

酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 の D-グルタミン酸代謝における D-アスパラギン酸酸化酵素の役割

環境生物化学研究室 藤井 和人

指導教官：山田 良平
解良 芳夫
高橋 祥司

[背景]

生体内において、D-アミノ酸は主に中性及び塩基性 D-アミノ酸を基質とする D-アミノ酸酸化酵素 [E.C.1.4.3.3](DAO) と酸性 D-アミノ酸を基質とする D-アスパラギン酸酸化酵素 [E.C.1.4.3.1](DDO) により代謝される。我々の研究室では、生体内における遊離 D-アスパラギン酸 (D-Asp) の DDO による検出法を着想し、本酵素を容易に得ることができる微生物にその供給源を求め、多量の DDO を生産する酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 を土壤中から単離した。そして、1995 年に微生物由来として初めて DDO の完全精製に成功した。さらに、本酵母が生産する DDO (ChDDO) のいくつかの酵素学的諸特性が明らかにされ、D-Asp に対して非常に高い特異性を有することが明らかとなった。これらの実験結果より、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、非常に弱いながらも D-グルタミン酸(D-Glu)に対して活性を示す ChDDO の D-Glu 代謝における生理機能は全く不明なままであった。

[目的]

本研究では、(1) D-Glu を唯一の窒素源として培養したときの野生株 UJ1 と ChDDO 遺伝子破壊株 *ddo* の生育比較、(2) D-Glu を唯一の窒素源として培養した UJ1 株と *ddo* 株の無細胞抽出液中の DDO 活性ならびに D-グルタミン酸酵素 (DEO) 活性の比較、(3) D-Glu を唯一の窒素源として培養した UJ1 株における ChDDO 遺伝子転写産物の解析により、ChDDO の D-Glu 代謝における生理機能を明らかにすることを目的とした。

[実験と結果]

1. D-グルタミン酸を唯一の窒素源として培養した時の *C. humicola* UJ1 および D-アスパラギン酸酸化酵素遺伝子破壊株 *ddo* の生育特性

酵母 *C. humicola* UJ1 は D-アスパラギン酸 (D-Asp) を唯一の窒素源として生育させたときに ChDDO を誘導発現し、D-グルタミン酸 (D-Glu) を含む他の D, L-アミノ酸では誘導発現しないことが明らかとなっている。また、*ChDDO* 遺伝子破壊株 *ddo* が当研究室の角一により構築され、異なる窒素源および炭素源での野生株 UJ1 と破壊株 *ddo* における生育特性が比較された。その結果、D-Asp を唯一の窒素源、炭素源または窒素および炭素源とすると、野生株 UJ1 はいずれの場合においても生育できたが、破壊株 *ddo* は生育できなかった。この結果から、ChDDO は D-Asp を代謝することのできる唯一の酵素であり、D-Asp を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、同じ酸性 D-アミノ酸である D-Glu の代謝における ChDDO の役割に関する詳細な解析は行われていなかった。したがって、D-Glu を唯一の窒素源として培養したときの野生株 UJ1 と破壊株 *ddo* における生育特性を比較することにより D-Glu 代謝における ChDDO の役割を解析した。

D-Glu 代謝における ChDDO の役割を解析するため、D-Glu を唯一の窒素源として培養したときの野生株 UJ1 と破壊株 *ddo* の生育特性を比較検討した。また同時に、塩化アンモニウム (NH_4Cl) における生育特性も解析した。その結果を Fig.1 に示す。唯一の窒素源として NH_4Cl で生育させたとき、野生株 UJ1 および破壊株 *ddo* は共に同じように培養開始後速やかに増殖し、36 時間後に定常期に達した (Fig. 1a)。一方、唯一の窒素源として D-Glu で生育させたときにおいても、野生株 UJ1 および破壊株 *ddo* は共に生育した (Fig. 1b)。しかし、破壊株 *ddo* の生育は野生株 UJ1 よりも低かった (Fig. 1b)。これらの結果から、ChDDO は D-Glu 代謝にも関与することが示唆された。また、ChDDO 以外に D-Glu を代謝する酵素の存在が明らかとなった。

