かつ大量に本酵素を精製する必要がある。そこで大量発現が期待できる大腸菌を宿主として用いて、精製を容易にするタグ融合組換え *ChDDO* を生産させる発現ベクターの構築を検討した。

始めに、N 末端インテイン融合 *ChDDO* 発現ベクター pTED7 (Fig. 2) を構築し、発現用大腸菌 Rosetta (DE3) に導入した。このベクターはインテインタグ (約 45 kDa) を S-S 還元剤で切断することにより、余分なペプチドを付加させることなく、組換え本酵素を 1 段階の精製過程で単一に精製出来る。また、この大腸菌は組換え蛋白質の大量発現に必要な T7 RNA polymerase を生産し、かつ真核生物に多く使われているコドンに対応している。この形質転換体を用いて N 末端インテイン融合 *ChDDO* を誘導発現させた (Table 1、Fig. 3)。これらの結果から、N 末端インテイン融合 *ChDDO* は大量発現するが、封入体を形成してしまうことが明らかになった。*ChDDO* はホモ四量体であるため四次構造の形成をインテインが妨害している可能性が考えられる。

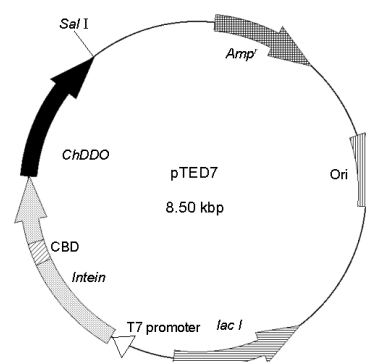
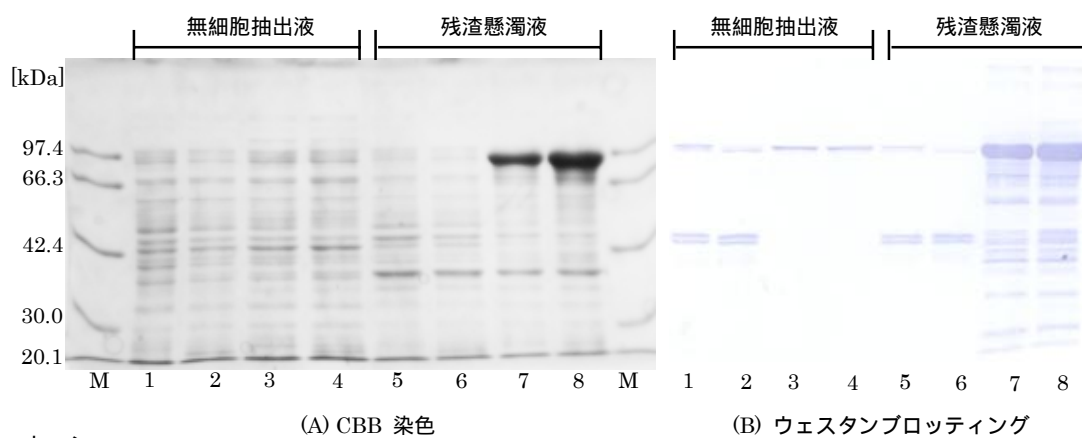


Fig. 2 pTED7 のプラスミド地図

次に N 末端 His タグ融合 *ChDDO* 発現ベクター pECDH2 (Fig. 4) を構築し、発現用大腸菌 Rosetta (DE3) に導入した。このベクターは 6 個の L-ヒスチジン残基が

らなる小さいタグを付加させるため、四次構造の形成を阻害しない可能性が強く、かつ 1 段階の精製過程で単一に精製出来る。ベクター pET15b に *ChDDO* cDNA を挿入して構築した。この形質転換体を用いて N 末端 His タグ融合 *ChDDO* を誘導発現させた (Table 1、Fig. 5)。これらの結果から、N 末端 His タグ融合 *ChDDO* は発現されなかったことが明らかになった。この原因として、ベクターの構築に失敗している可能性が考えられた。

