

# 酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 由来 D-アスパラギン酸酸化酵素の 基質特異性決定因子に関する研究

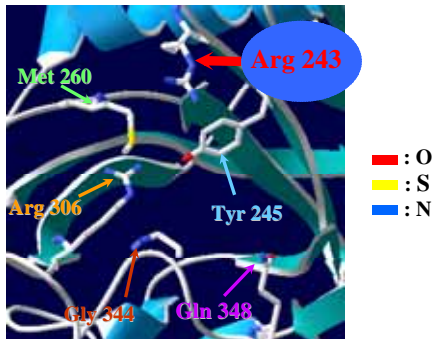
環境生物化学研究室 松本俊介

指導教官 山田良平, 解良芳夫, 高橋祥司

## 1. 研究背景

D-アスパラギン酸酸化酵素(DDO)は、酸性 D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒するフラビン酵素であり、同様の反応を触媒する D-アミノ酸酸化酵素(DAO)の基質である中性および塩基性 D-アミノ酸には作用しない。DDO は様々な生物種から精製され、その酵素学的諸特性が詳細に明らかにされるとともに、その遺伝子も複数単離されている。しかしその一方で、その構造と機能相関に関する知見は少ないままである。我々は先に酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 由来 DDO(ChDDO)において、243 番目の Arg が酸性 D-アミノ酸の特異性に重要な役割を果たしている可能性が示唆された(Fig. 1, Fig. 2)。本研究では、その役割を詳細に解析するために、PCR を利用した部位特異的変異導入法により、243 番目の Arg を酸性アミノ酸である Asp、Glu に、また中性アミノ酸である Met、塩基性アミノ酸である Lys に置換した変異体 ChDDO を構築し、さらに 243 番目の Arg の役割を解明することにした。

Active site model of ChDDO



This model was generated by SWISS-MODEL using the crystal structure of the yeast *R. gracilis* DAO (PDB, 1C0K) as a template.

Fig. 1 Arg 243 残基の推定

## 2. 基質特異性決定因子の決定

我々の研究室ではすでに、推定された Arg243 残基変異導入実験を行った。Arg243 残基を中性アミノ酸であるアラニンに置換することで、野生型(Wild-type)と比較して、顕著に DDO 活性の減少が見られた。このことから、Arg243 残基は基質との相互作用に重要な役割をしていると示唆された。

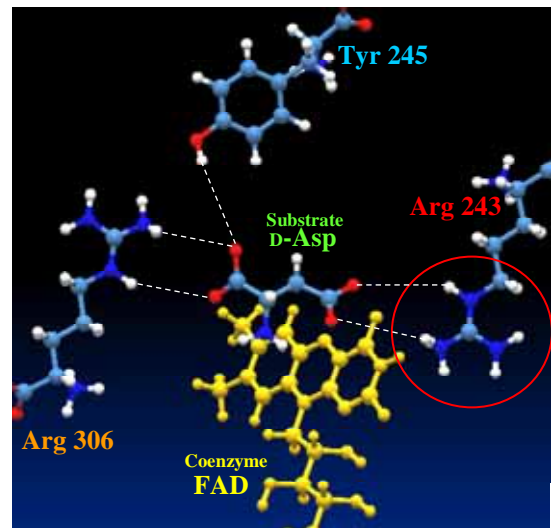


Fig. 2 推測された基質 D-Asp と ChDDO の結合モデル

## 3. 本研究の目的

本研究では、さらにこの R243 残基の役割、基質特異性の関与を解明するために、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸(Asp, D)、グルタミン酸(Glu, E)、中性アミノ酸であるメチオニン(Met, M)、塩基性アミノ酸であるリシン(Lys, K)に置換した 4 つの変異体を構築し、その解析を行った。

		<b>R243</b> ↓
Wild-type	216-VVVVRAPWMRAGFTRQVGSLLGGGEGGT	<b>K</b> TYI   IPRCNGEVVLGGT-259
R243M	216-VVVVRAPWMRAGFTRQVGSLLGGGEGGT	<b>M</b> TYI   IPRC
R243D	216-VVVVRAPWMRAGFTRQVGSLLGGGEGGT	<b>D</b> TYI   IPRC
R243E	216-VVVVRAPWMRAGFTRQVGSLLGGGEGGT	<b>E</b> TYI   IPRC
R243K	216-VVVVRAPWMRAGFTRQVGSLLGGGEGGT	<b>K</b> TYI   IPRC

