

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 13 年度博士課程 進学

氏名 Sarower Md. Golam

指導教官名 阿部 宏喜

論文題名 Molecular and Biochemical Studies on Carp D-Amino Acid Oxidase
(コイの D-アミノ酸オキシダーゼに関する分子生物学的および生化学的研究)

D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO, EC 1.4.3.3) は 1935 年に Krebs によって発見された立体特異的な D-アミノ酸分解酵素であるが、細菌類以外には D-アミノ酸は存在しないと考えられていたため、その生理機能は長い間不明であった。本酵素は FAD を補酵素とする典型的なフラビン酵素であり、中塩基性 D-アミノ酸の対応する 2-オキソ酸への酸化的脱アミノ反応を触媒する。酸性 D-アミノ酸は進化的に起源が同一と考えられている D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO, EC 1.4.3.1) によって分解され、両オキシダーゼ共に細菌類から哺乳類に至るまで広く分布することが知られており、これまで哺乳類と真菌類では DAO の立体構造まで広範に研究が行われている。DAO の生理機能については、細菌類では細胞壁を構成するペプチドグリカンの構成成分である D-アミノ酸の分解に関与するとされ、動物では外因性あるいは内因性の D-アミノ酸の分解酵素であると考えられているが、不明な点が多い。一方、最近哺乳類脳では、D-セリンが *N*-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) レセプターのグリシン結合部位の内因性アゴニストであることが明らかにされ、セリンラセマーゼがクローニングされており、DAO は D-セリン濃度の調節に関与するとされている。

哺乳類における D-アミノ酸は微量であるが、最近無脊椎動物、特に甲殻類や二枚貝類等の組織中に多量の遊離 D-Ala が検出されており、D-Ala は L-Ala とともに高浸透環境下で蓄積されるため、細胞内等浸透圧調節の有効なオスモライトであると考えられている。さら

に、これら甲殻類や二枚貝類では、D-Ala と L-Ala の相互変換を触媒するアラニンラセマーゼ活性が確認され、クルマエビからクローニングされている。したがって、これら無脊椎動物を捕食する魚類は陸上脊椎動物と比べて D-Ala を摂取する機会が多いと考えられ、DAO および DDO の生理機能を明らかにするためのよいモデルであると思われる。

本研究では、このような背景の下、コイ *Cyprinus carpio* 肝臓から DAO の cDNA クローニングを行い、その生理機能についての検討を行ったもので、得られた研究成果の概要は以下の通りである。

1. コイ肝臓 DAO の cDNA クローニング

D-Ala を含む餌を 14 日間投与 (5 $\mu\text{mol/g}$ 体重 \cdot 日) したコイの肝臓から mRNA を抽出し、ゼブラフィッシュの推定 DAO 部分配列および他生物種 DAO の保存領域の配列を基にした縮合プライマーを用いる RT-PCR により、792-bp の cDNA 断片が得られた。この断片をプローブとしてコイ肝臓から作成した cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、全長 1,294-bp の cDNA を哺乳類以外の動物では初めてクローニングした。この cDNA は 1,041-bp の翻訳領域、75-bp の 5'非翻訳領域、160-bp の 3'非翻訳領域および 16-bp のポリ(A)⁺テールからなり、347 残基のアミノ酸をコードしていた。

ヒト、ブタ、マウス腎臓および微生物 DAO との演繹アミノ酸配列の比較から、コイ DAO はヒトおよびブタ DAO と同一のアミノ酸残基数を示し、N 末端近傍には FAD 結合部位と考えられる共通配列 GXGXXG が存在し、動物ではこの配列はすべて GAGVIG であった。また、C 末端の 3 残基 S(K/H/R)L はペルオキシソームシグナルと考えられ、コイ DAO では 2 残基目が Arg で哺乳類の His とは異なっていた。また、ブタ DAO において活性中心残基とされている Tyr224、Tyr228 および Arg283 はコイ DAO においても保存されていた。コイ DAO はヒト、ブタおよびマウス DAO とそれぞれ 62、60 および 61% のアミノ酸同一率を示し、細菌および真菌類とのそれは 21~29% であった。したがって、DAO は細菌から哺乳類に至るまで比較的良好に保存された酵素と考えられる。

2. コイ DAOcDNA の大腸菌における発現と組換え体 DAO の精製および酵素学的性質

コイ DAOcDNA の全翻訳領域を pET 11c ベクターに組み込み、大腸菌 AD494(DE3)pLysS 株で発現を試みたところ、可溶性の組換え体 DAO が高い活性で得られた。そこで、大量培養を行い、コイ組換え体 DAO を DEAE-Toyopearl、Phenyl-Toyopearl および SephacrylTM HR カラムクロマトグラフィにより単一にまで精製した。組換え体 DAO は V_{max} 、 K_m および k_{cat}/K_m 値から見て、D-Ala に対して最もよく作用し、次いで D-Val、D-Pro、D-Phe、D-Tyr、D-Leu および D-Ile に対して作用しやすく、D-Trp、D-Arg、D-Thr および D-Cys には作用しにくいことが判明した。D-Asp および D-Glu には全く作用しなかった。コイ組換え体 DAO

