

好熱性真菌 D-アミノ酸酸化酵素の 機能と構造解析

令和 3 年（2021 年）3 月

長岡技術科学大学大学院

工学研究科

生物統合工学専攻

七五三掛 湧也

目次

本研究で用いられる主な略語-----	1
序論-----	2
第 1 章 好熱性真菌 <i>Thermomyces dupontii</i> 由来 D-アミノ酸酸化酵素の酵素学的諸特性解析とその D-アスパラギン酸オキシダーゼの基質親和性の向上	
1. 緒言-----	26
2. 結果-----	27
3. 考察-----	47
4. 材料と方法-----	56
第 2 章 D-アミノ酸資化能を有する好熱性真菌の単離とその DAAO の酵素学的諸特性解析	
1. 緒言-----	62
2. 結果-----	63
3. 考察-----	84
4. 材料と方法-----	96
第 3 章 ReDAAO の高安定性と新奇な広基質特異性に寄与する構造的要因の同定	
1. 緒言-----	102
2. 結果-----	103
3. 考察-----	129
4. 材料と方法-----	140
総括 -----	146
謝辞 -----	149
公表論文 -----	150
引用文献 -----	151

本研究で用いられる主な略語

DAAO:	D-アミノ酸オキシダーゼ (D-amino acid oxidase)
TdDAAO:	好熱性真菌 <i>Thermomyces dupontii</i> NRRL 2155 株由来 D-アミノ酸オキシダーゼ
ReDAAO:	好熱性真菌 <i>Rasamsonia emersonii</i> YA 株由来 D-アミノ酸オキシダーゼ
RgDAAO:	常温性真菌 <i>Rhodotorula gracilis</i> 由来 D-アミノ酸オキシダーゼ
TvDAAO:	常温性真菌 <i>Trigonopsis varibilis</i> 由来 D-アミノ酸オキシダーゼ
pkDAAO:	ブタ腎由来 D-アミノ酸オキシダーゼ
hDAAO:	ヒト由来 D-アミノ酸オキシダーゼ
mDAAO:	マウス由来 D-アミノ酸オキシダーゼ
DDO:	D-アスパラギン酸オキシダーゼ (D-aspartate oxidase)
TdDDO:	好熱性真菌 <i>Thermomyces dupontii</i> NRRL 2155 株由来 D-アスパラギン酸オキシダーゼ
ChDDO:	常温性真菌 <i>Cryptococcus humicola</i> UJ1 株由来 D-アスパラギン酸オキシダーゼ
CbDDO:	常温性真菌 <i>Candida boidinii</i> 2201 株由来 D-アスパラギン酸オキシダーゼ
pDDO:	ブタ由来 D-アスパラギン酸オキシダーゼ
hDDO:	ヒト由来 D-アスパラギン酸オキシダーゼ
mDDO:	マウス由来 D-アスパラギン酸オキシダーゼ
CeDDO-1-3:	線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> 由来 D-アスパラギン酸オキシダーゼ
CPC:	Cephalosporin C
7-ACA:	7-Aminocephalosporanic acid
4-AA:	4-Aminoantipyrine
TOOS:	<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline
HRP:	Horseradish peroxidase
2, 4-DNPH:	2,4-Dinitrophenylhydrazine
IPTG:	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LBAC:	Lysogeny Broth with Ampicillin and Chloramphenicol
TBAC:	Terrific Broth with Ampicillin and Chloramphenicol
PDA:	Potato Dextrose Agar
T_{opt} :	至適温度 (°C)
T_{50^x} :	初期活性の 50%が失われる時の x min の保温温度 (°C)
$t_{1/2}$:	初期活性の 50%が失われる時の保温時間 (min)

序論

D-アミノ酸

アミノ酸は生命活動に必須なタンパク質の構成成分であることから、生命体の基本的な構成物質である。タンパク質を構成する 20 種類の α -アミノ酸のうち Gly を除いた 19 種類には、 α 炭素が不斉中心をなし、立体的に重ね合わすことができない一対の鏡像異性体が存在する。これらは、L-アミノ酸と D-アミノ酸に区別されている。興味深いことに、生体物質のほとんどは L-アミノ酸から構成されている。両鏡像異性体の融点や等電点などの物理的性質は同じであるが、旋光度などの光学的性質は異なる。長年、生体において重要な役割を担うアミノ酸は、原核生物の細胞壁を除いて L-アミノ酸のみであり、D-アミノ酸は環境異物だと考えられてきた。しかし近年、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などの微量分析技術の発展に伴い、様々な D-アミノ酸が、種々の真核生物にも見出され、多様な生理機能を担っていることが明らかになってきた。

原核生物において、D-Ala や D-Glu などの D-アミノ酸が細胞壁の主要構成物質であるペプチドグリカン (PG) の構成要素として機能することが古くから知られている。また、ある種の細菌では D-Asp, D-Asn, D-Lys や D-Ser も PG の構成要素として機能することが報告されている(1)。PG における D-アミノ酸の存在は、L-アミノ酸からなるペプチド結合を切断する多くのプロテアーゼから身を守るための細菌の生存戦略の一つと考えられている(2)。さらに近年、いくつかの細菌の培養液上清に、上述した D-アミノ酸以外にも様々な遊離 D-アミノ酸が検出されたことから、PG 構成要素以外の D-アミノ酸が生産されていることが明らかとなった(3)。また、ある種の細菌が生産する polyglutamic acid や gramicidin S などのペプチド系抗生物質にも D-アミノ酸が含まれることが知られている(4)。ゲノム配列解析の進展により、多くの細菌種において D-アミノ酸の生合成を担う複数のアミノ酸ラセマーゼホモログ遺伝子が見出されたことから、多様な細菌種において、複数種の D-アミノ酸が生産されている可能性が指摘されている(5)。近年、細菌における遊離 D-アミノ酸の生理学的な役割が次々と明らかになっている。例えば、D-Leu, D-Met や D-Tyr は、枯草菌 *Bacillus subtilis* のバイオフィームで高濃度に蓄積し、蓄積したこれら D-アミノ酸がバイオフィームを分散させる機能を有することが報告されている(6)。また、病原性細菌の *Vibrio cholerae* はラセマーゼによって、*Vibrio* 種を除く多くの細菌種に対して毒性を示す D-Arg を生産し、細胞外エフェクターとして他の細菌種に作用させることで生存競争を有利にすると考えられている(7)。

真核生物においても、いくつかの D-アミノ酸の生理機能が報告されている。D-Ser は Ser ラセマーゼ (Srr) により生合成され、哺乳類の脳内で L-Glu 依存性のイオンチャンネルの 1 つであり、記憶や学習といった脳の高次機能に関与する N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 型グルタミン酸受容体の Gly 結合サイトに結合するコアゴニストとして神経伝達に関与することが報告されている(8)。また、脳内 D-Ser 濃度の変化が統合失調症や筋萎縮性側索硬化症などの神経性疾患に関与する可能性が示唆されている(9)。さらに、カイコを含む鱗翅目に属するいくつかの昆虫において、幼虫から蛹にかけて D-Ser 濃度が増加していくことから、変態に関与することが示唆されて

いる(10).

D-Asp は軟体動物, 両性類, 爬虫類, 鳥類や哺乳類に見出されており, 哺乳動物では主に脳内および内分泌腺を含む末梢神経組織に見出されている(11). ラットの臓器において, D-Asp が高濃度になる時期が, その機能や形態が成熟する時期と一致することから, D-Asp が細胞の増殖と分化に関与している可能性が示唆されている(4, 12, 13). また, 精巣では D-Asp の濃度が性成熟に伴って増加し, テストステロンの増加に相関関係を示すことから, D-Asp がテストステロン合成に関与していると考えられている(14). 他にも, 種々のホルモンの合成と放出の調節に D-Asp が関与することが指摘されている(15). さらに, D-Asp が NMDA 型グルタミン酸受容体の Glu 結合サイトに結合するアゴニストとして神経伝達に関与し, さらに統合失調症に関与する可能性が指摘されている(16). 近年, マウスにおいて機能未知のタンパク質であった glutamate-oxaloacetate transaminase 1-like 1 (GOT1L1) が Asp ラセマーゼ (AspR) 活性を示し, 生体内において D-Asp の生合成を担うことが報告されたが, その後の複数の研究により否定され, 哺乳類における合成経路は現在のところ不明である(17, 18). 一方, 真核生物由来としては初めて赤貝に D-Asp の生合成を担う AspR が見出され, Asp 代謝を通して嫌氣的エネルギー代謝の制御に関与すると考えられている(19, 20). これら真核生物における D-Ser や D-Asp の生理機能は, アミノ酸ラセマーゼによる生合成と D-アミノ酸オキシダーゼ (DAAO) および D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO) による分解代謝により量的なレベルで制御されていると考えられている. 他にも, D-Ala, D-Glu, D-Leu および D-Pro が哺乳動物体内に見出されているが, その生理機能や生合成経路は不明であり, 今後の解明が期待されている(21, 22).

微生物における D-アミノ酸代謝酵素

これまでに動物においては, 遊離 D-アミノ酸の代謝に関わる酵素として, 前述の DAAO, DDO, Srr や AspR などが知られている(21). 一方, これまでに, 古細菌, 細菌や真菌といった微生物では遊離 D-アミノ酸の代謝に関わる 17 種の酵素が報告されている (Table 1) (23). 特に, 細菌における D-アミノ酸代謝酵素の種類は多く, D-Pro レダクターゼ (PR), D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ (DAD), D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (DAAT), D-Thr アルドラーゼ (DTA), Phe ラセマーゼ (gramicidin S シンテターゼ, GrsA), Arg ラセマーゼ (ArgR), Glu ラセマーゼ (GluR), 広基質特異性アミノ酸ラセマーゼ (BsrV) などは細菌に特異的に見出される D-アミノ酸代謝酵素である(24-29). 古細菌では, D-アミノ酸代謝酵素として AspR, D-Pro デヒドロゲナーゼ (D-Pro DH), Pro ラセマーゼ (ProR), などが報告されている(30). 真菌では, DDO と D-アミノ酸-N-アセチルトランスフェラーゼ (DNT) が真菌特異的であり, その他に DAAO, D-Ser デヒドラターゼ (DSD), Ala ラセマーゼ (Alr) および Srr が遊離 D-アミノ酸の代謝酵素として報告されている(31-36).

Table 1. 微生物に見出される D-アミノ酸代謝酵素

Enzymes	Microorganisms
Oxidoreductases	
D-Amino acid oxidase (DAAO, EC 1.4.3.3)	Bacteria and fungi
D-Aspartate oxidase (DDO, EC 1.4.3.1)	Fungi
D-Proline reductase (PR, EC 1.4.1.6)	Bacteria
D-Amino acid dehydrogenase (DAD, EC 1.4.99.6)	Bacteria
D-Proline dehydrogenase (D-Pro DH, EC 1.5.99.13)	Archaea
Transferase	
D-Amino acid- <i>N</i> -acetyltransferase (DNT, EC 2.3.1.36)	Fungi
D-Amino acid aminotransferase (DAAT, EC 2.6.1.21)	Bacteria
Lyases	
D-Serine dehydratase (DSD, EC 4.2.1.14)	Bacteria and fungi
D-Threonine aldolase (DTA, EC 4.1.2.42)	Bacteria
Isomerases	
Alanine racemase (Alr, EC 5.1.1.1)	Bacteria and fungi
Serine racemase (Srr, EC 5.1.1.18)	Bacteria and fungi
Phenylalanine racemase (GrsA, EC 5.1.1.11)	Bacteria
Arginine racemase (ArgR, EC 5.1.1.9)	Bacteria
Broad substrate specificity amino acid racemase (Bsr, EC 5.1.1.10)	Bacteria
Aspartate racemase (AspR, EC 5.1.1.13)	Archaea and bacteria
Proline racemase (ProR, EC 5.1.1.4)	Archaea and bacteria
Glutamate racemase (GluR, EC 5.1.1.3)	Bacteria

D-アミノ酸オキシダーゼ (DAAO)

D-アミノ酸オキシダーゼ (DAAO, EC 1.4.3.3) は、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を補酵素とし、中性および塩基性 D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する酵素であり (Fig. 1), 真核生物において DAAO は主にペルオキシソームに局在する(37-40). DAAO の反応において、基質である D-アミノ酸は FAD の還元を伴いながら酸化され、イミノ酸中間体になる。その後、イミノ酸中間体は非酵素学的に脱アミノされ、最終的に、 α -ケト酸とアンモニアが生成される。還元された FAD は分子状酸素により再酸化され、酸化型の FAD に戻ると同時に、過酸化水素が生成される。一般的に、DAAO の塩基性 D-アミノ酸に対する活性は、中性 D-アミノ酸と比較して低く、また酸性 D-アミノ酸にはほとんど作用しない(41)。一方、酸性 D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応は、後述する DDO によって DAAO と同様な機構で触媒される。

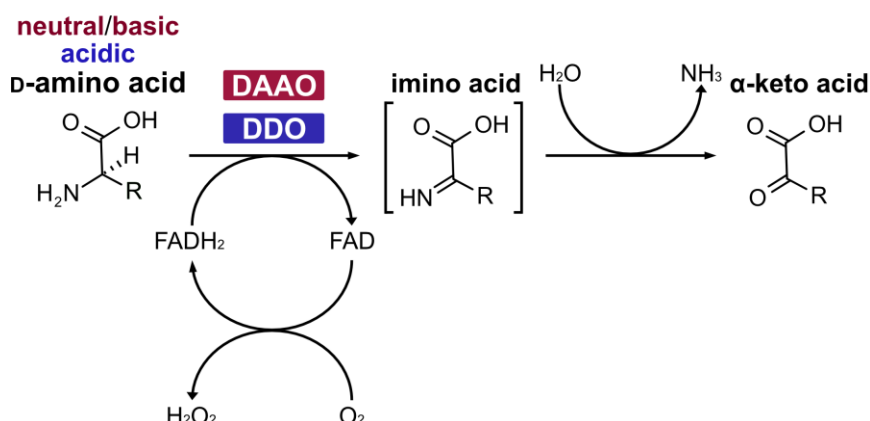


Fig. 1. DAAO および DDO による D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応

D-アミノ酸は DAAO または DDO の補酵素 FAD の還元を伴いながら酸化され、イミノ酸中間体になる。イミノ酸中間体は非酵素学的に脱アミノされ、最終的に、α-ケト酸とアンモニアが生成される。還元された補酵素 FAD は分子状酸素により再酸化され、酸化型の FAD に戻ると同時に、過酸化水素が生成される。

