

酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 由来 D-アスパラギン酸酸化酵素の基質結合部位の解析

環境生物化学研究室 丸山 和大

指導教官 山田 良平, 解良 芳夫, 高橋 祥司

1. 背景と目的

D-アスパラギン酸酸化酵素 (D-aspartate oxidase 以下 DDO) は、酸性 D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒し、対応する α -ケト酸とアンモニアに変換するフラビン酵素である。DDO とは別に D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する酵素に D-アミノ酸酸化酵素 (D-amino acid oxidase 以下 DAO) がある。DAO は主に中性アミノ酸を基質とする。

現在 DAO では、*Rhodotorula gracilis* DAO(以下 RgDAO) において結晶構造解析や、様々な変位導入実験が行われ、中性、塩基性 D-アミノ酸に対する基質特異性に関与する残基は明らかにされつつある。それに対し、DDO では未だに結晶構造解析が行われておらず、さらに、変異導入による解析も行われていない。

本研究は *Cryptococcus humicola* UJ1 由来の DDO (以下 ChDDO) における基質特異性に関わる残基を特定しその役割を解析する。

2. 基質特異性に関わる残基の推定

DAO と DDO は触媒残基の構造が類似していると考えられ、さらに RgDAO については、基質特異性に M213 が関与しているとわかっている。また、RgDAO の結晶構造解析のデータから、ウシ腎 DDO の立体構造モデルが推定され、ウシ腎 DDO においては R216 が基質特異性に関与していると推定された。

これらの報告から、以下の方法によって ChDDO 上の 2 つの残基が基質特異性に関与する残基の候補として推定された。

アライメント解析によってウシ腎 DDO の R216 に対応する ChDDO の R230 の残基が推定された (Fig. 1)。

		R230	
<i>C.humicola</i> DDO	221-	APIWMRAGFTRQVGSLLGGEGGTRTYI IPRCNG	-252
Bovine DDO	208-	APIWKHFIRDS-----SGLTYIYPG-VS	-229
Human DDO-1	208-	APIWEHFIRDG-----SGLTYIYPG-TS	-229
Pig DAO	209-	APWLKNFII THDLERGI---YNSPYIIPG-LQ	-236
<i>R.gracilis</i> DAO	206-	SPCKRC-----TMDSSDPASPAYI IPRPGG	-230

Fig. 1 ChDDO と他種 DAO , DDO との配列比較

立体構造モデル上において、RgDAO の M213 に対応する ChDDO の R243 残基が推定された (Fig. 2)。

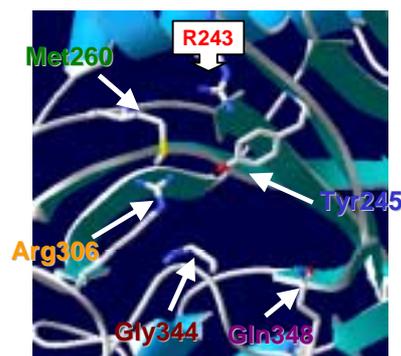


Fig. 2 ChDDO の三次元モデル

3 . R230A , R243A の作成

これらの推定から、ChDDO は塩基性アミノ酸である Arg 側鎖を使用し、酸性の D-アミノ酸に対する特異性を発揮していると考えられる。そこで、推定した Arg を Site-directed mutagenesis により、中性アミノ酸である Ala に置換することで、DDO 活性の消失や様々な性質変化が期待できる。それらを解析することで、推定された残基の役割を考察する。

Fig. 3 の様に R230 を Ala に置換した酵素を R230A、R243 を Ala に置換した酵素を R243A とした。Wild-type と示すものはアミノ酸の置換を行っていない元々の酵素のことである。