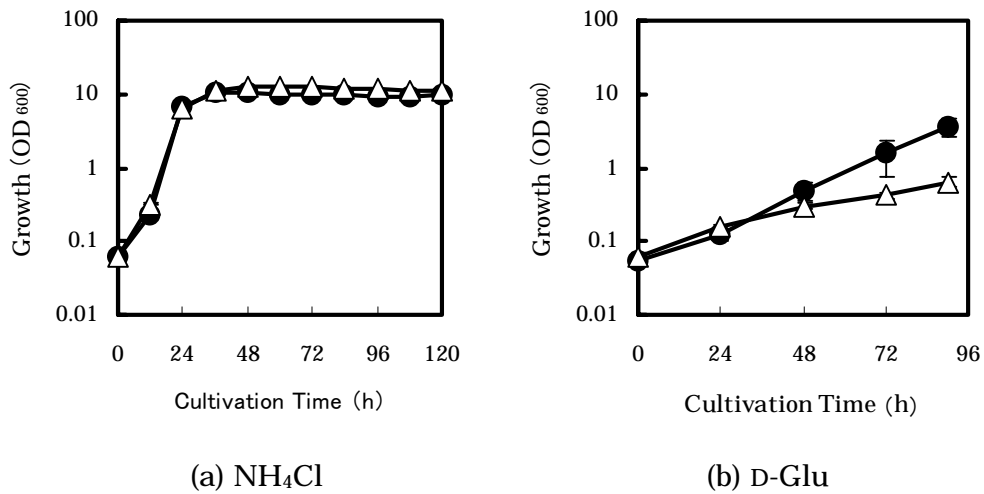


Fig. 1. (a) NH₄Cl, (b) D-Glu を唯一の窒素源とした培地における野生株 UJ1 および破壊株 *ddo* 株の生育

: *C. humicola* UJ1, : *ddo*

2. D-グルタミン酸を唯一の窒素源として培養した野生株 UJ1 と破壊株 *ddo* の DDO 活性および D-グルタミン酸酸化酵素活性の解析

唯一の窒素源として D-Glu で生育させたときに野生株 UJ1 および破壊株 *ddo* に生育特性に生育差がみられた。この差には D-Glu 代謝において、ChDDO の関与が考えられるため、*C. humicola* UJ1 および破壊株 *ddo* における DDO 活性および D-グルタミン酸酸化酵素活性 (DEO 活性) の比較検討を行った。

野生株 UJ1 および破壊株 *ddo* 株の DEO 活性と DDO 活性の結果を Fig.2 に示す。まず、Fig. 2 (b)の DDO 活性に注目すると、0 h, 90 h 共に野生株 UJ1 は破壊株 *ddo* より高い比活性を示した。次に、Fig. 2 (a)の DEO 活性に注目すると、0 h, 90 h 共に野生株 UJ1 は破壊株 *ddo* より高い比活性を示した。このことから、D-Asp の有無に関係なく、ChDDO が微量に発現している可能性が示唆された。また、この結果および 1.の生育特性の結果から、ChDDO が D-Glu 代謝に関与している可能性が強く示唆された。しかしながら、これらの比活性値は非常に低いため、検出限界による誤差だとも考えられた。

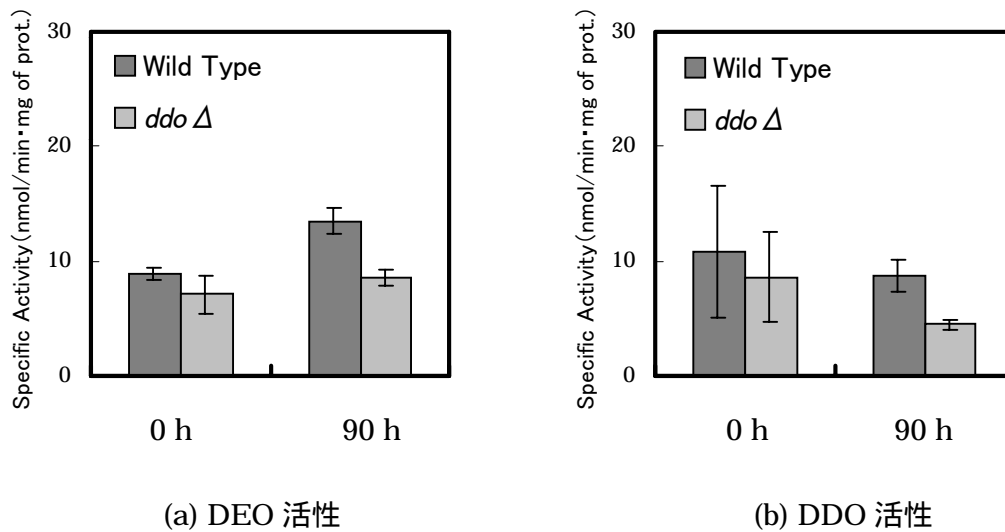


Fig. 2. D-Glu を唯一の窒素源とした培地における野生株 UJ1 および破壊株 *ddo* 株の (a) DEO 活性と (b) DDO 活性

3. 酵母 *C. humicola* UJ1 における D-アスパラギン酸酸化酵素の D-グルタミン酸に対する解毒の役割

D-Glu を唯一の窒素源にしたときの破壊株 *ddo* の生育特性の結果 (Fig. 1) から、D-Glu は本酵母の窒素源になること、また、ChDDO が D-Glu 代謝に関与する可能性が示唆された。しかし、D-Glu が生育阻害をもたらし、ChDDO がその解毒の役割を担っている可能性も考えられたことから、*C. humicola* UJ1 および破壊株 *ddo* の D-Glu 毒性に対する感受性を異なる濃度の D-Glu を含む SD 平板培地において解析した。