DAAO は 1935 年に Krebs (1953 年ノーベル生理学・医学賞受賞, 功績: TCA サイクルの発見) によってブタの腎臓に初めて見出された(42)。以降, DAAO は主に真核生物において見出され, フラビンを補酵素として含むデヒドロゲナーゼ-オキシダーゼのモデル酵素として数多くの研究対象となってきた。現在までに, DAAO は真菌, 魚類, 鳥類, 爬虫類や哺乳類など多くの真核生物に見出されている。そのなかでも, ブタ腎由来 DAAO (pkDAAO), ヒト由来 DAAO (hDAAO) および酵母 *Rhodotorula gracilis* 由来 DAAO (RgDAAO) は詳細に解析されており, これらの酵素学的な諸特性 (Table 2) や結晶構造などが解明され, DAAO の生理学的機能についてもいくつか知見が得られている。一方, 細菌を含む原核生物では, ペルオキシソームのような有害な過酸化水素から細胞を守るオルガネラが存在しないこと, 過酸化水素を生成せずに D-アミノ酸を分解代謝できる D-アミノ酸デヒドロゲナーゼやアミノ酸ラセマーゼなどの酵素が複数存在することから, 酵素反応により過酸化水素を生産する DAAO は細菌に存在しないと長年考えられてきた。ところが, 2007 年に放線菌 *Arthrobacter protophormiae* DSM 15035 に DAAO (ApDAAO) が初めて見出されて以降, 放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) (ScDAAO) や好熱性細菌 *Rubrobacter xylophilus* DSM 9941 (RxDAAO) など, 主に *Actinobacteria* 門に属するグラム陽性細菌に DAAO が見出されている(43-45)。

Table 2. 既知の真菌および哺乳動物 DAAO の酵素学的諸特性

DAAOs	Oligomeric state	$k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)	T_{opt} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{50} ($^{\circ}\text{C}$)	Optimum pH
RgDAAO ^a	Dimer	381,000 (D-Met)	40	39 (30 min)	9.0
pkDAAO ^b	Dimer	18,000 (D-Pro)	39	45 (30 min)	10.0
hDAAO ^c	Dimer	9,900 (D-Tyr)	-	-	-

$k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ は各 DAAO のなかで最も高い値を示し、()内はその基質を示す。 T_{50} の()内の数値は保温時間 (min) を示す。 (-)はデータ未報告を示す。 a は Hsieh らのデータ(46), Umhau らのデータ(47)および Pollegioni らのデータ(48)を用いた。 b は Tosa らのデータ(49), Setoyama らのデータ(50)および Pollegioni らのデータ(48)を用いた。 c は Kawazoe らのデータ(40)を用いた。

D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO)

D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO, EC 1.4.3.1) は、DAAO と同様に FAD を補酵素とし、酸性 D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する酵素である (Fig. 1) (51)。DAAO と同様に、ほとんどの DDO は真核生物においてペルオキシソームに局在する(31)。

1949 年に DDO は Still らにより、ウサギの肝臓に初めて見出された(51)。以降、DDO は真菌からヒトを含む動物において見出されているが、未だ原核生物からは見出されていない(31)。DAAO と比較して DDO の研究は遅れているが、線虫 *Caenorhabditis elegans* 由来 DDOs (CeDDOs)、マウス由来 DDO (mDDO)、ブタ由来 DDO (pDDO) およびヒト由来 DDO (hDDO) といった動物由来 DDO においては比較的研究がなされている(52-54)。なお、線虫には他の真核生物と異なり、3 つの DDO (CeDDO-1, 2, 3) が見出されている(53)。また、pDDO の結晶化や hDDO の結晶構造も報告されている(52, 55)。真菌では、現在までに *Aspergillus ustus* f 株, *Fusarium sacchari* var. *elongatum* Y-105 株, *Candida boidinii* 2201 株および *Vanrija humicola* (*Cryptococcus humicola*) UJ1 株といった常温性真菌に見出されている(31)。これら真菌の DDO のうち、*C. boidinii* 2201 株と *V. humicola* UJ1 株由来 DDO (CbDDO と ChDDO) について酵素学的な特性が詳細に解析されている(31)(Table 3)。

また、ChDDO に関しては遺伝子がクローニングされ、*E. coli* で発現させた組換え体の基質 D-Asp との複合体結晶構造 (未報告) が明らかにされている(56-58)。これらの研究から DAAO と同様に DDO の触媒特性やいくつかの生理機能が明らかとなっている。

Table 3. 既知の真菌 DDO の酵素学的諸特性

DDOs	Oligomeric state	$k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)	T_{opt} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{50} ($^{\circ}\text{C}$)	Optimum pH
ChDDO ^a	Tetramer	28,300 (D-Asp)	37	46 (10 min)	7.5
CbDDO ^b	Monomer	2,980 (D-Glu)	37	-	7.0

$k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ は各 DDO のなかで最も高い値を示し、()内はその基質を示す。 T_{50} の()内の数値は保温時間 (min) を示す。 (-)はデータ未報告を示す。 ^a は Takahashi らのデータ(58)と Yamada らのデータ(59), ^b は Fukunaga らのデータ(60)を用いた。

DAAO と DDO の生理機能

D-アミノ酸は多くの動物、真菌や原核生物に対して毒性を示すことが報告されているが、動物や真菌において、DAAO は D-アミノ酸の解毒酵素として、外来性および内在性 D-アミノ酸を代謝分解する役割を担うと考えられている(39)。また、真菌において、DAAO は D-アミノ酸を窒素源、炭素源およびエネルギー源として利用するための役割を担うことも報告されている(61)。ヒト脳においては、D-Ser が脳内神経伝達制御因子として神経伝達に機能していることが示されたことから (Fig. 2), D-Ser 代謝を担う DAAO の機能不全が統合失調症、双極性感情障害や筋萎縮性側索硬化症といった神経性疾患に関係することが示唆されている(62-64)。さらに近年、哺乳類の腸の上皮に DAAO が分泌発現し、腸内細菌由来の D-アミノ酸を代謝することで過酸化水素を生み出し、これにより病原性細菌の増殖を抑える機能を有していることが報告されている (Fig. 2)(65)。アフリカツメガエル *Xenopus laevis* では、オタマジャクシにおける DAAO 活性は成体の 3 倍であり、発達に伴う D-Pro 濃度と関連したことから、DAAO が D-Pro の代謝を通して変態に関与すると示唆されている(66)。

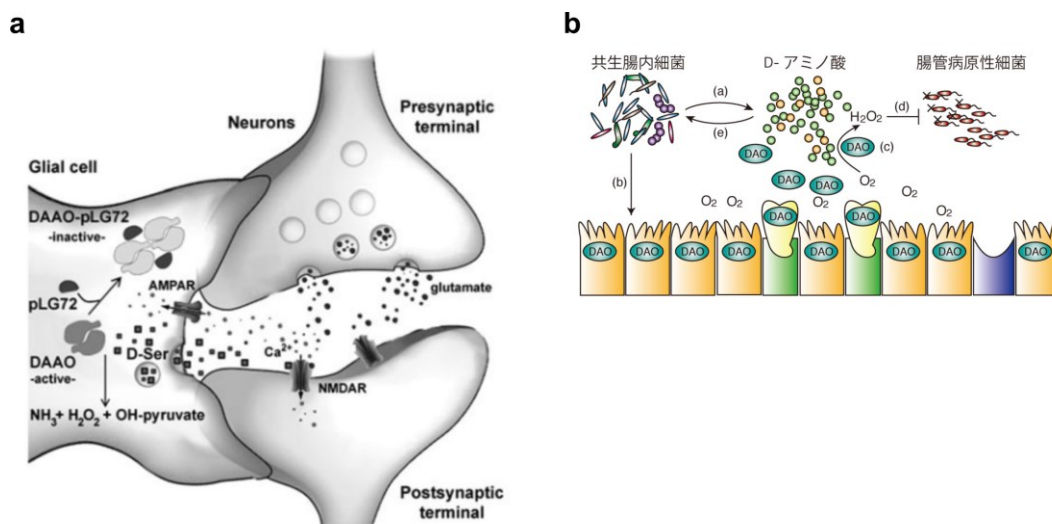


Fig. 2. DAAO の生理学的な役割

(a) 哺乳動物における DAAO の D-Ser 代謝による神経伝達への関与. 図は Sacchi らの論文(67)から引用した. (b) 哺乳動物における DAAO の D-アミノ酸代謝による腸内細菌叢恒常性への関与. 図は Nature 誌 (2016 年 10 月号) Author Interview から引用した.

一方, 細菌における DAAO の生理学的な役割はほとんど明らかにされていない. 放線菌 *Streptomyces coelicolor* では, DAAO (ScDAAO) が主に分岐鎖 D-アミノ酸に作用すること, ゲノム上の *dao* 遺伝子の周囲に細胞壁分解に関わると考えられるペプチダーゼ遺伝子が集積していることから, 細胞壁に取り込まれた分岐鎖 D-アミノ酸がペプチダーゼの作用により遊離し, 細胞内に取り込まれ, その取り込まれた D-アミノ酸を ScDAAO が分解する役割を果たしていると考えられている(44). しかし, 他の細菌種において DAAO が同様の役割を担っているかは不明である.

DDO も DAAO と同様に, 真菌において, 酸性 D-アミノ酸の解毒酵素として, また酸性 D-アミノ酸を窒素源, 炭素源およびエネルギー源として利用する資化酵素として機能することが報告されている(68). 哺乳類では, 肝臓や腎臓に高い DDO 活性が存在することから, DDO の生理学的な役割は内因性および外因性の酸性 D-アミノ酸の代謝分解と考えられている(69). 一方で, D-Asp が脳や精巣を含む多くの組織に見出され, 神経伝達やホルモン合成への関与が報告されたことから, DDO は D-Asp の分解代謝を通して, これら D-Asp の生理機能への関与が示唆されている(70, 71). 実際, DDO 遺伝子をノックアウトしたマウスでは各組織における D-Asp 濃度が増加し, α -メラニン細胞刺激ホルモンに依存する行動 (体重の増加, 性行動の質の低下や毛づくろいの減少など) の変化が報告されている(72). また近年, 統合失調症患者の死後脳における DDO 活性が高く, D-Asp 濃度が相対的に低下していることが報告されており, D-Asp 代謝の異常が統合失調症を含む神経性疾患に関与する可能性が指摘されている(73-76). また, 線虫 *Caenorhabditis elegans* に存在する 3 つの DDO (CeDDO-1, 2, 3) は, D-Asp と D-Glu の代謝を通して繁殖と孵化プロセスに関与し, さらに CeDDO-3 は線虫の増殖と寿命の制御に関与する可能性が示唆されている(77, 78).

DAAO と DDO の一次構造

DAAO と DDO は共通した触媒機構と高いアミノ酸配列同一性を有することから同一祖先から分岐したと考えられている(31). また、動物と真菌の DAAO 間や DDO 間のアミノ酸配列同一性よりも、動物の DAAO と DDO 間の方が高い同一性を示すことから、動物内や真菌内で DAAO と DDO が分岐したと考えられている(31). DAAO と DDO の一次構造を構成するアミノ酸残基の数はほぼ同じであるが、真菌由来の DDO や DAAO は約 370 アミノ酸残基からなるのに対して動物由来の DAAO や DDO は約 350 アミノ酸残基と少し短い(Fig. 3). 結晶構造が明らかな RgDAAO, pkDAAO および hDAAO, ChDDO と hDDO における構造的および生化学的解析から、両酵素において、基質結合や FAD 結合に関わるいくつかの保存性の高いアミノ酸残基が知られている. 例えば、全ての DAAO と DDO の N 末端領域には、補酵素 FAD との結合に関与する Wierenga ADP 結合配列 (GxGxxG : x は任意のアミノ酸残基, (79)) が存在する (Fig. 3). また、ほとんどの真核生物由来の DAAO と DDO の C 末端領域には、ペルオキシソームへの局在に関わる I 型ペルオキシソーム標的シグナル (PTS1 : S/T/A/G/C/N-R/K/H-L/I/V/M/A/F/Y, PROSITE: PS00342) に一致する配列が存在する. また、基質 D-アミノ酸の α -カルボキシ基と相互作用する Tyr と Arg 残基, α -アミノ基と相互作用する Gly/Ser 残基が両酵素に共通して保存されている (Fig. 3).

