

## D-アスパラギン酸酸化酵素変異体の構築

環境生物化学研究室 若泉 綾香  
指導教官 山田 良平  
解良 芳夫  
高橋 祥司

### 緒言

我々の研究室では、生体内における遊離 D-アスパラギン酸の D-アスパラギン酸酸化酵素(DDO)による検出法を着想し、DDOの調製が容易な微生物にその供給源を求め、酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 を土壌から単離した。そして、当研究室の氏家・有本が、1995年に微生物由来としては初めて本酵素(ChDDO)の完全精製に成功した。さらに当研究室の氏家・有本・高橋・新野・岩崎・山下らにより、ChDDOのいくつかの酵素学的な諸特性が明らかにされた。またChDDOをコードする遺伝子の単離にも成功した。

しかし他生物由来のDDOと同様、ChDDOの構造面に関する知見は乏しいままである。ChDDO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D-アミノ酸酸化酵素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になると考えられる。この研究を行うため、現在までに大腸菌を宿主とした組換えChDDOの大量発現系の構築が行われ、組換えChDDOの諸性質が酵母 *C. humicola* UJ1 から精製したChDDOと同様の性質を示す事が明らかになっている。そこで、本研究では、D-アスパラギン酸酸化酵素において酸性D-アミノ酸に対する特異性を付与しているアミノ酸残基を決定する事を目的とし、酵母 *C. humicola* UJ1 由来 D-アスパラギン酸酸化酵素の変異体を構築した。

### 実験と結果

#### 1. 部位特異的変異導入

##### 1.1 ChDDOの基質特異性に関するアミノ酸残基の推定

酵母 *Rhodotorula gracilis* 由来 D-アミノ酸酸化酵素(以下DAOと省略する)の結晶構造解析(Protein Data Bank, 1C0K)のデータをもとにSWISS-MODEL(<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>)によってChDDO活性部位の三次元構造モデルを作成した(Fig. 1)。*R. gracilis* DAOの研究報告では213番目のメチオニン残基をアルギニン残基に変換することによりDDO活性を示すようになるという報告が

ある (Fig. 1)。 *R. gracilis* DAOの213番目のメチオニン残基に相当する位置に、ChDDOでは243番目のアルギニン残基が存在する事が、モデリング解析により推定されたことから、ChDDOの243番目のアルギニン残基がChDDO活性に関与することが示唆された。そして、この推定されたChDDOの243番目のアルギニン残基の側鎖とD-アスパラギン酸の側鎖のカルボキシル基がChDDOの243番目のアルギニン残基の正電荷と相互作用すると考えられた (Fig. 2)。

また別のアプローチとしてChDDOの基質結合部位付近のアミノ酸配列とヒト・ウシDDO ( Human DDO-1, Bovine DDO ) とブタ ( Pig DAO ) ・ *R. gracilis* DAOの基質結合部位付近のアミノ酸配列をアライメントし、基質特異性に関与するアミノ酸残基の推定を行った。その結果、 *R. gracilis* DAOの213番目のメチオニン残基に相当する位置に存在するChDDOのアミノ酸残基は230番目のアルギニン残基であることが示唆された (Fig. 3)。また、ヒト・ウシDDOにおいても同様の位置にアルギニン残基が存在していた。

これらの解析結果から、230番目と243番目のアルギニン残基がChDDOの基質特異性に関与することが推定されたため、230と243番目のアルギニン残基を中性アミノ酸であるアラニン残基へと変異させたChDDO変異体の構築を検討した。