#### 4. 各変異体酵素の活性値

各変異体酵素の活性値を Fig. 3 に示す。

R243M、R243E、R243K では D-アスパラギン酸に対する活性は野生型よりも低かった。その一方で、R243D では予想に反して約 2 倍の活性値を示した。また、R243M と R243E は D-Ala に対しても活性を示し、さらに R243E では D-Arg に対しても弱いながらも活性を示した。

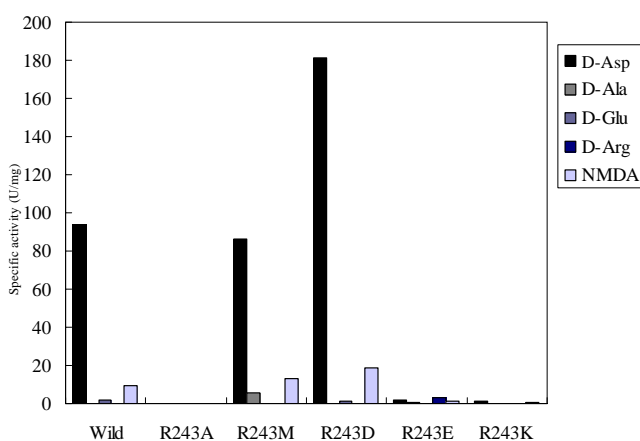


Fig. 3 精製酵素における比活性

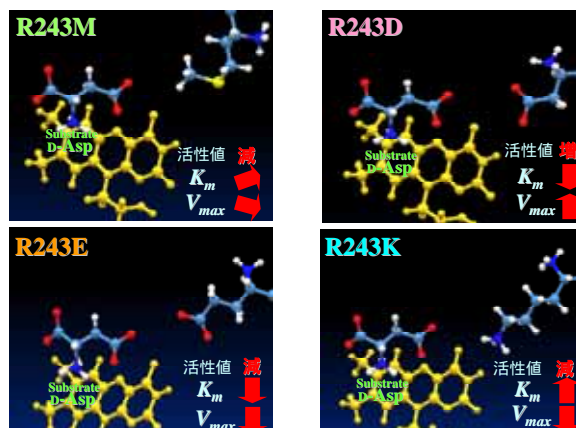


Fig. 4 各変異体酵素の側鎖とキネティックパラメータ

#### 5. 各変異体酵素のキネティックパラメータ

各変異体酵素のD-アスパラギン酸、D-グルタミン酸に対する $K_m$ 、 $V_{max}$ 値をTable .1, Fig. 4 に示す。

R243E、R243D では D-アスパラギン酸への親和性が増加し、R243A、R243K、R243M では減少した。また R243D、R243K では D-グルタミン酸への親和性が増加した。

Table 1. 各変異体酵素のキネティックパラメータ

Substrate		$K_m^1$ (mM)	$V_{max}^1$ (U/mg)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1} \cdot M^{-1}$ )
D-Aspartate	Wild-type	2.5 ± 0.26	104 ± 3.14	74.5	29922
	R243A	14.4 ± 3.55	0.1 ± 0.01	0.1	5
	R243M	3.8 ± 2.00	87.4 ± 14.1	62.6	16391
	R243D	1.0 ± 0.40	168.4 ± 13.8	120.6	116002
	R243E	2.0 ± 0.94	1.8 ± 0.22	1.3	645
	R243K	10.3 ± 2.54	1.9 ± 0.28	1.4	132
D-Glutamate	Wild-type	105.9 ± 9.39	2.3 ± 0.09	1.6	16
	R243A	-	-	-	-
	R243M	-	-	-	-
	R243D	4.6 ± 1.67	1.3 ± 0.19	0.9	201
	R243E	-	-	-	-
	R243K	2.8 ± 1.01	0.3 ± 0.03	0.2	76

<sup>1</sup> Means ± SE

<sup>\*</sup>R243A, R243M, R243EについてはD-Gluの値は活性が低かったため計測していない。

#### 6. 可視吸光スペクトル

フラビン酵素は特有のピークは 360 nm と 450 nm に現れる。すべての変異体酵素は FAD を有していた。各変異体により、D-アスパラギン酸、マロン酸の結合能に違いが生じた。

#### 7. 結論

各変異体酵素の活性値、キネティックパラメータ、可視吸光スペクトルの結果から、R243 残基が基質との相互作用に重要な役割をしていると結論できた。