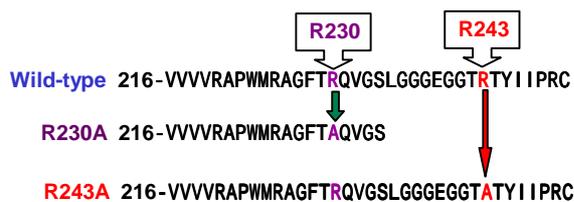


Fig. 3 ChDDO の変異酵素の作成

4 . ChDDO , R230A , R243A の発現

前項で得た R230A , R243A の酵素は、Fig. 4 に示すような発現用プラスミドとして構築され、Table 1 に示した条件によって発現された。

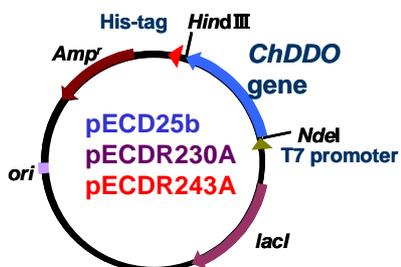


Fig. 4 発現用プラスミド

Table 1 発現条件

•Medium : TB
•Temperature : 30°C
•Induction time : 6 h
•Host strain : <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)

5 . R230A , R243A の精製

誘導発現させた酵素を以下の方法で精製を行い、SDS-PAGE 上でほぼ単一に精製されたことが確認できた (Fig.6)

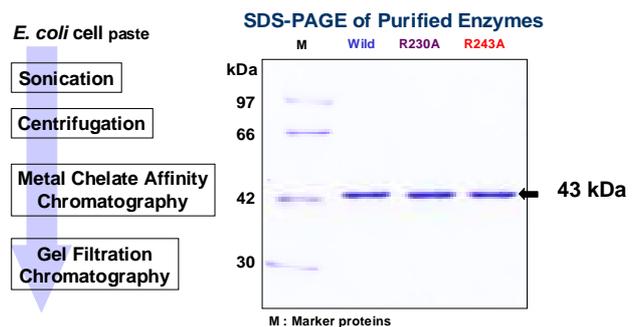


Fig.6 ChDDO , R230A , R243A の精製方法と SDS-PAGE による確認

6 . 精製酵素の比活性の比較

各精製酵素の比活性の比較を行った。R230A は Wild-type 酵素の約 13 % の比活性を示し、R243A では比活性がかなり低かった。(Fig. 7)。

比活性の比較では、基質の結合では R243 の残基が基質の結合に関わっていると言える。

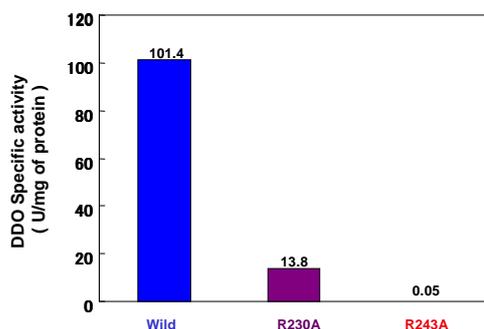


Fig. 7 各精製酵素の比活性の比較

7. 特徴付け

D-Asp に対する K_m 値の比較 (Table 2)

D-Asp に対する親和性をあらわす K_m 値は、Wild-type 酵素より、R230A、R243A では増加していた。さらに、R230A、R243A では K_m 値はほぼ同じ値であった。

K_m 値の比較では、D-Asp の結合に対する親和性は R230A、R243A の双方とも変わらない。

可視スペクトルの変化 (Fig. 8)

ChDDO はフラビン酵素であり、360, 450 nm のピークを持つ可視スペクトルを持つ。Wild-type の場合、D-Asp を添加すると、触媒反応の進行と共に、そのピークは消失する。また、ChDDO に対する競合阻害剤であるマロン酸を添加すると、そのピークは長波長側にシフトする (Red-shift)。これらの傾向は R230A には見えたが、R243A においては、D-Asp の添加を行った後、ピークの消失にかなりの時間を要した。また、R243A にマロン酸を添加した場合、Red-shift はほとんど起こらなかった。