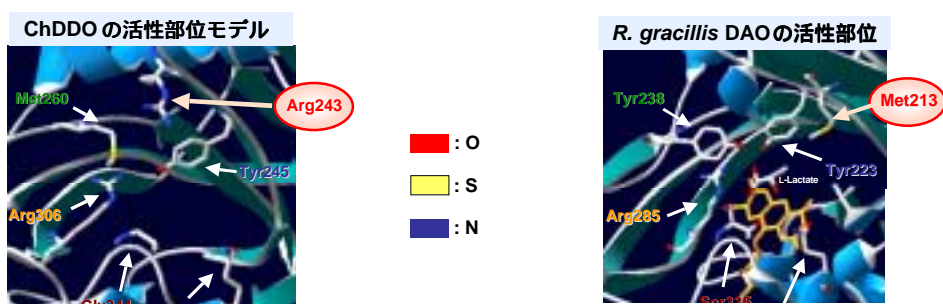


Fig. 1 ChDDO 活性部位のモデリング解析

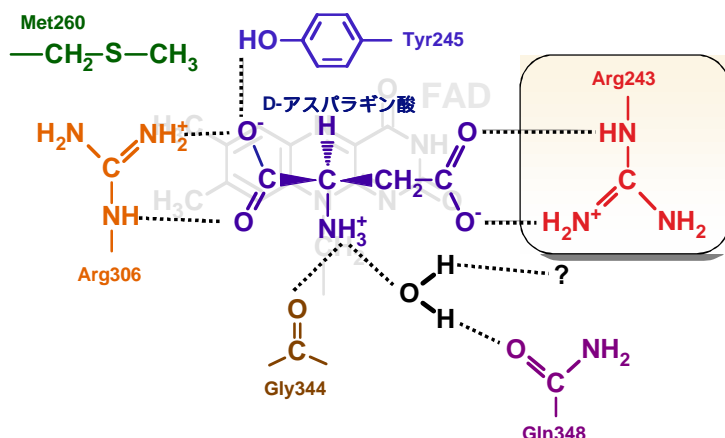


Fig. 2 ChDDO 活性部位における D-アスパラギン酸の相互作用モデル

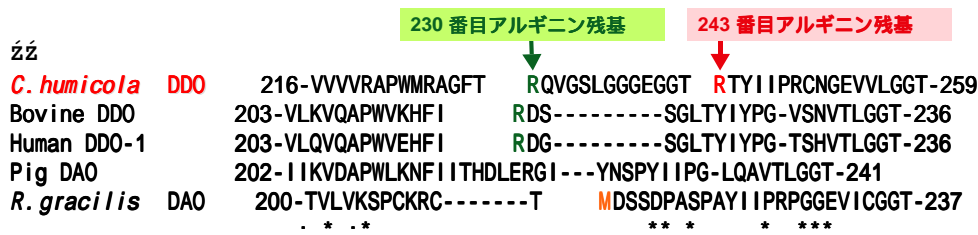


Fig. 3 様々な DDO と DAO の基質結合部位付近のアライメント

### 1.2 ワンデイミュタジェネシスによる部位特異的遺伝子変異導入法

遺伝子変異導入法に、最も容易に短時間で変異がかけられるワンデイミュタジェネシス法を用いたが、変異 *ChDDO* 遺伝子の構築を確認することができなかった。

### 1.3 メガプライマー法を用いた部位特異的遺伝子変異導入法

ワンデイミュタジェネシスによる変異 *ChDDO* 遺伝子の構築がうまくいかなかったため、メガプライマー法による変異導入を検討した。

メガプライマー法で変異を導入した R230A*ChDDO* 遺伝子 (230 番目のアルギニン残基をアラニン残基に変換、レーン 1) と R243A*ChDDO* 遺伝子 (243 番目のアルギニン残基をアラニン残基へ変換、レーン 2) をアガロースゲル電気泳動で解析したところ、レーン 1, 2 に *ChDDO* 遺伝子の全長である 1.1 kbp 付近にバンドが検出された (Fig. 4)。この結果より、R230A*ChDDO* と R243A*ChDDO* 遺伝子の増幅が確認できた。

Fig. 4 で確認できた変異 *ChDDO* 遺伝子を pBluescript II KS(+) の *Eco* RV サイトへクローニングし、*Nde* I / *Hin* d 切断によりベクターへのクローニングを確認した (Fig. 5)。アガロースゲル電気泳動解析の結果、レーン 1-5 (R230A*ChDDO*) 及びレーン b, d, e (R243A*ChDDO*) に 1.1 kbp と 3.0 kbp のバンドが検出されたことから、変異 *ChDDO* 遺伝子のベクターへのクローニングが確認できた (Fig. 5)。

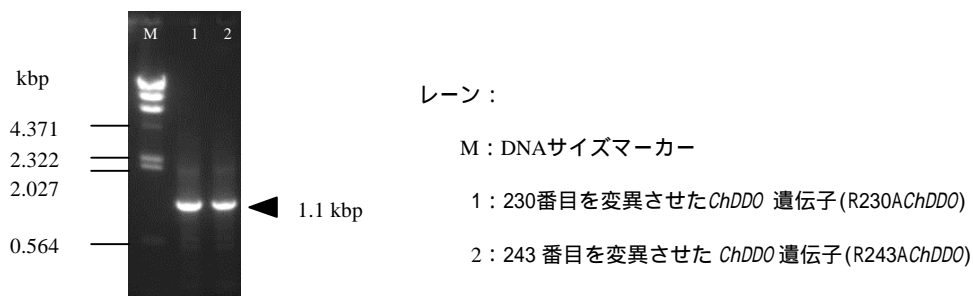
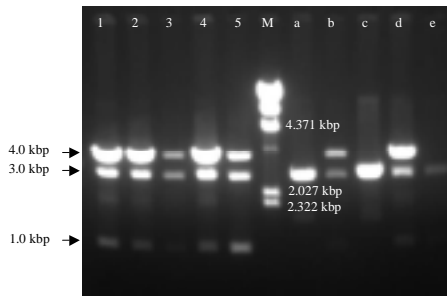