平板培地による感受性試験の結果を Fig.3 に示す。D-Glu の添加は、野生株 UJ1 および破壊株 *ddo* の生育を低下させた。しかし、野生株 UJ1 は D-Glu 濃度を高くしても、生育がほぼ同じであるのに対して、破壊株 *ddo* は、D-Glu 濃度を高くしていくにつれて生育が悪くなった。一方、L-Glu の添加は、野生株 UJ1 および破壊株 *ddo* 生育に影響を全く与えなかった。このことから、D-Glu は生育阻害をもたらし、ChDDO は、栄養源として D-Glu を代謝するだけでなく、D-Glu に対する解毒酵素としても機能していることが明らかとなった。

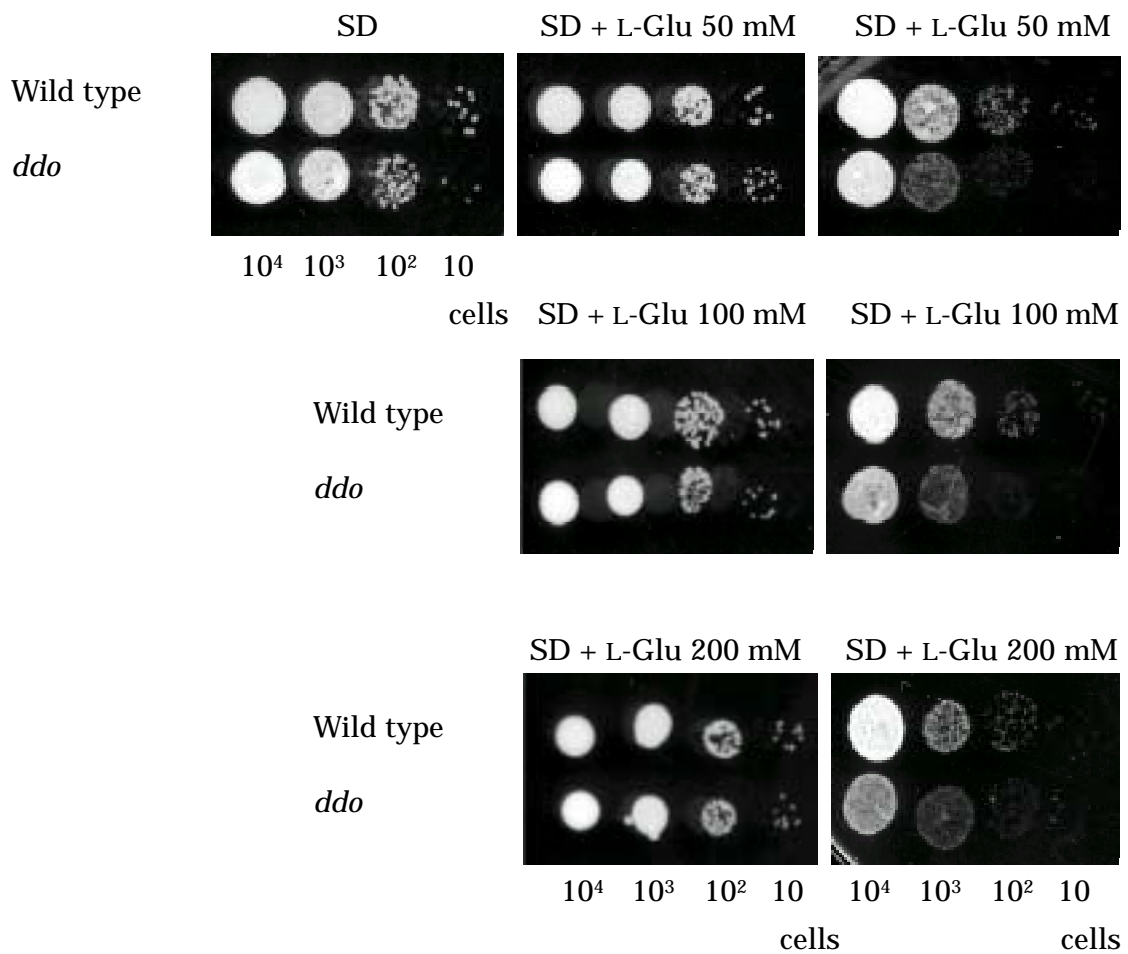


Fig.3 D-Glu の毒性に対する ChDDO の役割

4. Reverse Transcription-PCR による酵母 *C. humicola* UJ1 の D-アスパラギン酸化酵素の発現解析

Fig. 2.の DDO および DEO 活性測定の結果より、非常に低いレベルながらも ChDDO が D-Glu を唯一の窒素源にしたときにも発現している可能性が示唆された。しかし、その比活性値は非常に低いため、ChDDO が実際に発現しているかは明確ではない。そこで、D-Glu を唯一の窒素源にしたときの *ChDDO* 遺伝子の転写を解析することにより、D-Glu における ChDDO の発現を解析することにした。