R243A においては、D-Asp は結合するが、正しく配位していないと考えられる。さらに、R243A はマロン酸には結合しない。

Table 2 D-Asp に対する酵素学的諸特性の比較

Amino acid	K_m ¹ (mM)	V_{max} ¹ (U/mg)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
D-Aspartate				
ChDDO ²	2.9 ± 0.23	123.9 ± 3.00	82.6	28300
Wild-type	2.5 ± 0.26	104.0 ± 3.14	74.5	29922
R230A	13.4 ± 3.13	21.8 ± 3.08	15.6	1165
R243A	14.4 ± 3.55	0.1 ± 0.01	0.1	5

¹ Means ± SE

² *E. coli* Rosseta (DE3)/pECD5 より精製 Hisタグ非融合 ChDDO

³ R243A についてはD-Glu、NMDA の値は活性が低かったため計測していない。

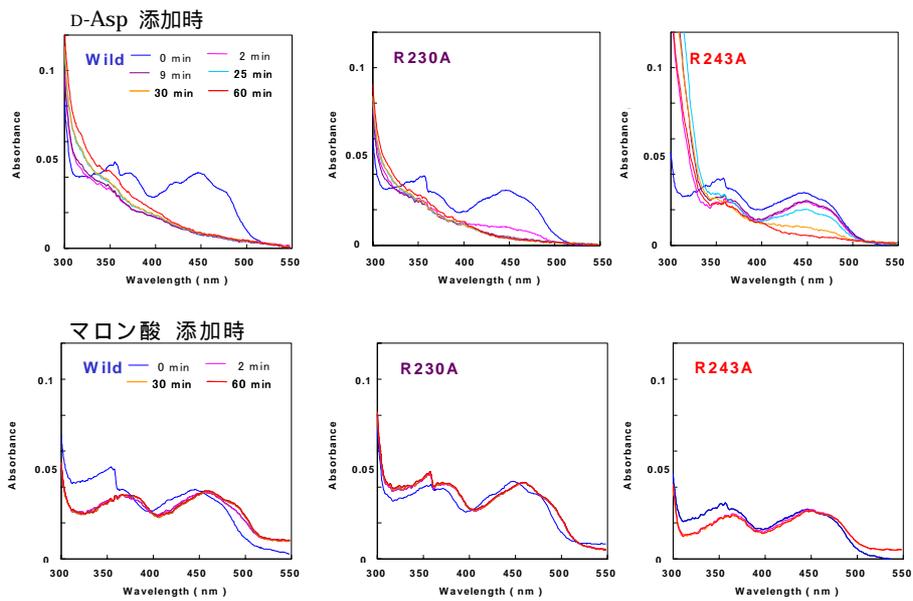


Fig. 8 各変位酵素の可視スペクトルの経時変化の比較

8. まとめ

- ・比活性の比較では、基質の結合で R243 の残基が基質の結合に関わっていると言える。
 - ・可視スペクトル変化から、R230A に比べ、R243A は D-Asp の触媒に時間がかかることがわかる。さらに、マロン酸添加による Red-shift が起こらないことから、R243A はマロン酸が結合していない。
- D-アミノ酸に対する基質特異性に関する残基は R243 の方である (Fig. 9)。

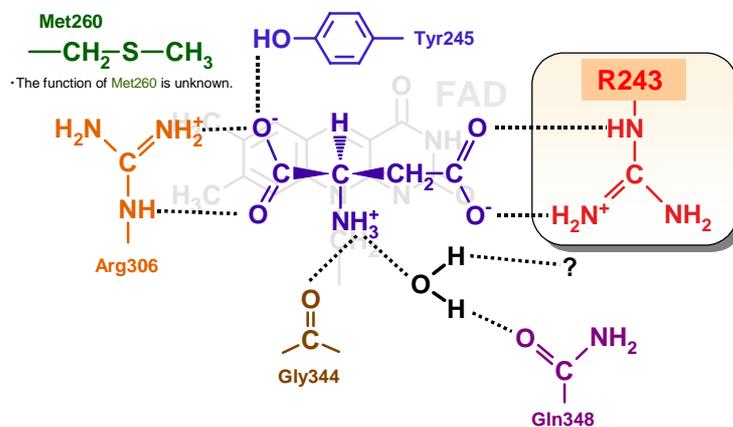


Fig. 9 D-Asp と ChDDO の結合モデル