RgDAAO	MHSQKRVVVLGSGVIGLSSALILARKGY-----SVHILARDLPEDVSSQTFASPWAGANNTPFM-TLTDGPRQAKWEES	73
pkDAAO	M-----RVVVIAGVIGLSTALCIHERYHSVLQPLDVKVYADRFTPTTTD-----VAAGLWQPYT-SEPSNPQEANINQQ	70
hDAAO	M-----RVVVIAGVIGLSTALCIHERYHSVLQPLHIKVYADRFTPLTTD-----VAAGLWQPYL-SDPNNPQEAWSQQ	70
ChDDO	MPPSDPIIVLGAGVIGLTTAVRLL E A H L-----GANVHILADHWPSDALDAQYASTIAGAHHLSF--ADDGDARQRRWDMR	74
hDDO	MDT-ARIAVVGAGVVG LSTAVCTISKLPV---RCSVTIISDKFTPDTTSD-----VAAGMLIPHTYPDTPHTQKQWRE	70
RgDAAO	TFKKWVELVPTGHA--MWLKGTRRFAQNEDGLL--GHWYKDITPNYRPLPSSEC---PPGAIGVTYDTLSVHAPKYCQYL	146
pkDAAO	TFNYLLSHIGSPNAANMGLTPVSGYNLFREAVP--DPYWKDMVLGFRKLTPRELDMFPDYRYGWFNTSLILEGRKYLQWL	148
hDAAO	TFDYLLSHVHSPNAENLGLFLISGYNLFHEAIP--DPSWKDTVLGFRKLTPRELDMFPDYGYGWFHTSLILEGKNYLQWL	148
ChDDO	TFDVLVDEWKAV-GERTGLMALQTQEMWEGATS--HLAVYEGNPDRVLDPRTPAP-CSNITHMVSFTSLTIAPTIVYLAAL	150
hDDO	TFNHLFAIANSAEAGDAGVHLVSGWQIFQSTPTEEVPFHADVVLGFRKMTAEELKKFPQVVFQAFITLKCPCAPLPLWL	150
RgDAAO	ARELQKLGAFTERRTVTSLEQAF-DG-----ADLVVNATGLGAKSIAGIDDQ---AAEPIRGQTVLVKSPCKRCTM	213
pkDAAO	TERLTERGVKFFLRKVESFEEVARGG-----ADVINCTGVWAGVLQP--DP---LLQPGRGQIIVKVPAPWLKNFI	214
hDAAO	TERLTERGVKFFQRKVESFEEVAREG-----ADVIVNCTGVWAGALQR--DP---LLQPGRGQIMKVDPAPWMKHFI	214
ChDDO	EARVRDLGAKLHRAHVPSLGALRTDPALLALYTRPPAAVFCAGLGAH LVP--APEAAALFPTRGQVVVVRAPWMRAGF	228
hDDO	EKRIKSGSGWTLTRRIEDLWELHPS-----FDIVVNCISGLGSRLAG--DS---KIFPVRGQVLOVQAPWVEHFI	215
RgDAAO	DSSD-----PASPAYIIPRPGGEVICGGTYGVGDWLSVNPETVQRILKHCLRLDPTISSDG-----TI--EGIE	276
pkDAAO	ITHDLE---RGIYNSPYIIPGL-QAVTLGGTFQVGNWNEINNIQDHNTIWECCCRLEPTLKD-----AK	274
hDAAO	LTHDPE---RGIYNSPYIIPGT-QTVTLGGIFQLGNWSELNNIQDHNTIWECCCRLEPTLKN-----AR	274
ChDDO	TRQVGSGLGGEGGTRTYIIPRCNGEVVLGGTMEQGDWTPYPRDETVDITLALQICPDIAAPPYARSWPKDDQVAALRSI	308
hDDO	RD-----GSGLTITYPGT-SHVTLGGTRQKGDWNLSPDAENSREILSRCCALEPSLHG-----AC	269
RgDAAO	VLRHNVGLRPAARRGGPRVEAERIVLPLDRKTSPLSLGRGSARAAKEKEVTLVHAYGFSSAGYQSSNGAAEDVAQLVDEAF	356
pkDAAO	IVGEYTGFRPVRPQ-VRLEREQ--LRFQ-----SSNTEVIHNYGHGGYGLTIHWGCALEVAKLFGKVL	334
hDAAO	IIGEATGFRPVRPQ-IRLEREQ--LRTG-----PSNTEVIHNYGHGGYGLTIHWGCALEAAKLFGIRIL	334
ChDDO	VVRDAVGFRRPSRAGGARVA-----L-AS-----AAGMRVVYNYGHGGAGWQSCNGCAEDAVALLWAGG-	364
hDDO	NIREKVGRLRPPYRPG-VRLQTEL--LARD-----GQRLPVVHHYGHGSGGISVHWGTALEAARLVSECV	329
RgDAAO	QRYH-GAARESKL	368
pkDAAO	EERNLLTMPPSHL	347
hDAAO	EEKKLSRMPPSHL	347
ChDDO	-----AGGARL	370
hDDO	HALR-TPIPKSNL	341

Fig. 3. DAAO と DDO のアミノ酸配列アライメント

青は N 末端領域における Wierenga ADP 結合配列 (GxGxxG: x は任意のアミノ酸残基) を示す。緑は C 末端領域における I 型ペルオキシソーム標的シグナル (PTS1: S/T/A/G/C/N-R/K/H-L/I/V/M/A/F/Y) に対応する配列を示す。マゼンタは pkDAAO と hDAAO における active-site lid を示す。(◇)は真菌 DAAO と DDO にそれぞれ特異的な Asn と His 残基を示す。(●)は基質 D-アミノ酸の α -カルボキシ基と相互作用する Tyr と Arg 残基を示す。(○)は基質 D-アミノ酸の α -アミノ基と相互作用する Ser または Gly 残基を示す。アライメントに用いた DAAO と DDO の UniProtKB accession no.を以下に示す: RgDAAO, P80324; pkDAAO, P00371; hDAAO, P14920; ChDDO, Q75WF1; hDDO, Q99489。

DAAO における基質相互作用

現在, DAAO の反応に伴う基質 D-アミノ酸による FAD の還元は, 基質 α -H の FAD N(5)への直接的なヒドリド転移によると考えられており, 効率的な反応には, 基質結合親和性以外に, 基質 α -H と FAD N(5)の適切な位置関係が重要と考えられている(80). この基質の基質結合部位における適切な配置は, 基質結合部位におけるアミノ酸残基と基質 α -カルボキシ基, α -アミノ基および側鎖との相互作用で成り立っている.

RgDAAO の D-Ala 複合体の結晶構造や多くの DAAO の生化学的解析から, 基質の結合に関わるいくつかの保存性の高いアミノ酸残基が明らかにされている(40, 47, 81-83). 例えば, RgDAAO の Tyr223 と Arg285 残基は基質の α -カルボキシ基と, Ser335 残基の主鎖カルボニル酸素は基質の α -アミノ基と水素結合を形成することで基質との結合に関与している (Fig. 4a) (84-86). これらアミノ酸残基のうち, Tyr223 と Arg285 残基に対応するアミノ酸残基は現在までに解析された全ての DAAO に保存されている (Fig. 3, Fig. 4b, c). 一方, RgDAAO の Ser335 残基と同様な役割を担うアミノ酸残基は, 他の DAAO では, Gly 残基である場合が多い (Fig. 3, Fig. 4). また, RgDAAO の Tyr238 残基も基質の α -カルボキシ基と水素結合を形成することで基質結合に関与するが, 哺乳動物 DAAO の対応する位置には Tyr 残基ではなく Phe 残基が存在している(83). 加えて, RgDAAO の Asn54 残基も水分子を介して基質の α -アミノ基と相互作用している. 他の真菌 DAAO にも対応する Asn 残基が存在するが, 哺乳動物 DAAO では存在せず, 代わりに Leu 残基が存在する(47, 56). 既知の真菌 DDO では Asn 残基の代わりに His 残基が保存されていることから(Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5), 一次構造において Asn と His 残基の違いを確認することで真菌 DAAO と DDO の区別することが可能と考えられている(56).

哺乳動物 DAAO の活性部位上側には“active-site lid”と呼ばれる可動性の高い長いループが存在し, 基質の取り込みと生成物の放出に寄与すると考えられている (Fig. 3, Fig. 4bc) (81). 一方, RgDAAO の対応するループは短いことから, active-site lid として認められていない(Fig. 3, Fig. 4a) (87). 一般的に, 真菌由来の DAAO の触媒活性は哺乳動物由来のものよりも非常に高いが, この理由として active-site lid が存在しないことがその理由と考えられている(87). また, active-site lid が基質特異性に関与することが pkDAAO で報告されている(50). 加えて, 哺乳動物 DAAO の活性部位に存在する Leu, Ile や Tyr 残基によって形成される疎水性領域が疎水性 D-アミノ酸への活性に寄与すると考えられている (Fig. 4) (67).

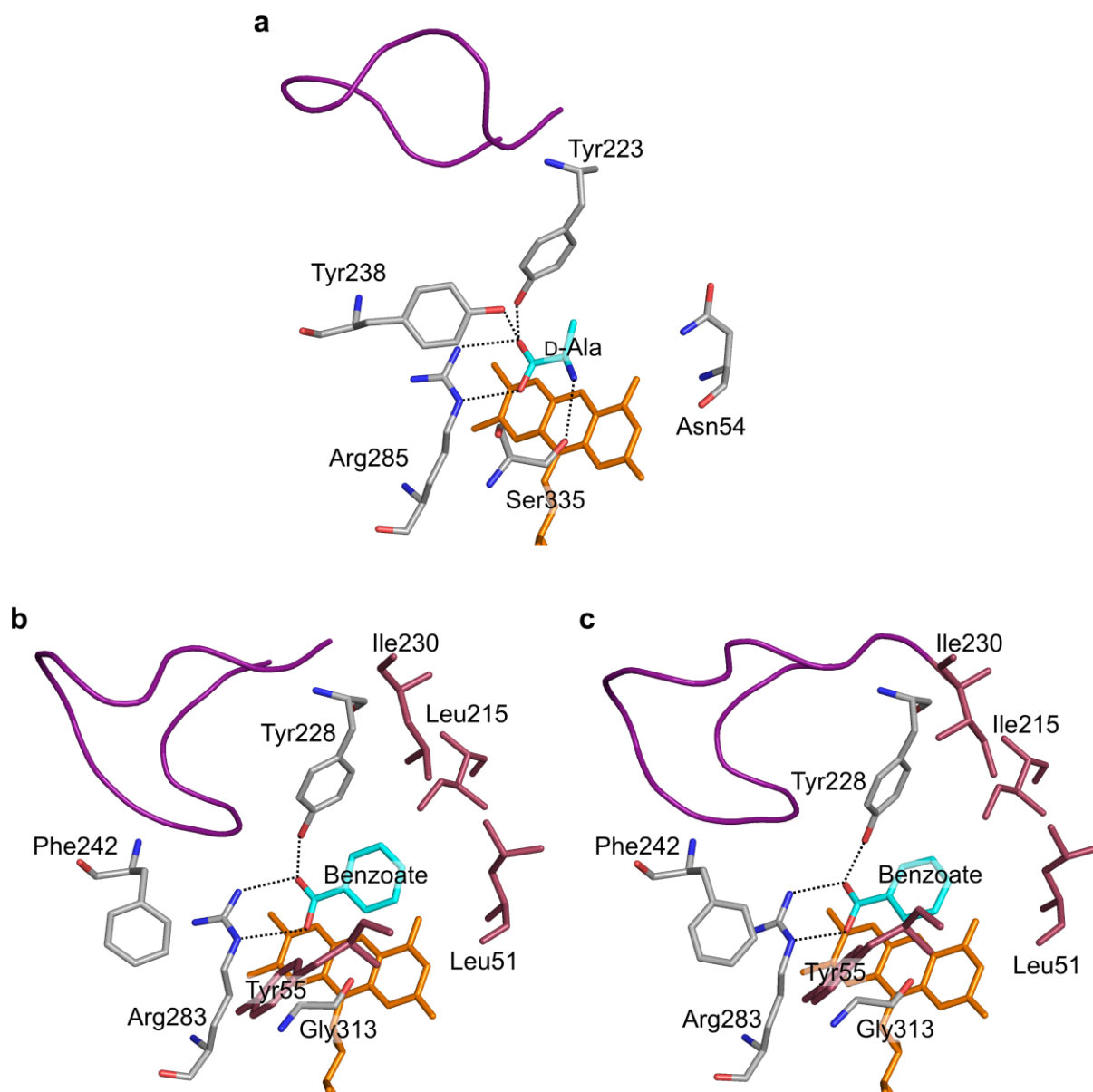


Fig. 4. DAAO 結晶構造における活性部位

(a) RgDAAO-D-Ala 結晶構造 (PDB entry: 1C0P) , (b) hDAAO 結晶構造 (PDB entry: 2DU8) および (c) pkDAAO 結晶構造 (PDB entry: 1VE9) の活性部位. 原子の配色: 炭素原子, 灰 (アミノ酸残基) とシアン (D-Ala と benzoate) ; 窒素原子, 青; 酸素原子, 赤. FAD は橙, pkDAAO と hDAAO において疎水性領域を形成する疎水性アミノ酸残基は茶で示した. pkDAAO と hDAAO における紫のループは active-site lid を示し, RgDAAO においては対応するループを示す. PyMOL ver 2.4 (<https://pymol.org/2/>) を用いて作図した.