Fig. 4 メガプライマー法による変異 *ChDDO* 遺伝子増幅の



レーン :

M : DNA サイズマーカー

1-5 : pKS DDO R230A プラスミド

a-e : pKS DDO R243A プラスミド

(すべて *Nde* I と *Hin* d で切断)

Fig. 5 変異 *ChDDO* 遺伝子のクローニングの確認

#### 1.4 R230A *ChDDO* と R243A *ChDDO* 遺伝子の塩基配列決定

PCR により増幅した R230A *ChDDO* と R243A *ChDDO* 遺伝子の塩基配列を解析し、目的以外場所に変異が生じていない事を確認した。

## 2. *ChDDO* 変異体の大腸菌における発現

### 2.1 *ChDDO* 変異体発現ベクターの構築

大腸菌発現用ベクターである pET25b (Fig. 6)を *Nde* I と *Hin* d で切断し、そこへ PCR により増幅した変異 *ChDDO* 遺伝子断片を挿入した。これにより、C 末端に His-tag が付加された *ChDDO* 変異体を発現するベクター (pETCD2R230A, pETCD2R243A)を構築した (Fig. 7)。

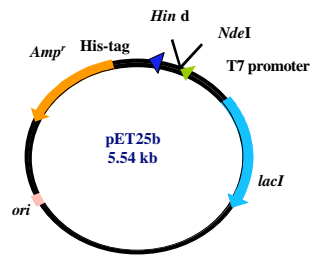


Fig. 6 大腸菌発現用ベクター

### 2.2 発現用大腸菌 *E. coli* Rosetta (DE3) への pETCD2R230A および pETCD2R234A の導入

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発現用大腸菌 *E. coli* Rosetta (DE3) に、構築した *ChDDO* 変異体発現ベクター pETCD2R230A および pETCD2R234A を導入した。

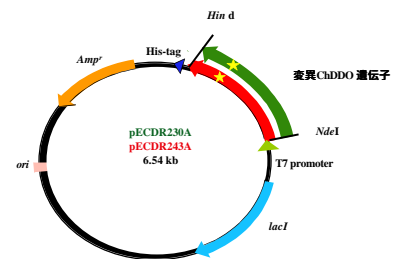


Fig. 7 変異 *ChDDO* 遺伝子発現ベクター

### 2.3 *ChDDO* 変異体の大腸菌 Rosetta (DE3)における発現

作成した形質転換体を培養し、*ChDDO* 変異体を発現させた。対照として、*E. coli* Rosetta (DE3) / pET25b と *E. coli* Rosetta (DE3) / pECD25b (変異を有しない *ChDDO* 発現

ベクター)も同様の条件で培養した。

ChDDO 変異体を発現させた大腸菌から調製した粗抽出液中の DDO 活性を Fig. 8 に示した。変異を有しない ChDDO を発現させた粗抽出液の比活性 (Wild) と ChDDO 変異体を発現させた粗抽出液の比活性 (R230A, R243A) を比較すると、230 番目のアルギニン残基をアラニン残基へと変異させることによりその活性は半減し (R230A)、243 番目のアルギニン残基をアラニン残基へと変異させると DDO 活性はほぼ無くなった (R243A)。この活性の減少が、ChDDO の発現量や不溶性画分に沈澱したことは無関係であることが SDS-PAGE およびウエスタンブロット解析から明らかとなった (Fig. 9)。