しかし、その可能性を検討するよりもタグを持たない組換え *ChDDO* の精製を試みた方が早いため、タグ融合 *ChDDO* を用いたアフィニティークロマトグラフィーによるワンステップの精製の検討は一度中止することにした。



レーン

- M 蛋白質サイズマーカー
 1 *E. coli* BL21 (DE3) IPTG - 無細胞抽出液
 2 *E. coli* Rosetta (DE3) IPTG - 無細胞抽出液
 3 *E. coli* BL21 (DE3) IPTG + 無細胞抽出液
 4 *E. coli* Rosetta(DE3) IPTG + 無細胞抽出液
 5 *E. coli* BL21 (DE3) IPTG - 残渣懸濁液
 6 *E. coli* Rosetta(DE3) IPTG - 残渣懸濁液
 7 *E. coli* BL21 (DE3) IPTG + 残渣懸濁液
 8 *E. coli* Rosetta(DE3) IPTG + 残渣懸濁液

(B) ウェスタンブロッティング

- ChDDO 約 40 kDa
 ChDDO + Intain 約 95 kDa

Fig. 3 pTED7 導入形質転換体の無細胞抽出物と残渣の SDS-PAGE (A) とウェスタンブロット 解析 (B) 無細胞抽出液は蛋白質 7.5 μ g をアプライした。残渣は各無細胞抽出液の回収量と同じ体積の破碎バッファーに懸濁した後、各無細胞抽出液と同体積アプライした。分離ゲルには 10% アクリルアミドゲルを用いた。

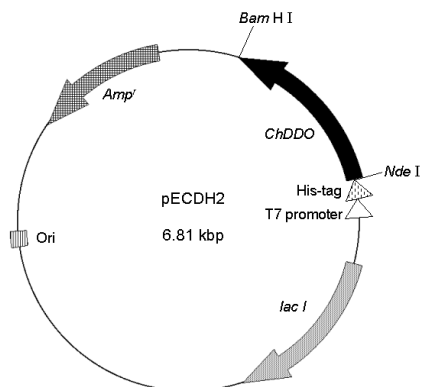
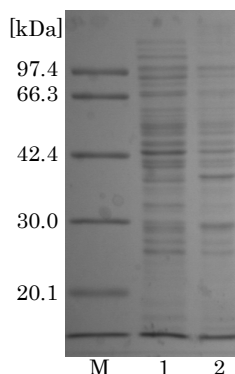


Fig. 4 pECDH2 のプラスミド地図



レーン

- M : 蛋白質 サイズマーカー
 1 : 無細胞抽出液
 2 : 残渣懸濁液
 ChDDO 約 40 kDa
 ChDDO + His タグ 約 42 kDa

Fig. 5 pECDH2 導入形質転換体の無細胞抽出物と残渣の SDS-PAGE 分離ゲルに 12% アクリルアミドゲルを用いた以外は Fig. 3 と同様の方法で行った。

Table 1 作成した形質転換体の無細胞抽出液の DDO 活性

			IPTG	Protein conc.	Total activity	Specific activity
				(mg/ml)	(U)	(U/mg)
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	/ pTYB11	-	6.99	0.190	0.00272
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	/ pTYB11	+	4.82	0.122	0.00255
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	/ pTED7	-	7.60	81.3	1.09
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	/ pTED7	+	3.92	0.793	0.0213
<i>E. coli</i>	Rosetta (DE3)	/ pTYB11	-	6.36	0.110	0.00185
<i>E. coli</i>	Rosetta (DE3)	/ pTYB11	+	4.71	0.152	0.00345
<i>E. coli</i>	Rosetta (DE3)	/ pTED7	-	7.94	59.9	0.820
<i>E. coli</i>	Rosetta (DE3)	/ pTED7	+	2.03	0.668	0.0352
<i>E. coli</i>	Rosetta (DE3)	/ pECDH2	+	4.50	6.84	0.152