DDO における基質相互作用

DDO に関しては、ヒトと真菌 *C. humicola* UJ1 株由来の DDO (hDDO と ChDDO) の結晶構造が明らかにされているが、基質との複合体の結晶構造は ChDDO においてのみ明らかにされている (Fig. 5). これら DDO の結晶構造やモデル構造を用いた生化学的な解析から、基質結合に関わる DAAO と共通するアミノ酸残基や DDO の酸性 D-アミノ酸に対する基質特異性に関わるアミノ酸残基の同定が進められてきた(31). 例えば、ChDDO の Tyr245 と Arg317 は、DAAO において基質の α -カルボキシ基と水素結合を形成する Tyr と Arg 残基に相当し、Gly344 は基質 α -アミノ基と水素結合を形成する Gly/Ser 残基に相当する. これらアミノ酸残基は動物 DDO を含む全ての既知の DDO に保存されている (Fig. 5) (52). 一方、DDO において、RgDAAO の Tyr238 や hDAAO の Phe242 に対応する位置には、哺乳動物 DDO では Arg 残基 (Arg237) が ChDDO では Met 残基 (Met260) が存在している. 哺乳動物 DDO の Arg 残基は、活性に寄与することが示されている (52, 88). また、DDO の活性部位上部には DAAO には見られない Arg 残基 (Fig. 5, ChDDO: Arg243, hDDO: Arg216) が存在し、基質 D-Asp 側鎖のカルボキシ基と相互作用を形成し、酸性 D-アミノ酸に対する基質特異性を付与していると考えられている(57). 加えて、ChDDO の活性部位に存在する真菌 DDO に特異的な His 残基 (His56) も D-Asp 側鎖と相互作用することで、D-Asp に対する基質特異性に寄与していると考えられている (Fig. 5a) (56). hDDO においては、ChDDO の His56 に対応する位置には Met 残基 (Met50) が存在するが (Fig. 5b), その近傍に存在する His 残基 (His54) が酸性 D-アミノ酸に対する活性に寄与する可能性が示唆されている (Fig. 5b) (52).

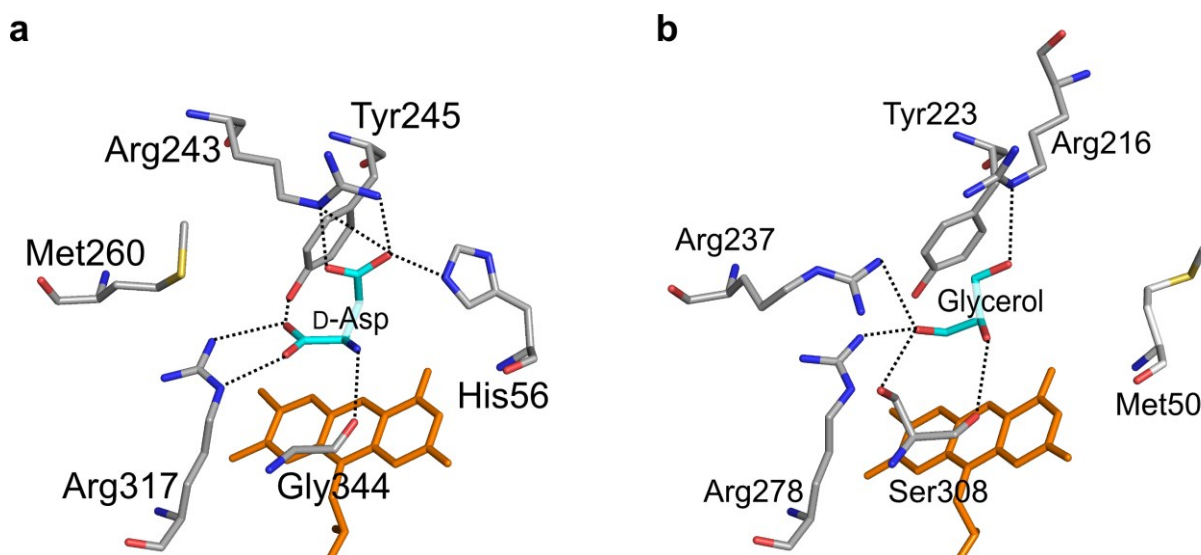


Fig. 5. DDO 結晶構造における活性部位

(a) ChDDO-D-Asp 結晶構造と (b) hDDO 結晶構造 (PDB entry: 6RKf) の活性部位. 原子の配色: 炭素原子, 灰 (アミノ酸残基) とシアン (D-Asp と glycerol); 窒素原子, 青; 酸素原子, 赤; 硫黄原子, 黄. FAD は橙で示した. 点線は水素結合を示す. PyMOL ver 2.4 (<https://pymol.org/2/>) を用いて作図した.

DAAO の基質特異性

現在までに解析されている DAAO は基質特異性の違いにより (i) 広基質特異性, (ii) 中基質特異性, (iii) 狭基質特異性の 3 つに分けることができる (Table 4). (i) 広基質特異性を有する DAAO には RgDAAO と TvDAAO が含まれる. これら DAAO は後述する cephalosporin C (CPC) を含む多様な D-アミノ酸に対して高い活性を示すが, 他の DAAO と同様に, 酸性である D-Asp や D-Glu に対してはほとんど活性を示さない(41). RgDAAO と TvDAAO が単離された酵母 *Rhodotorula gracilis* と *Trigonopsis variabilis* はそれぞれ *Basidiomycota* 門と *Ascomycota* 門に属する真菌で系統的に遠縁であり, 両 DAAO のアミノ酸配列同一性も 30% と高くない. これら DAAO の広基質特異性の要因は活性部位ポケットの広さなどに起因すると考えられているが, その詳細についてはほとんど明らかになっていない(89). (ii) 中程度の広さの基質特異性を有する DAAO には hDAAO と pkDAAO といった哺乳動物由来の DAAO が含まれる. これら DAAO は D-Trp, D-Met, D-Val, D-Phe や D-Pro といった比較的嵩高い側鎖を持つ中性かつ疎水性 D-アミノ酸に対して高い活性を示す. この基質特異性は, 基質の疎水性側鎖と基質結合部位の疎水性領域との疎水性相互作用が要因と考えられている(38). (iii) 狭い基質特異性を有する DAAO には, RxDAAO や ApDAAO といった *Actinobacteria* 門に属する細菌由来の DAAO が含まれる. RxDAAO は分岐鎖 D-アミノ酸に対して, ApDAAO は D-Met や塩基性 D-アミノ酸に対して非常に高い活性を示す(43, 45). RxDAAO の分岐鎖 D-アミノ酸に対する高い活性と強い基質結合親和性は基質結合部位での基質との強い疎水性相互作用が要因と考えられている(45). 一方, ApDAAO における塩基性 D-アミノ酸に対する高い活性の要因は現在のところ不明であり, 今後の解明が期待される.

Table 4. DAAO の基質特異性

Substrates	Broad		Moderate		Narrow	
	RgDAAO ^a	TvDAAO ^a	pkDAAO ^a	hDAAO ^b	RxDAAO ^c	ApDAAO ^d
	Relative activity (%)					
D-Asp	0	4	1	2	n.d.	0
D-Glu	4	9	0	1	5	0
D-His	58	88	3	6	4	6
D-Arg	2	43	4	8	1	80
D-Lys	5	17	2	0	2	99
D-Thr	10	4	2	2	12	0
D-Ser	41	22	18	18	1	0
D-Asn	40	65	0	0	0	0
D-Gln	53	81	1	1	1	-
D-Trp	56	38	2	7	2	0
D-Tyr	26	17	4	37	18	5
D-Phe	79	36	84	67	2	54
D-Pro	57	25	100	100	0	<1.0
D-Met	100	78	75	53	2	100
D-Ala	71	97	40	30	2	<1.0
D-Val	95	100	28	18	100	<1.0
D-Leu	57	32	21	13	27	12
D-Ile	56	76	35	27	27	-
Gly	3	0	0	0	0	0
CPC	2	13	0	-	0	0

各 DAAO の種々の D-アミノ酸に対する比活性から相対活性を算出した。 ^a は Gabler らのデータ(41), ^b は Molla らのデータ(52), ^c は Takahashi らのデータ(45)および ^d は Geueke らのデータ(43)を用いた。

DDO の基質特異性

DDO は DAAO の基質である中性と塩基性 D-アミノ酸にほとんど活性を示さないが、DAAO がほとんど活性を示さない D-Asp や D-Glu などの酸性 D-アミノ酸に高い活性を示す(31)。このような DDO の酸性 D-アミノ酸に特異的な基質特異性は、DDO の活性部位に観察される Arg や His 残基といった塩基性アミノ酸と基質側鎖のカルボキシ基との相互作用による(56, 57, 88)。DDO は D-Asp と D-Glu のどちらかにより高い活性を示すかにより大きく 2 つに分けられる (Table 3)。D-Glu よりも D-Asp により高い活性を示す DDO には、常温性真菌由来の ChDDO, 哺乳動物由来の pkDDO, ウシ腎臓由来の DDO (bkDDO) および hDDO といった多くの DDO が含まれる(53, 58, 90, 91)。なかでも、ChDDO は D-Asp に対して D-Glu の約 50 倍高い活性を示すことから、D-Asp 特異的な DDO であり、D-Asp の検出・定量に有用と考えられている(57)。一方、D-Asp よりも D-Glu により高い活性を示す DDO には、常温性真菌由来の CbDDO や線虫由来の CeDDO-1, 2, 3 が含まれる(53, 60)。この D-Asp または D-Glu の選好性に寄与する構造因子はほとんど明らかになっていないが、ChDDO の D-Asp に対する高い基質特異性は、動きが制限されている His56 による相互作用と His56 イミダゾール環による基質結合空間の制限が原因と考えられている(56)。

Table 5. DDO の基質特異性の相違

Substrates	D-Asp > D-Glu				D-Asp < D-Glu	
	ChDDO ^a	pkDDO ^b	bkDDO ^c	hDDO ^d	CbDDO ^e	CeDDO-1 ^d
Relative activity (%)						
D-Asp	100	100	100	100	32	74
D-Glu	2.4	25	5.3	7.8	100	100

各 DDO の D-Asp と D-Glu に対する活性から相対活性を算出した。 ^a は Takahashi らのデータ(58), ^b は Yamamoto らのデータ(90), ^c は Negri らのデータ(91), ^d は Katane らのデータ(53)および ^e は Fukunaga らのデータ(60)を用いた。

DAAO の応用的利用

DAAO は多様な応用的用途に利用可能である。その中でも最も重要なものが、cephalosporin C からの抗生物質原料である 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) の生産である (Fig. 6)。7-ACA は β -ラクタム系抗生物質の初発原料であり、世界で年間約 20 億円の市場を形成している(92)。

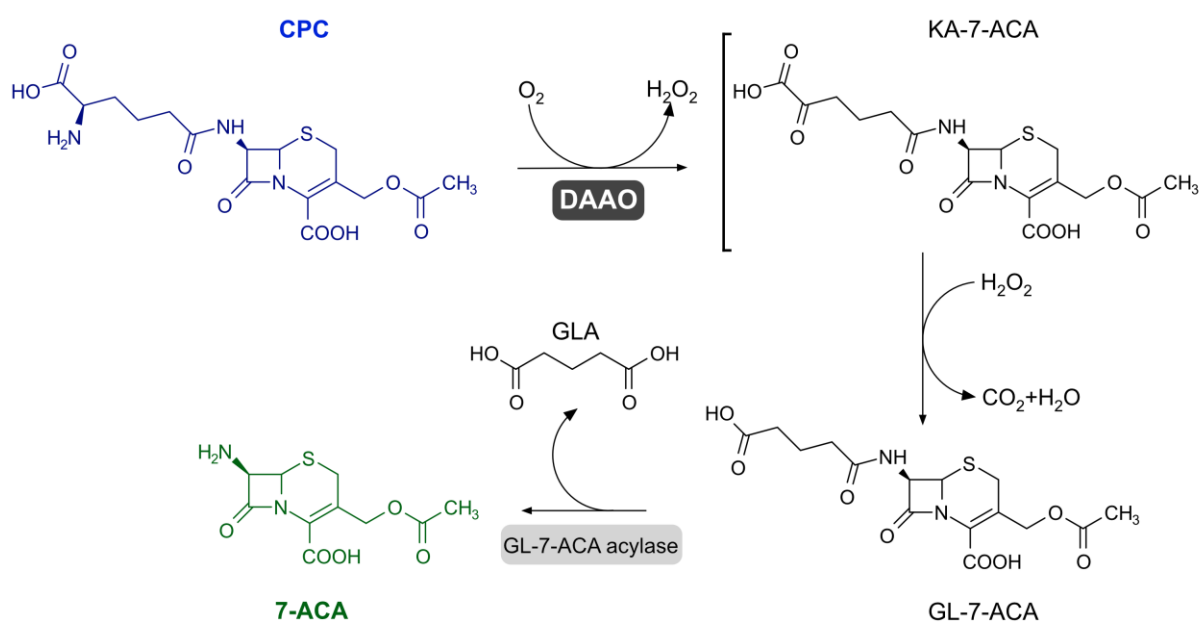


Fig. 6. DAAO を用いた CPC からの 7-ACA 生産

CPC, cephalosporin C; 7-ACA, 7-aminocephalosporanic acid; KA-7-ACA, ketoamidopyl-7-ACA; GL-7-ACA, glutaryl-7-ACA; GLA, glutaric acid. CPC は DAAO により脱アミノされ、KA-7-ACA 中間体となる。中間体は反応副産物である過酸化水素と反応し、非酵素学的に GL-7-ACA へと変換される。GL-7-ACA は GL-7-ACA アシラーゼにより加水分解され 7-ACA と GLA が生成される(38, 93)。

また、DAAO はアミノ酸や非天然アミノ酸のラセミ体混合物の光学分割にも有用である。例えば、RgDAAO と L-Asp aminotransferase を組み合わせた生理活性ペプチドや医薬品の原料となる L-2-naphthyl alanine のラセミ体混合物の光学分割 (Fig. 7) (89), TvDAAO と glucose dehydrogenase を組み合わせた心不全治療薬である Omapatrilat の前駆物質である L-6-hydroxynorleucine のラセミ体混合物の光学分割(94), pkDAAO と非エナンチオ選択的還元剤である sodium borohydride ($NaBH_4$) を組み合わせたラパマイシンや FK-506 などの様々な免疫抑制剤の中間体として有用な L-pipecolic acid のラセミ体混合物の光学分割などへの応用が報告されている(95)。

