

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Sarower Md. Golam

D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) は 70 年前に発見された立体特異的な D-アミノ酸分解酵素であるが、その生理機能は長い間不明であった。本酵素は FAD を補酵素とし、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 D-アスパラギン酸オキシダーゼによって分解され、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いる。DAO の生理機能については、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。最近、甲殻類や二枚貝のような無脊椎動物組織中に多量の遊離 D-アラニン(Ala)が検出されており、D-Ala は L-Ala とともに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。したがって、これら無脊椎動物を補食する魚類は D-Ala を摂取する機会が多いと考えられ、DAO 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。このような背景の下、本研究ではコイ *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ある。

第一章では、D-Ala を含む餌を 14 日間投与したコイの肝臓から mRNA を抽出し、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 により得られた cDNA 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ている。この cDNA の翻訳領域はヒトおよびブタ DAO と同一の 347 残基のアミノ酸をコードし、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、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 も保存されていた。コイ DAO は哺乳類 DAO と 60~62% 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。

第二章では、コイ DAO cDNA の全翻訳領域をベクターに組み込み、大腸菌で発現を試み、可溶性の組換え体 DAO を高い活性で得ている。精製された組換え体 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することを確認し、またその他の詳細な酵素学的性質を明らかにしている。

第三章では、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ている。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。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。また、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を明らかにしている。

第四章では、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が存在した。そこで、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、細胞内局在性を調べている。マーカー酵素活性との細胞内分布を比較し、コイ肝臓および腎臓の両組織において、DAO は哺乳類の場合と同様にペルオキシソームに局在することを明らかにした。

第五章では、コイに D-Ala を含む餌を投与し、諸組織中の DAO 活性および DAO の mRNA の発現を調べ、コイ DAO が餌中の D-Ala に誘導されることを明らかにしている。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 活性も上昇した。一方、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、筋肉や脳では全く発現が認められなかった。以上のことから、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察している。

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、分子生物学および比較生化学上に資するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。