は比較的高い熱および pH 安定性を示した。活性は Hg^+ および Ag^+ により完全に阻害され、クレアチニン、PCMB および安息香酸により拮抗的に阻害され、 K_i はそれぞれ 5.1、6.0 および 12.5mM であった。

3. コイ DAO のブタおよび *Rhodotorula gracilis* DAO との立体構造の比較

コイ DAO の 3 次元分子構造モデルを SWISS-MODEL を用いて構築し、ブタ腎臓および酵母 *R. gracilis* DAO の結晶構造解析データとの比較を行った。これらの 3 次元分子構造モデルはよく一致していたが、活性部位ループはブタ DAO と比べて短かった（コイ 9 残基、ブタ 13 残基）。このループには Tyr224 が存在し、比較的広い基質特異性と基質の α -アミノ基との相互作用を担うものであることが推定された。酵母 DAO ではこのループは存在しないものの、Tyr238 が相似た位置に存在し、同様の機能を果たしているものと考えられた。酵母 DAO には長い C 末端ループが存在したが、コイおよびブタ DAO には欠如していた（酵母 21 残基、コイ 6 残基、ブタ 4 残基）。この C 末端ループは酵母 DAO のより安定な ‘head to tail’ 二量体構造を可能にし、一方コイ DAO ではブタ DAO と同様に ‘head to head’ 二量体構造を取ることが判明した。

4. コイ DAO の細胞内局在性

コイ DAO の一次構造には哺乳類および酵母 DAO のそれと同様に、C 末端に 3 残基のペルオキシソームシグナルの存在が認められた。そこでこの点を確認するため、ペルオキシソーム増殖促進剤のクロフィブレート 0.3% 含む餌を 2 週間投与したコイの肝臓および腎臓を用いて、ショ糖濃度勾配超遠心分離法により細胞分画を行った。ペルオキシソームマーカー酵素であるカタラーゼ、ミトコンドリア酵素である NADH シトクローム *c* レダクターゼ、ミクロソームマーカーのグルコース 6-ホスファターゼおよびサイトソルマーカーの乳酸脱水素酵素を用いてこれら酵素活性との分布を比較したところ、コイ肝臓および腎臓の両組織において、DAO および DDO はカタラーゼと同様にペルオキシソームに局在することが明らかとなった。この結果は哺乳類における DAO および DDO の細胞内局在性と一致していた。

5. コイ諸組織における DAO の D-Ala による酵素誘導

コイに D-Ala を含む餌を 15 および 30 日間投与し ($5 \mu\text{mol/g}$ 体重・日)、諸組織中の DAO 活性を測定し、酵素誘導の有無を確認した。その結果 DAO 活性は腸管、肝臓および腎臓でそれぞれ 8、3 および 1.5 倍に上昇したが、脳における活性上昇は認められなかった。同様の方法で D-Glu および D-Asp を投与したコイにおいては、いずれの組織でも DAO および DDO の誘導は認められなかった。また、14 日間 D-Ala を投与したコイの肝臓では投与 1

日目から DAO の mRNA の発現が認められ、投与期間中上昇傾向を示した。これに伴って DAO 活性も上昇し、14 日目には 5 倍に達した。しかしながら、mRNA と DAO 活性の上昇傾向は完全には一致しておらず、コイ肝臓における DAO 合成は主として転写レベルで制御されるものの、その他の制御機構も存在することが予測された。一方、14 日目のコイにおける mRNA の発現は腸管で最も強く、次いで肝臓および腎臓の順で、筋肉では全く発現が認められなかった。

哺乳類では DAO は誘導酵素ではなく、DDO は D-Asp により誘導されることが知られている。しかしながら、コイにおいては全く逆の結果であった。このことは雑食性のコイの餌となる甲殻類や二枚貝には、D-Asp や D-Glu と比べて遥かに D-Ala が豊富であることによるものと考えられる。餌中に存在する D-Ala はまず腸管において処理され、一部吸収された D-Ala は肝臓および最終的には腎臓で処理され、生成するピルビン酸は栄養源として利用されるものと考えられる。したがって、コイにおける DAO は単なる解毒酵素ではなく、D-アミノ酸の炭素骨格を回収するための重要な酵素であると考えられることができる。

以上本研究では、コイ肝臓から DAO の cDNA を哺乳類以外の動物では初めてクローニングし、組換え体 DAO の諸性質を調べ、哺乳類とは異なりコイの DAO は餌の D-Ala により誘導される誘導酵素であることを明らかにした。したがって、これらの成果は水生動物における D-アミノ酸の代謝と生理機能を明らかにするための貴重な資料になるとともに、今後の哺乳類における D-アミノ酸代謝研究に対しても重要な情報を提供するもので、これらの成果は分子生物学および比較生化学上に資するところが大きいものと考えられる。