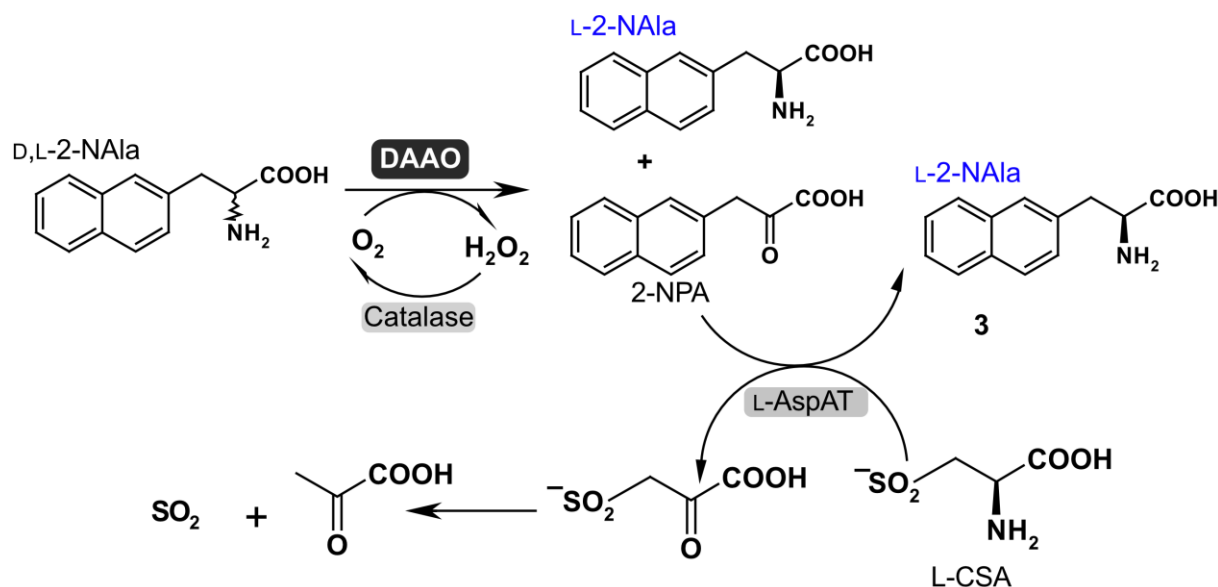


Fig. 7. DAAO を用いた D,L-2-naphthyl alanine の脱ラセミ化

Caligiuri らの論文の scheme 1 を一部改変し引用した(89). 化合物の略称: 2-NAla, 2-naphthyl alanine; 2-NPA, 2-naphthyl pyruvic acid; L-CSA, L-cysteine sulphinic acid. 酵素の略称: L-AspAT, L-aspartate aminotransferases. DAAO により D-2-NAla が 2-NPA に脱アミノされる. L-AspAT により 2-NPA のケト基に L-CSA のアミノ基が転移され, 最終的に L-2-NAla とピルビン酸および二酸化硫黄が生成される.

また, DAAO は慢性尿毒症の治療薬や様々な医薬品の原料となる α -ケト酸の生産にも有用である(96). また, アポトーシスを引き起こす事が知られており, 抗がん剤として用いられる 4-Methylthio-2-oxobutyric acid (MTOBA) の D-Met からの合成への利用も報告されている(97).

DAAO の重要な応用的利用の一つに D-アミノ酸の検出・定量がある. これまでに, D-アミノ酸の検出・定量法として, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC), ガスクロマトグラフィー, キャピラリー電気泳動を用いた方法および酵素学的手法が開発されている(98-104). これらの手法のなかで, HPLC は高感度であることから最も広く使用されているが, (i) 蛍光誘導体化などの煩雑な前処理が必要, (ii) 高コスト, (iii) 多数のサンプルを並行して分析出来ないといった問題がある. 一方, 酵素学的手法は感度において HPLC 法より劣るが, (i) 迅速かつ簡便, (ii) 低コスト, (iii) 一度に多数のサンプルを分析できる点で優れている. DAAO を用いた D-アミノ酸の検出・定量は, 主に反応により生じる生成物を誘導体化や他酵素とのカップリング反応で分光学的に検出することで行われる(105)(Fig. 8). また近年では, 反応にともなう酸素の消費量や過酸化水素の生成量を酸素電極や過酸化水素電極と組み合わせて用いることで電気シグナルに変換し, D-アミノ酸濃度を測定することができるバイオセンサーの開発も行われている(106-108).

近年, 神経伝達物質である D-Ser が統合失調症や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に関係することが明らかになったことから, これら疾患の診断への DAAO の利用が期待されている. 統合失調症患者

者では D-Ser 濃度の減少が(109), ALS 患者では D-Ser 濃度の増加が観察されていることから, 生体内の D-Ser 濃度の測定によりこれら疾患の早期診断が可能になると期待されている(110). また, アルツハイマー病患者でも生体内における D-アミノ酸濃度の変化が観察されていることから, 同様に D-アミノ酸濃度の測定により早期診断が可能になると期待されている(111). さらに, 血液や尿中の D-Ser 濃度の測定は腎機能や慢性腎臓病の診断に有効であると報告されている(112).

その他, 様々な生物において種々の D-アミノ酸が検出され, 多様な生理機能を担っていることが近年明らかになってきたことから, これらの研究における D-アミノ酸の分析においても DAAO は有用である. また, D-アミノ酸は食品の栄養, 味覚や保存性に影響を与えることが報告されていることから, D-アミノ酸分析による食品品質の評価においても DAAO は有用と考えられる(113).

また, DAAO はガン治療にも有用と考えられている. ガン細胞のカタラーゼ活性は正常細胞よりも著しく低いため, DAAO と D-アミノ酸を腫瘍部位に投与すると, 生成する過酸化水素によりガン細胞が死滅するが, 正常細胞には影響がないことが報告されている(114).

以上, DAAO の広範な応用的利用の可能性から, 高安定性, 高活性および広基質特異性を有する DAAO が強く求められている.

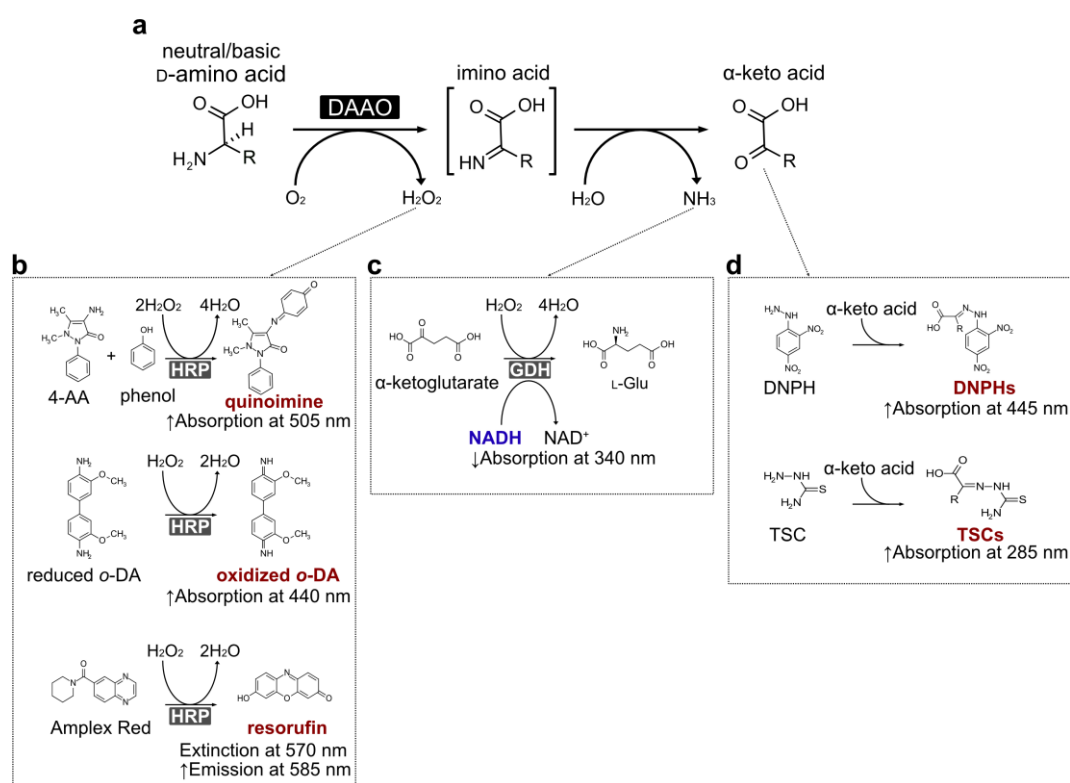


Fig. 8. DAAO を用いた D-アミノ酸の分光学的な検出法

(a) DAAO 反応. (b) H_2O_2 に対する定量手法. 略称: HRP, horseradish peroxidase; 4-AA, 4-aminoantipyrine; o-DA, o-dianisidine. (b) NH_3 に対する定量手法. 略称: GDH, glutamate dehydrogenase. (c) α -ケト酸に対する定量手法. 略称: DNPH, 2,4-dinitrophenylhydrazine; DNPHs, 2,4-dinitrophenylhydrazone; TSC, thiosemicarbazide; TSCs, thiosemicarbazine.

DDO の応用的利用

DDO は DAAO の基質でない酸性 D-アミノ酸に対して作用できることから、DDO は DAAO が作用しない酸性 D-アミノ酸の検出・定量に有用である。DDO は DAAO と同じ反応を触媒することから、反応により消費する酸素や生成する過酸化水素を検出する場合は、DAAO と同様の方法で酸性 D-アミノ酸を定量することが可能である。

これまでに、酸性 D-アミノ酸のさまざまな酵素を用いた酵素学的な検出と定量法が開発されている (Fig. 9). 古典的な酸性 D-アミノ酸の酵素学的な検出手法として、酸性 D-アミノ酸と DDO との反応により生成される α -ケト酸を 2, 4-dinitrophenylhydrazine と反応させ、生成される 2, 4-dinitrophenylhydrazone を比色定量する方法である (Fig. 9a) (101). 他の酵素学的手法として、他の酵素反応と組み合わせることで酸性 D-アミノ酸を定量する方法も開発されている。例えば、DDO と NADH 依存性 malate dehydrogenase または glutamate dehydrogenase を組み合わせることで、それぞれの反応時の NADH 減少量を分光学的に測定することで、D-Asp と D-Glu の混合溶液中の各々を分別定量する方法が開発されている。この定量法の感度は HPLC やキャピラリー電気泳動法に匹敵する (Fig. 9b) (102). また、L-aspartate oxidase, aspartate racemase および NAD⁺依存性 L-aspartate dehydrogenase を組み合わせることで、D, L-Asp のラセミ体混合物から NADH の増加を分光学的に測定することで D-Asp のみを定量する方法も開発されている (Fig. 9c) (103). さらに、DDO と D-Asp との反応により生成した oxaloacetate を oxaloacetate decarboxylase により pyruvate に変換し、蛍光試薬である 1, 2-diamino-4, 5-methylenedioxybenzene と反応させ、その蛍光強度から D-Asp を定量する方法も開発されている。この方法では D-Asp の μM レベルでの定量が可能である (Fig. 9d) (104). 一方で、DDO を用いたバイオセンサーは報告されておらず、その開発が期待されている。