IPTG (Isopropyl 1-thio-β-D-galactoside) : Final concentration was 1.0 mM

¹U = μmol / min

3. 組換え ChDDO 発現条件の最適化

今後 ChDDO の構造面に関する研究を進めるため、大腸菌を宿主にして発現させた組換え ChDDO が酵母 UJ1 から精製した ChDDO と同様の性質を持っているか確認する必要がある。そこで組換え ChDDO の精製・特徴付けを行う上で高い ChDDO 発現量を得ることを目的として、発現条件の最適化を行った。組換え ChDDO 発現ベクターは pECD5 (高橋助手により構築。Fig. 6) を使用した。大腸菌での組換え蛋白質の大量発現において一般的に試される条件を検討した。その結果、宿主は *E. coli* Rosetta (DE3)、培地は TB 培地、培養温度は 30 °C、IPTG 濃度は 1.0 mM、誘導時間は 6 時間に決定した (Fig. 7, 8)。

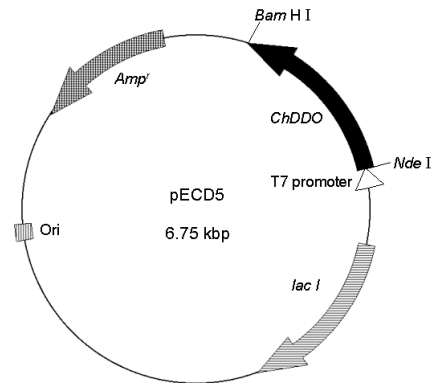


Fig. 6 pECD5 のプラスミド地図

Table 2 宿主による DDO 活性の差異

Host strain	DDO Specific activity (U ¹ /mg)	DDO Total activity (U)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	1.66	104
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	2.48	99.3