以前、当研究室の高橋 祥司助手により行われた D-Glu を唯一の窒素源としたときの *ChDDO* 遺伝子のノーザン解析において、*ChDDO* の転写産物は検出されなかった。そこで、ノーザン解析では検出限界にあるほどの微量な *ChDDO* 遺伝子の転写を解析するため、Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) 法を用いることにした。

RT-PCR による *ChDDO* 遺伝子 cDNA の増幅断片を解析したアガロースゲル電気泳動の結果を Fig. 6 に示す。D-Asp を唯一の窒素源とした場合、予想された移動度(約 0.5 kbp)に *ChDDO* 遺伝子断片の増幅が確認された (Lane 1)。さらに、D-Glu (Lane 2) および NH₄Cl (Lane 3) においても同じ移動の DNA バンドが観察された。一方、逆転写反応に利用した RNA を鋳型としたネガティブコントロール D-Asp (Lane 4)、D-Glu (Lane 5)、NH₄Cl (Lane 6) では、全くバンドが検出されなかった。このことから、Lane 1~3 に観察された DNA バンドがゲノム DNA の増幅によるものではないことが明らかとなった。以上の結果より、*ChDDO* 遺伝子が誘導物質である D-Asp を含まない培地においても非常に低いレベルで転写されていることが明らかとなった。

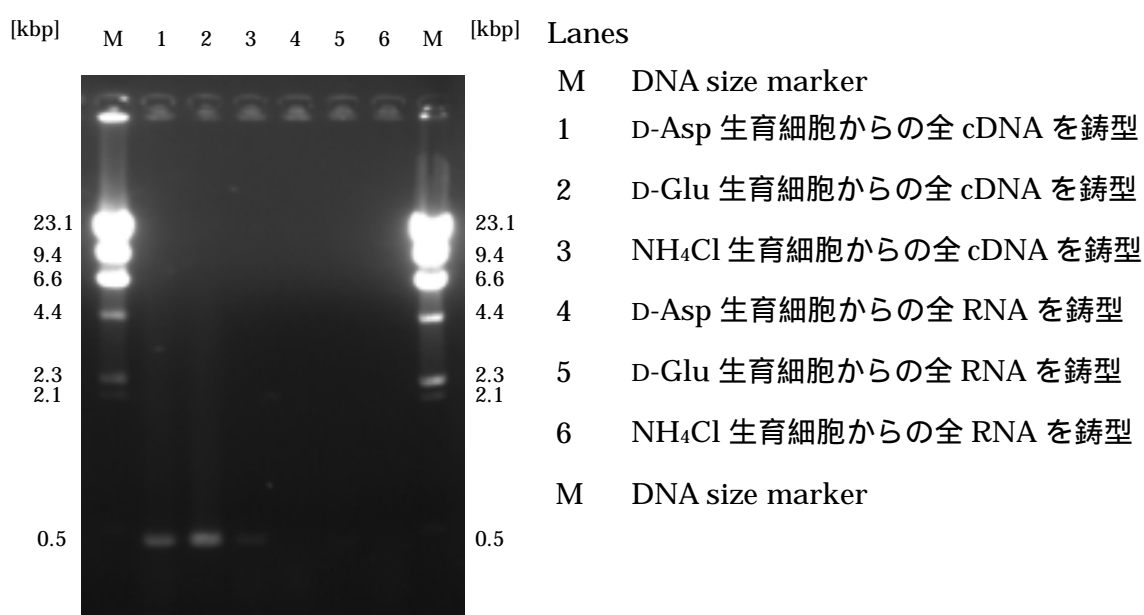


Fig. 6 RT-PCR による *ChDDO* 遺伝子の増幅断片

[総括]

- (1) 酵母 *C. humicola* UJ1 において D-アスパラギン酸酸化酵素は D-グルタミン酸を窒素源として利用する役割を担っていることが明らかとなった。
- (2) 本酵素は D-グルタミン酸の毒性に対する解毒酵素としても機能していることが明らかとなった。
- (3) 本酵素は誘導物質である D-アスパラギン酸による存在に関係なく微量に発現していることが明らかとなった。