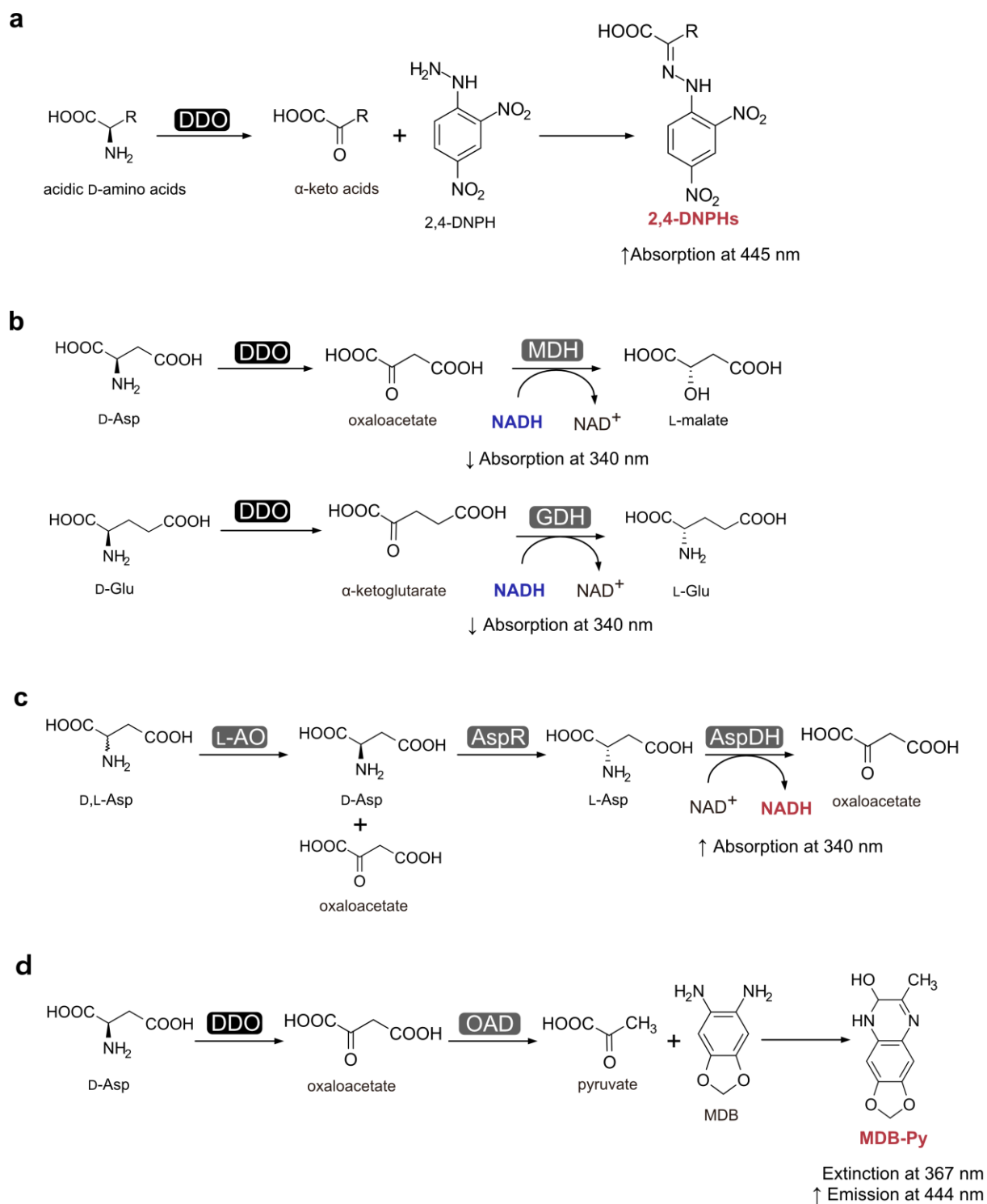


Fig. 9. DDO を用いた酸性 D-アミノ酸の酵素学的手法による検出・定量

(a) DDO と 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) を用いた手法(101). (b) DDO, NADPH 依存性 malate dehydrogenase (MDH) または glutamate dehydrogenase (GDH) を組み合わせた手法(102). (c) L-aspartate oxidase (L-AO), aspartate racemase (AspR) および L-aspartate dehydrogenase (AspDH) を組み合わせた手法(103). (d) DDO と oxaloacetate decarboxylase (OAD) および蛍光試薬 1, 2-diamino-4, 5-methylenedioxybenzene (MDB) を組み合わせた手法(104). Takahashi の論文の Fig. 4 を改変し, 作成した(31).

DDO は化学産業や製薬産業において需要が高い“光学的に純粋”な酸性 L-アミノ酸, α -アミノ酸および非天然 L-アミノ酸の生産にも有用と考えられている (Fig. 9) (104). DDO を用いたこれら純粋な酸性アミノ酸の最も単純な生産法は, 酸性アミノ酸のラセミ混合物に対して DDO と非エナンチオ選択的還元剤である sodium borohydride (NaBH_4), sodium cyanoborohydride (NaCNBH_4) または amine-borane をカップリングさせる方法である (104, 115).

以上, DDO の応用的利用の可能性から, 高安定性および高活性を有する DDO が強く求められている.

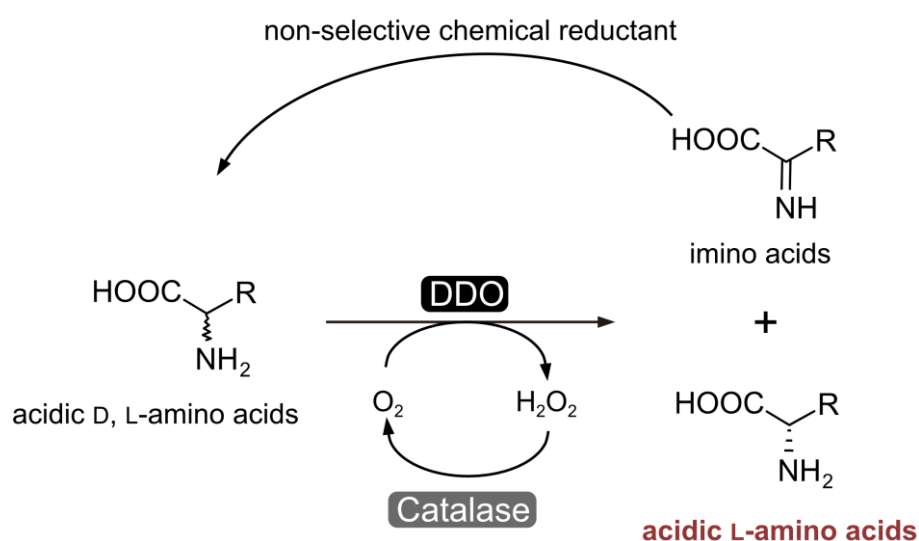


Fig. 10. 光学的に純粋な酸性 L-アミノ酸の生産

Takahashi の論文の Fig. 5 を改変し, 作成した(31).

DAAO の安定化

DAAO と DDO は多様な応用的利用に有用な酵素であるが, これら酵素自身の安定性の低さが応用的利用への障害となっている. 一般的に, 天然状態のタンパク質の構造は疎水性相互作用, 水素結合およびイオン結合 (塩橋) などの相互作用によって安定化されている (116-119). また, ペプチド結合主鎖のとりうる角度が広い Gly 残基の除去や主鎖と側鎖の動きが制限される Pro 残基の導入といった変性状態のエントロピーを下げることもタンパク質の安定性を高める要因であることが知られている (120). また, ジスルフィド (SS) 結合も変性状態のエントロピーを低下させることでタンパク質構造を安定化することが知られているが, 近年相互作用による天然状態の安定化にも寄与することが報告されている (121). これらの因子が実際に対象の酵素の安定化に寄与するかどうかは, 安定性の異なる酵素間の比較 (例えば, 好熱性微生物由来と常温性生物由来) や変異導入による野生型との比較から実証するのが一般的である (122-124).

DDO の安定化や不安定化に関しては解析されていないが, DAAO の不活性化の主な要因は FAD

の解離、サブユニット解離や触媒反応で生じる過酸化水素によるアミノ酸残基側鎖の酸化に起因することが報告されている(125-127). 比較的安定性の高い DAAO は、FAD との結合が強く、サブユニットが解離し難い構造であることが示されている(128-130). したがって、DAAO の安定性を高めるために、DAAO の樹脂への固定化、化学的修飾、アミノ酸変異、二量体 DAAO の融合、他のタンパク質との融合などが行われている(130). これら安定化の手法に用いられている DAAO のほとんどが、既知の DAAO のなかでも高活性かつ広基質特異性であり、応用的に有用な常温性真菌由来の RgDAAO や TvDAAO である.

DAAO の熱安定性を改善するために最も用いられている手法は固定化である. 例えば、遊離の RgDAAO は 50°C で 1 時間の保温で完全失活するが、磁気ビーズへ固定したものは 56% の活性を保持できたと報告されている(131). また、アガロースビーズへ固定された TvDAAO の熱安定性の向上など、これら以外にも固定化による熱安定性の改善が報告されている(132-137). しかし、用いる素材によっては①煩雑な固定化処理が必要、②樹脂に環境毒性がある、③固定化により酵素活性の損失が起こる、④担体を再利用できない場合は高コストになるなど、多くの問題点が指摘されている(138). これらは DAAO の応用的利用に際し、非常に大きな障害と考えられる.

DAAO の安定性を向上させるため、タンパク質工学的に DAAO 自身の安定化の検討もなされている. 例えば、ランダム変異導入により熱安定性が増加した pkDAAO のバリエーションが得られている(139). しかし、熱安定性が増加した理由は不明である. また、Golubev らは TvDAAO の α -helix に存在する複数の Ser 残基を Ala 残基に置換した α -helix の疎水化により熱安定性を向上させた(140). しかし、その安定化効果は小さかったことから(140)、既知の有用 DAAO をランダム変異導入や α -helix の疎水化により安定化させるのではなく、別のアプローチで高安定性、高活性かつ広基質特異性を有する DAAO を取得する必要があると考えられた.

好熱性細菌 *Rubrobacter xylophilus* DSM 9941 株 DAAO

Rubrobacter xylophilus DSM 9941 株は、1996 年にイギリスのカーペット工場の温排水から単離された 60°C の生育至適温度を有する好熱性の放線菌門に属する細菌である(141). DSM9941 株から単離されたトレハロース合成酵素を含むいくつかの酵素は高い耐熱性と至適温度を有することが報告されている(142).

Takahashi らは DSM9941 株のゲノム配列に DAAO ホモログ (RxDAAO) 遺伝子を見出し、*E. coli* で発現させた組換え酵素の酵素学的諸特性の解析から、RxDAAO の至適温度は 65°C であり、 T_{50} 値 (酵素活性の半分が消失する保温温度) は 64°C であることを明らかにした(45). この T_{50} 値は常温性真菌由来の TvDAAO の T_{50} 値の 54°C よりも著しく高く(48)、RxDAAO は既知 DAAO の中で最も高い耐熱性を有する DAAO であった. しかし、RxDAAO が作用する基質は D-Val や D-Ile な

どの分岐鎖 D-アミノ酸に限られており、基質特異性は非常に狭く、触媒活性も真菌 DAAO よりも著しく低かったことから (Table 2), RxDAAO の応用的利用は制限されると考えられた(45).

好熱性真菌

1886 年に Lindt によって 50–60°C の高温で生育可能な真菌 *Rhizomucor pusillus* が単離されて以降、1960 年代までに *R. pusillus* と同様に高温で生育可能な真菌がいくつか見出された(143). Cooney と Emerson がこのような高温で生育可能な真菌を好熱性真菌 (Thermophilic fungi) と呼ぶことを提唱して以降、現在では、最低 20°C から 60°C 付近までの温度範囲で生育可能で 40–50°C の至適生育温度を有する真菌を好熱性真菌とすることが一般的である(143-145).

2012 年までに報告されている好熱性真菌は、Ascomycota 門–Eurotiomycetes 綱の (i) Eurotiales 目または (ii) Onygenales 目のどちらかに属することが知られている(146). 好熱性真菌は暖かく多湿な好気性環境を好み、比較的体温の高い鳥の巣などのユニークな環境を含む、様々な環境から単離されているが、主な単離源は堆肥であることが知られている(143). 好熱性真菌は好熱性細菌や古細菌同様に、工業的に有用な耐熱性酵素の単離源として注目されており、実際に好熱性真菌由来のいくつかの酵素 (lipase, protease, xylanase および cellulase など) が商業的に生産・利用されている(143).

好熱性真菌 *Thermomyces dupontii*

T. dupontii は Ascomycota 門–Eurotiomycetes 綱–Eurotiales 目–Trichocomaceae 科に属する好熱性真菌である(147). *T. dupontii* は 1911 年に Griffon と Maubl によって *Penicillium dupontii* (旧学名) として単離され、2014 年に Houbaken らによって現学名の *T. dupontii* に再分類された(147). 至適生育温度は 45–50°C であり、一般的な好熱性真菌と同様に、暖かく湿気の多い好気性環境を好み、土壌や腐敗した植物材料、主に堆肥から見出されている(143). *T. dupontii* からは複数の応用的利用に有用な高い耐熱性を有する酵素、 β -glucosidase, lipase および xylanase などが単離されており、細菌や古細菌には存在しない酵素の有用な単離源として考えられている(148-150).

好熱性真菌 *Rasamsonia emersonii*

R. emersonii は Ascomycota 門–Eurotiomycetes 綱–Eurotiales 目–Trichocomaceae 科に属する好熱性真菌である(151). *R. emersonii* は 1965 年に Stolk によって堆肥から *Talaromyces emersonii* (旧学名) として単離され、2012 年に Houbaken らによって現学名の *R. emersonii* に再分類された(151, 152). *T. dupontii* と同様に、至適生育温度は 45–50°C であり、主に堆肥から見出されている(151, 153). *R. emersonii* の β -glucosidase は高い耐熱性を有することが報告されており、商業利用されている(153, 154).

本研究の目的

近年、分析技術の発展に伴い、環境異物として考えられてきた D-アミノ酸が細菌のみならずヒトを含む様々な動物に見出され、多様な生理学的な役割を担っていることが明らかになってきた。生物において、D-アミノ酸は主にアミノ酸ラセマーゼにより生合成され、原核生物ではアミノ酸ラセマーゼ、アミノトランスフェラーゼやデヒドロゲナーゼなど複数の酵素により代謝される。一方、真核生物では主に中性および塩基性 D-アミノ酸に作用する D-アミノ酸オキシダーゼ(DAAO)と酸性 D-アミノ酸に作用する D-アスパラギン酸オキシダーゼ(DDO)により代謝され、D-アミノ酸の生体への利用や生体内の D-アミノ酸レベルの制御を通して多様な生理学的な機能を担うことが明らかとなっている。

DAAO と DDO は D-アミノ酸の検出や定量、アミノ酸ラセミ体混合物の光学分割、光学的に純粋な L-アミノ酸や医薬品原料の合成に有用であり、さらにガンなどの病気の治療への応用も期待されている。現在、応用的利用が検討されている DAAO や DDO は主に常温性真菌由来のものである。この理由として、真菌由来のものは動物や細菌由来のものと比較して高い触媒活性を有しており、DAAO ではこれに加えて広い基質特異性を有することによる。しかし、これら酵素の応用的利用の拡大には高い安定性が求められている。当研究室ではこれまでに、好熱性細菌 *R. xylanophilus* DSM 9941 株に既知の DAAO のなかで最も高い耐熱性を有する DAAO (RxDAAO) を見出した。しかし、RxDAAO は高い安定性を有するものの活性は低く、基質特異性も狭かったため、応用的利用が制限された。

そこで本研究では、応用的利用に有用な高活性・広基質特異性・高安定性を有する DAAO と高活性・高安定性を有する DDO の取得を目的とし、DAAO と DDO の触媒特性に関するこれまでの知見(真菌由来の DAAO と DDO の触媒活性は高い、好熱性微生物由来の DAAO を含む酵素の耐熱性は高い)を踏まえ、未だ解析されていない好熱性真菌において DAAO と DDO を探索し、その耐熱性や基質特異性などの酵素学的諸特性を解析した。さらに、好熱性真菌に見出した DAAO の結晶構造と生化学的な解析から、その新奇な広基質特異性と高い耐熱性に寄与する構造因子について解析した。