Condition : LB medium, 30 °C, IPTG 1.0 mM, Induction time 6 h

¹Unit = μmol/min

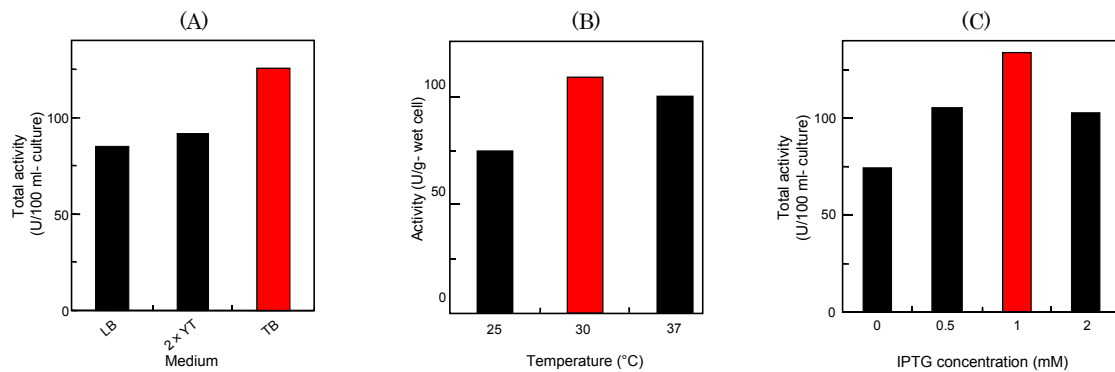


Fig. 7 組換え ChDDO 発現条件の最適化 (A) 培地、(B) 培養温度、(C) IPTG 濃度

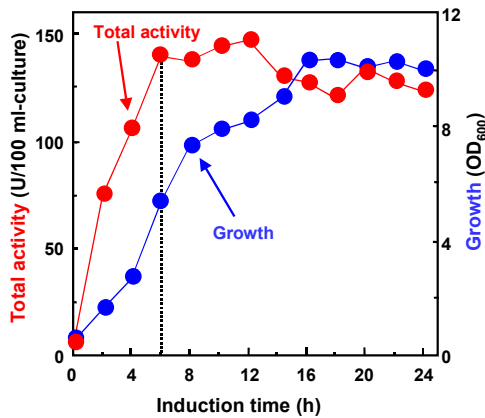


Fig. 8 IPTG による ChDDO 誘導発現と菌生育の経時変化

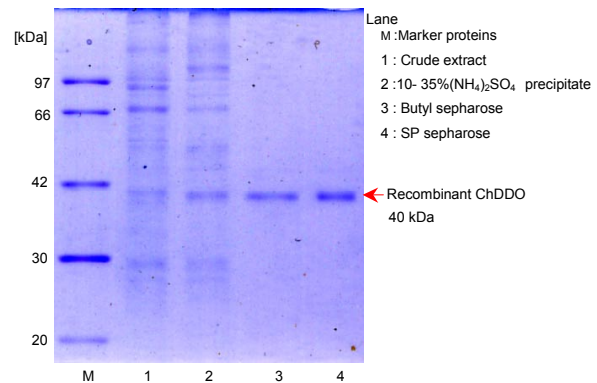


Fig. 9 各精製段階の SDS-PAGE

4. 大腸菌 *E. coli* Rosetta (DE3)/pECD5 から組換え ChDDO の精製

最適化された条件を使い、大腸菌 *E. coli* Rosetta (DE3)/pECD5 から組換え ChDDO を発現させ、これまでに確立された精製法に従って精製した(培養 超音波破碎 10-35 % 硫酸沈殿 疎水性クロマトグラフィー 陽イオン交換クロマトグラフィー)。精製表を Table 3 に示した。この操作で組換え本酵素を単一に精製することができた。

Table 3 大腸菌からの組換え ChDDO の精製

Step	Total activity (U)	Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	1210	997	1.21	1	100
10-35% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate	706	116	6.09	5.03	58.3
Butyl sepharose	464	7.57	61.2	50.5	38.3
SP sepharose	161	1.32	123	101	13.4

Starting material was 14.1 g of wet cell

5. 組換え ChDDO の特徴付け

精製された組換え ChDDO の特徴付けを行い、過去の研究で明らかになった性質と一致するか確認した。その結果、本組換え酵素は分子質量約 40 kDa のサブユニットからなるホモ四量体であり、至適温度、pH は 37、pH 7.5 で、熱耐性は 45 を超えると急激に失活した。D-アスパラギン酸に対して強い基質特異性を示し、最も強力な競合阻害剤はマロン酸だった。スペクトルは FAD 酵素特有の形状を示した。これらは全て UJ1 から精製した ChDDO と等しかったことから、本組換え酵素は ChDDO の構造面に関する研究に使用できることが明らかになった。

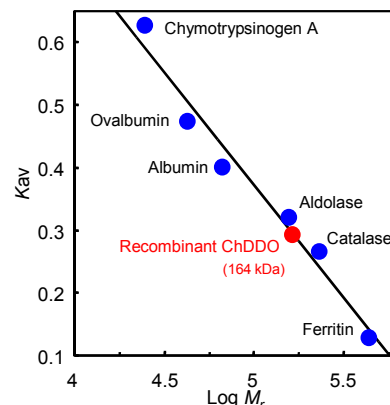
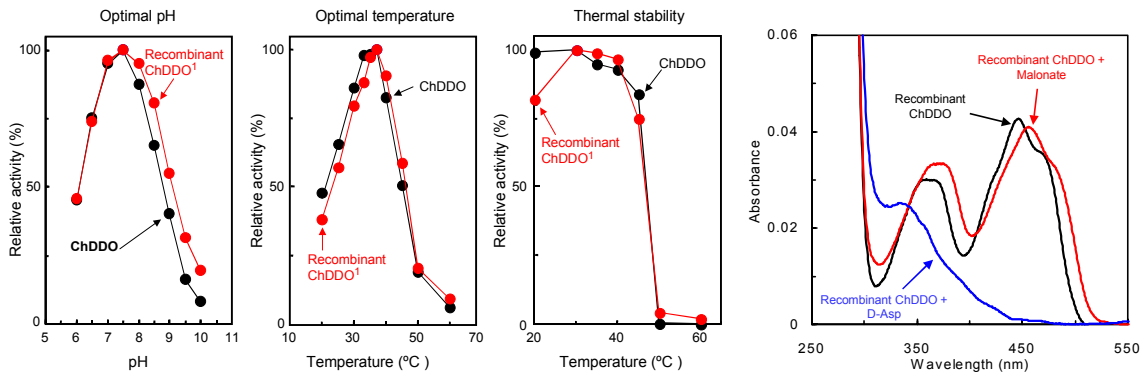