したがってこれらの結果より、ChDDO の 243 番目のアルギニン残基が酵素活性においてもっとも重要な役割を果たしていることが示唆された。

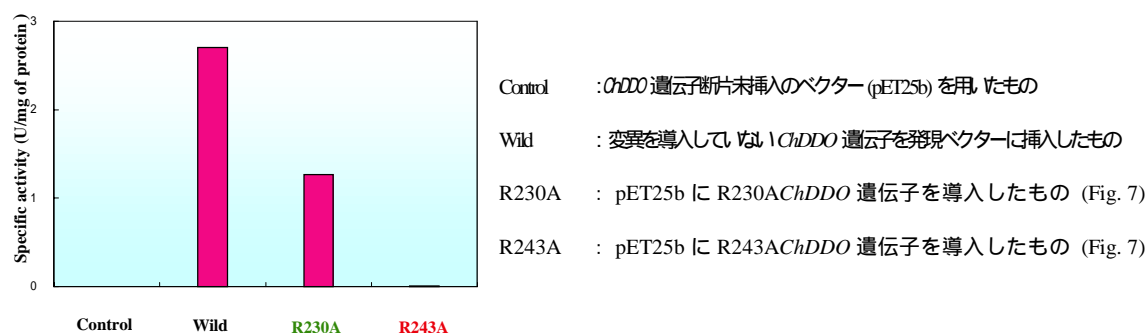


Fig. 8 ChDDO 変異体発現形質転換体の粗抽出液における DDO 活性

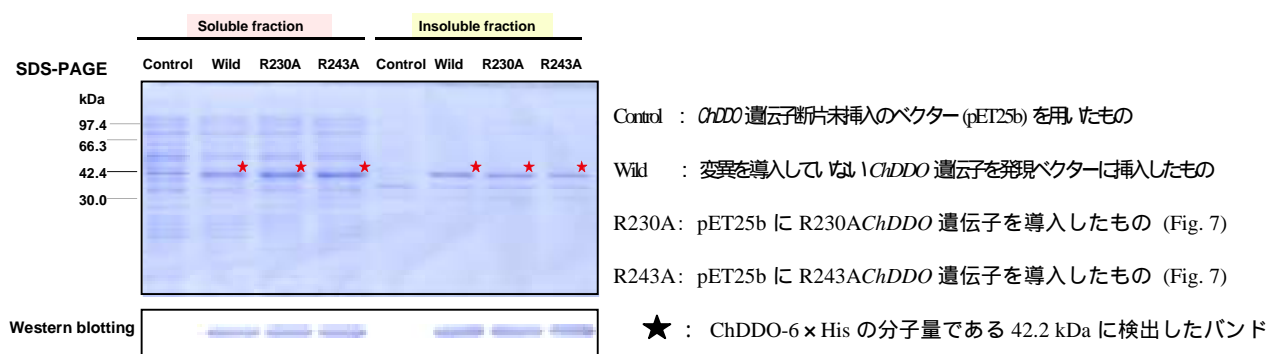


Fig. 9 大腸菌粗抽出液中の ChDDO 変異体の SDS-PAGE および Western blot 解析

粗抽出液はタンパク質 5.0 μg をアプライした。不溶性画分は粗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、粗抽出液と同体積アプライした。分離ゲルには 12 % のアクリルアミドゲルを用いた。

## 総括

ChDDO 活性の部位のモデリング解析により ChDDO の Arg243 が酸性D-アミノ酸の基質特異性に関与している可能性が示唆された。また、別のアプローチとして、様々な DDO と DAO の基質結合部位付近のアミノ酸配列のアライメントの結果から 230番目のアルギニン残基が酸性D-アミノ酸に対する基質特異性に関与する事が示唆された。これら、推測された 230 番目と243 番目のアルギニン残基を、容易に変異がかけられるワンデイミュータジェネシスを用いてアラニン残基に変換する事を試み、PCR産物をアガロースゲル電気泳動で確認したが、増幅を確認することができなかった。

次にメガプライマー法を用いてアラニン残基に変換する事を試み、PCR産物の増幅がアガロースゲル電気泳動で確認したところ、増幅が確認できた。よって、メガプライマー法を用いて変異体 *ChDDO* 遺伝子を構築した。

構築した変異体 *ChDDO* 遺伝子を塩基配列解析により目的部位に変異が導入された事を確認し、全配列の解析結果から目的部位以外に変異が導入されていないことを確認した。

変異体 *ChDDO* 遺伝子の大腸菌発現系を構築し、変異体 *ChDDO* 遺伝子の発現産物を DDO 活性、SDS-PAGE、ウエスタンブロット 解析した結果 ChDDO の 230 番目と 243 番目のアルギニン残基が酵素活性に重要なアミノ酸残基であることが示唆された。また、酵素活性において、243 番目のアルギニン残基に変異をかけたものが大幅に減少したことから、243 番目のアルギニン残基のほうが酵素活性に対する特異性に関与することが示唆された。