第 1 章 好熱性真菌 *Thermomyces dupontii* 由来 D-アミノ酸酸化酵素の酵素学的諸特性解析とその D-アスパラギン酸オキシダーゼの基質親和性の向上

1. 緒言

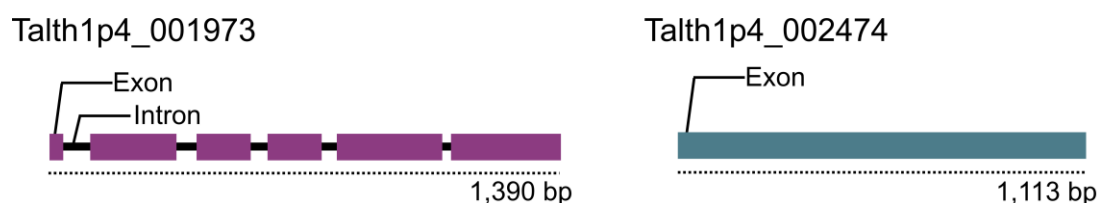
D-アミノ酸オキシダーゼ (DAAO) や D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO) といった D-アミノ酸酸化酵素は高い光学立体選択性を有することから、多様な応用的利用に有用である。DAAO においては、常温性真菌 *Rhodotorula gracilis* や *Trigonopsis variabilis* 由来の DAAO (RgDAAO と TvDAAO) が高い活性と cephalosporin C などの医薬原料を含む多様な基質に作用することから応用的利用の主な研究対象となっている。また、DDO においても同様に、高い活性の観点から常温性真菌 *Cryptococcus humicola* UJ1 株や *Candida boidinii* 由来の DDO が応用的に有用だと考えられている。一方で、これら常温性真菌由来の D-アミノ酸酸化酵素の安定性は低いことから、応用的利用が制限されている。当研究室ではこれまでに、好熱性細菌 *R. xylanophilus* 由来の DAAO (RxDAAO) が既知の D-アミノ酸酸化酵素のなかで最も高い耐熱性を有することを明らかにしている。しかし、RxDAAO の触媒活性は RgDAAO や TvDAAO よりもかなり低く、基質特異性も狭かったことから、RxDAAO の応用的利用は制限されると考えられた。したがって、高い安定性を有してかつ高活性で広基質特異性を有する DAAO の取得が求められている。

これまでの知見から、真菌由来の D-アミノ酸酸化酵素が高活性と広基質特異性を有すること、好熱性微生物由来の D-アミノ酸酸化酵素が高い安定性を有することが明らかにされていることから、未だ解析のなされていない好熱性真菌由来の D-アミノ酸酸化酵素がこれら応用的利用に有用な特性を兼ね備えている可能性が高いと考えた。そこで、第 1 章では、全ゲノム配列が解読されており、これまでにいくつかの高い耐熱性を有する酵素が報告されている好熱性真菌 *Thermomyces dupontii* NRRL 2155 株を DAAO と DDO の単離源とし、単離した DAAO (TdDAAO) と DDO (TdDDO) の酵素学的諸特性を解析した。加えて、取得した TdDDO に対して部位特異的変異を導入し、基質親和性の向上を検討した。

2. 結果

2.1. 好熱性真菌 *Thermomyces dupontii* における DAAO と DDO ホモログ遺伝子の探索

好熱性真菌の DAAO と DDO ホモログ遺伝子を取得するため、RgDAAO と ChDDO のアミノ酸配列を用いて、ゲノム配列が明らかにされている好熱性真菌 *T. dupontii* NRRL 2155 株に対してホモロジー探索した。その結果、RgDAAO と ChDDO に対して有意なアミノ酸配列同一性を有するタンパク質をコードする遺伝子が 2 つ (Talth1p4_001973 と Talth1p4_002474) 見出された (Fig. 1-1, Table 1-1)。ゲノム DNA 上の Talth1p4_001973 は 5 つのイントロンで分断された構造をしており、イントロンを含む全長は 1,390 bp であった。遺伝子領域の全長は 1,107 bp で、368 アミノ酸からなるタンパク質 (Td001973) をコードしていた。Td001973 は RgDAAO と ChDDO にそれぞれ 32.0 と 30.3% のアミノ酸配列同一性を有していた (Table 1-1)。一方、Talth1p4_002474 にはイントロンが存在せず、遺伝子全長は 1,113 bp で、370 アミノ酸からなるタンパク質 (Td002474) をコードしていた。Td002474 は、RgDAAO と ChDDO にそれぞれ 31.0 と 26.1% のアミノ酸配列同一性を有していた (Table 1-1)。また、Td001973 と Td002474 のアミノ酸配列同一性は 28.0% であった。

Fig. 1-1. *T. dupontii* の推定 DAAO と DDO ホモログ遺伝子

真菌ゲノムデータベース Genozymes (<https://www.fungalgenomics.ca/>) における *T. dupontii* NRRL2155 株に見出された推定 DAAO と DDO ホモログ遺伝子のエキソン-イントロン構造。

Table 1-1. *T. dupontii* の推定 DAAO と DDO ホモログ遺伝子

Gene ID	Talth1p4_001973	Talth1p4_002474
Protein ID	Td001973	Td002474
Amino acid residues	368	370
Amino acid identity (%)		
vs RgDAAO	32.0	31.0
vs ChDDO	30.3	26.1
vs Td001973	—	28.0
vs Td002474	28.0	—

^a アミノ酸配列同一性は Needleman-Wunsch アルゴリズムによるグローバルアライメントを用いて算出した。

見出された Td001973 と Td002474 のそれぞれが DAAO または DDO であるかを推定するために、Td001973, Td002474, 既知の DAAO および DDO のアミノ酸配列をアライメントした (Fig. 1-2). その結果, Td001973 と Td002474 の両方の N 末端領域に FAD 結合に関わる Wierenga ADP 結合配列 (GxGxxG : x は任意のアミノ酸残基(79)) が存在した. Td001973 の C 末端には I 型ペルオキシソーム標的シグナル (PTS1 : [S/T/A/G/C/N]-[R/K/H]-[L/I/V/M/A/F/Y]) に一致する配列 A-K-L が存在したが, Td002474 における配列は N-L-K であり一致しなかった. 既知の DAAO と DDO において D-アミノ酸基質の α -アミノ基と α -カルボキシ基との相互作用を担うことが知られている Tyr, Arg および Gly 残基に対応する位置に, Td001973 では, Tyr249, Arg313 および Gly339 残基が保存されていた. 一方, Td002474 には, Arg308 と Gly335 が保存されていたが Tyr 残基は保存されておらず, 代わりに Phe248 残基が存在した. また, Td002474 には, 既知の DDO で基質酸性 D-アミノ酸の側鎖カルボキシ基との相互作用を担うことが知られている Arg 残基に対応する位置もしくは近傍に Arg239 と Arg242 残基が保存されていた. また, Td001973 には真菌 DAAO に特異的に見出される Asn 残基 (Asn53) が観察されたが, Td002474 には真菌 DDO に特異的に見出される His 残基 (His70) が観察された. これらの結果から, Td001973 をコードする遺伝子 Talth1p4_001973 は DAAO ホモログ (*TdDAAO*) 遺伝子であり, Td002474 をコードする遺伝子 Talth1p4_002474 は DDO ホモログ (*TdDDO*) 遺伝子と考えられた.

Td002474	MP--PRIILGAGIGLSTAVELQQRHQHRSAPRPSITIVSAELPSQPSEWTEPRCRPSP-----DYASMWAGAHYR 73
ChDDO(f)	MPPSDPTIIVLGAGVIGLTTAVRLLEAHL-----GANVHLADH-----WPSDALDAQYASTIAAGHLS 59
mDDO	MDT-VCIADVAGAGVIGLSTAAACISQLVP-----GCTVTVISDR-----FTP-----DTTSNVAGMLIT 53
hDDO	MDT-ARIAVVGAGVVGGLSTAVCISKLV-----RCSVTIISDK-----FTP-----DTTSNVAGMLIT 53
Td001973	MEN-TNIVVLGAGVIGLTTALLLSRD-P-----KKKITVVAKH-----MPGDY-DIEYASPWAGANYL 56
RgDAAO(f)	MHSQKRVVVLGSGVIGLSSALILARK-----GYSVHLARD-----LPEDVSSQTFASPWAGANWLT 57
TvDAAO(f)	MA---KIVVIGAGVAGLTTALLQLLRK-----GHEVTIVSEF-----TPGDL-SILGYTSPWAGANWLT 53
mDAAO	M---RVAVIGAGVIGLSTALCIHERYHP--T-QPLHMKIYADR-----FTP-----FTTSDVAGLWQ 53
hDAAO	M---RVVIGAGVIGLSTALCIHERYHS--VLQPLHIKVYADR-----FTP-----LTTTDDVAGLWQ 54
Td002474	IPGAT-P--QLQREAQWAMDTEFRMRRIARD--APEAGVRMMPGIE---YLEDSP--KEYGRL---RTGDRYAGEHDE 139
ChDDO(f)	FA--D-D--GDARQRRWDMRTEDVLYDEWKA-VGERTGLMALTQTE---MWEG-----ATSHLAVYEGNPD 117
mDDO	HTCAD-T--PVPTQKRWFRETEHLEIAKSAEAAADAVHLVSGWQ---IFRSVP--AE-----EVFFWADVVLG 116
hDDO	HYTPD-T--PHTQKQWFRETFENHLEIAKSAEAGDAVHLVSGWQ---IFQSTP--TE-----EVFFWADVVLG 116
Td001973	YV-LQGVGAENNKVGKFEKATWPLWRDLAEN--CPEAGTHFLPTVV--YNRKIDRESTTGQWF--SELLRPDPWYKDVVPD 131
RgDAAO(f)	FM-TL-T--DGPRQAKWEESTFKKWWELVPT--GHAM---WLKQTRRFAQNE-----GLLGHWYKDITPNY 115
TvDAAO(f)	FY-----DGGKLADYDAVSYPITRELARS--SPEAGIRLISQRS--HVLKRDL--KLEVAMSAICQRNPWFKNVDS 121
mDAAO	YL-SD-P--SNPQEAENSSQQTEDYLLSCLHSPNAEKMLALISGYN---LFRDEV-----PDPFWKNAVLG 113
hDAAO	YL-SD-P--NNPQEAENSSQQTEDYLLSHVHSPNAENLGLFLISGYN---LFHEAI-----PDPFWKNTVLG 114
Td002474	RVLDKAELP--EGVAGCRYQTYSLNAPHYSRWLLDRFLAGGGQIVHKLKLEEF-----TLFEDGSQLVIN 207
ChDDO(f)	RVLDPRTAP-CSNITHMVSFTSLTIAPTIVYLAALEARVRLGAKLHRAHVPSLGALRTDPALLALYTR---PPAAV 191
mDDO	RKMTAEALKRFQYVFGQAFTTLKCETSAYLPWLERRIKSGGLLLTRIEDLWELQ-----P---SFDIVVN 181
hDDO	RKMTAEALKRFQYVFGQAFTTLKCECPAYLPWLEKRIKSGGWLTLTRIEDLWELH-----P---SFDIVVN 181
Td001973	QQLPKSELA--PGIDNGNSFTSVCINTAIYLPWLVGQCRKNGVVFKRAIFSHVNDAA--AHHSQ---KADIVVN 200
RgDAAO(f)	RPLPSSFC---PPGATGVTYDTLSVHAPKVCQYLARELQKLGAFTFERTVTSLEQA-----FD---GADIVVN 177
TvDAAO(f)	EIEDRSRIVHDDVAYLVEFRSVCITHTGVYLNWMSQCLSLGATVVKRRVNHKIDANL---LHSSGS---RPDIVVN 192
mDAAO	RKLTPEMDLFPDYGYGWFNTSLLEGKSYLPWLTERTERGVKLIHRKVESLEEVA-----R---GVDIVVN 178
hDAAO	RKLTPRELDMFPDYGYGWFNTSLILEGKNYLQNLTERLTERGVKFFORKVESFEEVA-----RE---GADIVVN 180
Td002474	CTGRN---FDQ---DDKMRIIRGQTVLVRN--QFDRITRQNR---DG---SWIFLIIRP-FAGTIIGGKEPDEMEVK 271
ChDDO(f)	CAGLGARHVPAPAAALFPTRGQVVVRA--PWRAGFTROVGLGGEGGTRTYIIPRC-NGEVLGGTMEQGDHTPY 268
mDDO	CSGLGSRRLVG---DPMISPRVGQVLQARA--PWVKHFIR--D---GG---GLTYVYPG--MSYVTLGGTRQKGDNNRS 245
hDDO	CSGLGSRRLVG---DSKIFPRVGQVLQQA--PWVEHFIR--D---GS---GLTYVYPG--TSHVTLGGTRQKGDNNRS 245
Td001973	CTGLSSRKLGCV-LDDTLARGQIVLVRN-DPGVMCSISGSD---D-G-DDEVTYIMTRAAGGGTILGGTYQKNNDPN 273
RgDAAO(f)	ATGLGAKSIAGI-DDQAAEPTRGQTVLWKS--PCKRCTMDSSD---P---ASPAYIIRP-GGEVICGGTYGVGDNDLS 246
TvDAAO(f)	CSGLFARFVGCV-EDKKMYPIRGQVVLVRNSLDFMASFSSTPE---KEN-EDEALYIMTRF-DGTSIIGGCFQPNNSSE 266
mDAAO	CTGVWAGALQA---DASLQPRGQIIQVEA--PWIKHFILTHD---PSLGIYNSPYIIPG--SKTYTLGGIFQLGNHSG 248
hDAAO	CTGVWAGALQR---DPLLQPRGQIMKQDA--PWWKHFILTHD---PERGIYNSPYIIPG--TQTYTLGGIFQLGNHSEL 250
Td002474	PRMETRLKLENCVRAFPEFVDR-----LE--DFDVLDNVGRRPWRDGLRLEEERIED----- 324
ChDDO(f)	PRDETVDLTRLALQICPDIAAPPYARSWPKDDQVAALRSIVRDVAGFRPSRAGGARVALASAA----- 332
mDDO	PDAELSREIFSRCTLEPSLH-----RAYDIKEKVGRLRPSRP--GVRLOKEILVRG----- 294
hDDO	PDAENSREILSRCCALEPSLH-----GACNIREKVGRLRPSRP--GVRLOTELLARD----- 294
Td001973	PDPAIVRIMKRCVELCPSLVGKG-----QGIE--GLSIIRHGVGLRPLRDPGRVVEAKID----- 328
RgDAAO(f)	VNPETVQRILKHLRLDPTISSDG-----TIE--GIEVLRHNVGLRPARRGPRVEAERIVLPLDRKTSPLSLGRGS 316
TvDAAO(f)	PDPSLTHRLSRALDRFPEITKDG-----PLDIVRECVGHRPGREGGPRVELEKIP----- 317
mDAAO	NSVRDHNTWKSCKLEPTLK-----NARIVGELTFRPVRP--QVRLERELRHG----- 297
hDAAO	NNIQDHNTWEGCRLLEPTLK-----NARIIGEATFRPVRP--QIRLERELRLTG----- 299
Td002474	-----GKTVIHAYGAGRGYELSHGIAKEVADLVATE-RSKFECRVSENK 370
ChDDO(f)	-----GMRVVVNYGHGGAGWQSCWCAEDAVLWAGGAGG-----AR-L 370
mDDO	-----QQTLPVVHNYGHGSGGGSVHNGSALEATRLVMECIHTLRT-PASLSK-L 341
hDDO	-----GQRLPVVHNYGHGSGGGSVHNGTALAARLVSECVHALRT-PIPKSN-L 341
Td001973	-----GQWVVHNYGHGSGGYQASYSGAVAAVEAQLQKK-----TAK-L 368
RgDAAO(f)	AAAAKEKVTLVHAYGFSSAGYQSSNGAEDVAQLVDEAFQRYHG-AARESK-L 368
TvDAAO(f)	-----GVGFVVHNYGAAAGYQSSYGMADEAVSYVERALTR-----PN-L 356
mDAAO	-----SSSAEVIHNYGHGSGYGLTIHNGCAMEAANLFGKILEEKLSRLPPSH-L 345
hDAAO	-----PSNTEVIHNYGHGSGYGLTIHNGCALEAKLFGRILEEKLSRMPPSH-L 347