Fig. 10 ゲル濾過クロマトグラフィーによる未変性組換え ChDDO の分子質量の推定



¹ Purified from *E. coli* Rosetta (DE3)/pECD5.

Fig. 11 組換え ChDDO の至適 pH、至適温度、熱耐性

Fig. 12 組換え ChDDO の可視スペクトル

Table 4 DDO の基質特異性

Substrate (20 mM)	Relative activity (%) ¹	
	Recombinant ChDDO ²	ChDDO ³
D-Asp	100	100
D-Glu	(0.5) ⁴	0.4
NMDA	15.3	9.4
L-Asp	-	-
L-Glu	-	-
D-Ala	-	-
D-Asn	-	-
D-Gln	-	0.7
D-Leu	-	-
D-Pro	-	-
D-Ser	-	-
D-Arg	-	-

¹ The activity of ChDDO with D-Asp was 100%.

² Purified from *E. coli* Rosetta (DE3)/pECD5.

³ Purified from *Cryptococcus humicola* UJ1.

(*Biochim. Biophys. Acta*, 1294(1996) 153).

⁴ Calculated from Table 5.

Table 5 酵素反応速度に関する各値

Substrate	Enzyme	K_m ¹ (mM)	V_{max} ¹ (U/mg)	k_{cat} (S ⁻¹)	k_{cat}/K_m (S ⁻¹ ·M ⁻¹)
D-Asp	Recombinant ChDDO ²	2.92 ± 0.23	124 ± 3.00	82.6	28300
	ChDDO	3.65 ± 0.12	81.3 ± 0.9	54.4	14900
D-Glu	Recombinant ChDDO ²	62.6 ± 3.51	2.30 ± 0.09	2.00	25.0
	ChDDO	152 ± 3.5	3.04 ± 0.06	2.04	13.4
NMDA	Recombinant ChDDO ²	85.3 ± 24.3	57.2 ± 16.3	38.1	447
	ChDDO	28.0 ± 2.1	15.8 ± 0.8	10.6	378

¹ means ± SE

² Purified from *E. coli* Rosetta (DE3)/pECD5.

Table 6 ChDDO に対する阻害剤の効果

Inhibitor (20 mM)	Relative activity (%) ¹	
	Recombinant ChDDO ²	ChDDO
Malonate	39.6	46.9
D-Malate	66.8	65.8
meso-Tartrate	95.3	90.6
Benzoate	93.9	93.1
EDTA	110	93.8
Citrate	96.0	99.4

¹ The activity of ChDDO with no inhibitor was 100%.

² Purified from *E. coli* Rosetta (DE3)/pECD5.

総括

1. 酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 の D-アスパラギン酸酸化酵素の cDNA を単離し、塩基配列を明らかにした。
2. N 末端インテインタグおよび His タグ融合 ChDDO の発現を検討したが、インテインタグ融合酵素は封入体を形成した。また、His タグ融合酵素は発現しなかった。
3. 組換え ChDDO 発現ベクター pECD5 を用いた際の最適な発現条件は、宿主 *E. coli* Rosetta (DE3)、TB 培地、培養温度 30、誘導発現に用いる IPTG の終濃度 1.0 mM、誘導時間 6 時間だった。
4. *E. coli* Rosetta (DE3)/pECD5 無細胞抽出液から精製を行った結果、湿重量 14.1 g の菌体から比活性 123 U/mg の単一の ChDDO が 1.32 mg 得られた。
5. 組換え ChDDO の諸性質は酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 から精製した本酵素と同じ性質を示したことから、構造面に関する研究に使用できることが確認できた。