Fig. 1-2. *T. dupontii* の推定 DAAO と DDO および既知 DAAO と DDO のアミノ酸配列の比較

青塗りは N 末端領域の Wierenga ADP 結合配列: GxGxxG (x は任意のアミノ酸残基) を示す。緑塗りは C 末端領域の PTS1 を示す。(◇)は真菌 DAAO 特異的な Asn 残基または真菌 DDO に特異的な His 残基を示す。(▼)は既知 DAAO と DDO において基質 D-アミノ酸の α-アミノ基または α-カルボキシ基と相互作用することが知られている Tyr, Arg および Gly (Ser) 残基を示す。(▽)は mDDO と hDDO または ChDDO において基質酸性 D-アミノ酸の側鎖カルボキシ基と相互作用する Arg 残基を示す。波線は RgDAAO における二量体化ループを示す。マルチプルアライメントには *T-COFFEE server* (<http://tcoffee.crg.cat/>) を用いた。用いたアミノ酸配列の UniProtKB accession no. を以下に示す: ChDDO, Q75WF1; mDDO, Q220Z0; hDDO, Q99489; RgDAAO, P80324; TvDAAO, Q99042; mDAAO, P18894; hDAAO, P14920.

2.2. *TdDAAO* と *TdDDO* 遺伝子の *E. coli* における発現と発現産物の精製

T. dupotii NRRL2155 株に見出された *TdDAAO* 遺伝子と *TdDDO* 遺伝子それぞれが機能的な DAAO と DDO をコードすることを明らかにするため、これら遺伝子の *E. coli* における発現系の構築を検討した。*TdDAAO* または *TdDDO* 遺伝子を有する pET-15b ベクターを *E. coli* BL21(DE3) pLysS に導入したのち LB 培地で培養し、IPTG 添加により各々の遺伝子を誘導発現させた。その結果、*TdDAAO* 遺伝子を導入した *E. coli* は生育が OD₆₀₀ において 2.0 程度まで増殖し、最終的に 600 ml の LB 培地から湿重量 2.3 g の菌体を得ることができた。一方、*TdDDO* 遺伝子を導入した *E. coli* の場合は、IPTG 添加により生育が停止した (Fig. 1-3)。IPTG を添加しない場合には、生育の停止が観察されなかったことから、この原因として *TdDDO* 遺伝子発現産物の *E. coli* 宿主に対する毒性が考えられた。そこで、*TdDDO* 遺伝子を導入した *E. coli* の生育を増加させるため、LB 培地から富栄養である TB 培地へ変更して培養し、OD₆₀₀ が 3.0 付近に達した時に IPTG 添加により誘導発現させた。その結果、100 ml の TB 培地から湿重量 1.6 g の菌体を得ることができた。

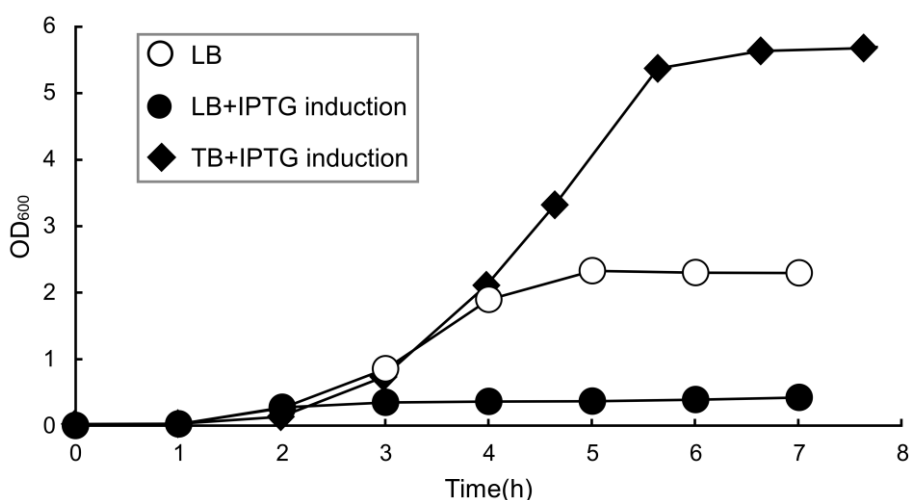


Fig. 1-3. *TdDDO* 遺伝子発現が *E. coli* 宿主の生育に与える影響

TdDDO 遺伝子発現ベクターを導入した *E. coli* BL21(DE3) pLysS を 37°C で培養した。LB 液体培地では *E. coli* 培養液の OD₆₀₀ が 0.5 付近、TB 液体培地では 3.0 付近に達した時に終濃度 1 mM IPTG を添加した。

得られた各遺伝子を発現させた *E. coli* から粗抽出液を調製し、種々の D-アミノ酸に対するオキシダーゼ活性を測定した。測定の結果、*TdDAAO* 遺伝子を発現させた *E. coli* の粗抽出液は D-Met に対して最も高い活性 (0.59 U/mg) を示した (Fig. 1-4a)。また、D-Phe や D-Tyr といった嵩高く疎水性の強い中性 D-アミノ酸や、D-Leu や D-Gln といった中程度の大きさの中性 D-アミノ酸に対しても D-Met と同程度の比活性を示した。一方、酸性である D-Asp と D-Glu に対してはほとんどもしくは全く活性を示さなかった。*TdDDO* 遺伝子を発現させた *E. coli* の粗抽出液は D-Glu に対して最も高い活性 (15.0 U/mg) を示した (Fig. 1-4b)。また、D-Asp に対しても比較的高い活性 (11.0 U/mg) を示した。一方、酸性以外の中性と塩基性 D-アミノ酸に対しては、D-Gln を除き、ほとんどもしくは全く活性を示さなかった。したがって、アミノ酸配列から推定されたように、*TdDAAO* 遺伝子と *TdDDO* 遺伝子はそれぞれ機能的な DAAO と DDO をコードしていることが明らかになった。

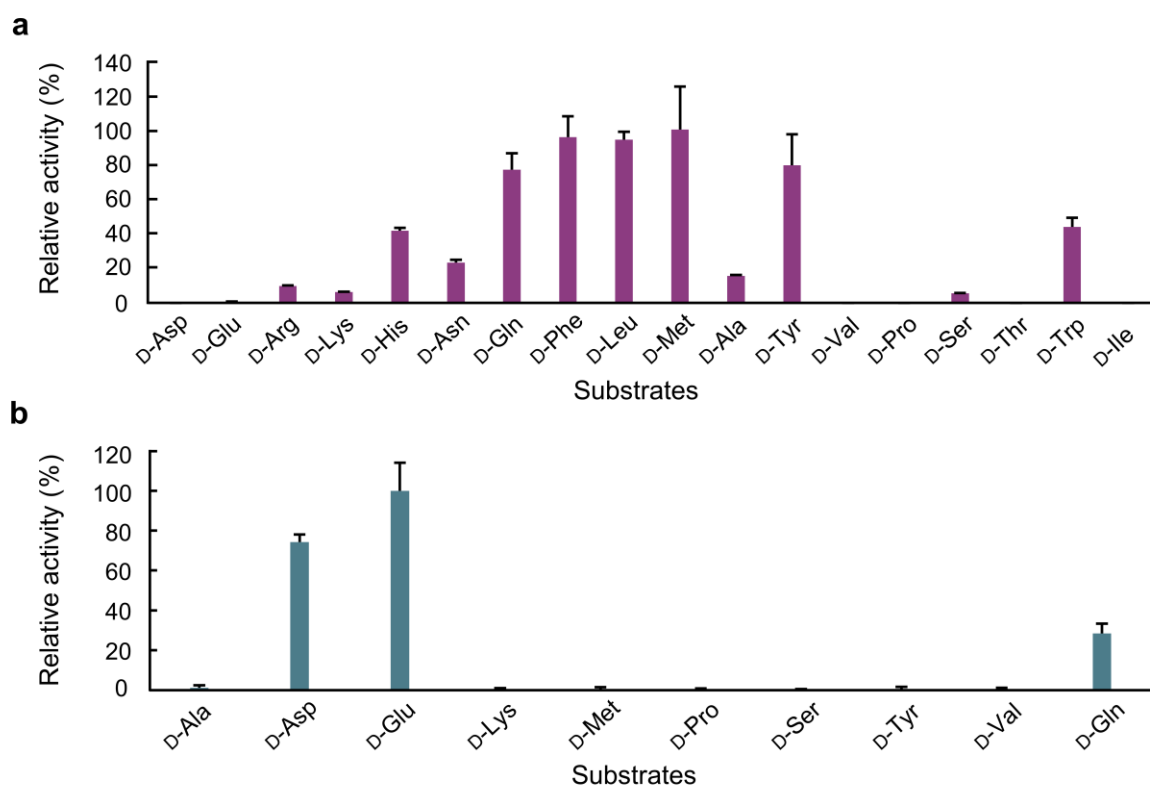


Fig. 1-4. 組換え *E. coli* 粗抽出液を用いた *TdDAAO* と *TdDDO* 遺伝子発現産物の基質特異性

(a) *TdDAAO* と (b) *TdDDO* 遺伝子発現 *E. coli* 粗抽出液の基質特異性。 *TdDAAO* または *TdDDO* 遺伝子を発現させた *E. coli* 粗抽出液を用いて、基質 20 mM D-アミノ酸 (1.5 mM D-Tyr を除く) に対するオキシダーゼ活性を 37°C, 20 μ M FAD 存在下で *o*-dianisidine/HRP カップリング法により測定した。 *TdDAAO* と *TdDDO* において、それぞれ D-Met と D-Glu に対する比活性 (0.59 U/mg と 15.0 U/mg) を 100% とした相対活性を示した。活性は 3 回測定し、平均値を示した。エラーバーは標準偏差を示す。

次に、各遺伝子を発現させた *E. coli* 粗抽出液から TdDAAO と TdDDO を His タグアフィニティーカラムを用いて精製した。精製した TdDAAO と TdDDO を SDS-PAGE に供したところ、どちらも His タグ融合タンパク質としての分子質量 (42 kDa と 44.5 kDa) に相当する位置に単一のバンド (>95%以上) が観察され、電気泳動的に単一に精製されたことが分かった (Fig. 1-5ab)。最終的に、TdDAAO 遺伝子を発現させた *E. coli* 粗抽出液から、TdDAAO を収率 46.2% で 84.7 倍にまで精製し、0.95 mg (総タンパク質量) の精製酵素標品を取得した。

精製した TdDAAO は 37°C において 20 mM D-Met に対して 50.8 U/mg の比活性を示した。*E. coli* で発現させた好熱性細菌由来の RxDAAO は 60°C で D-Val に対して最も高い比活性 21.1 U/mg を示すことが知られている(45)。したがって、TdDAAO は RxDAAO よりも高い活性を有することが分かった。しかしながら、既知 DAAO のなかでも高活性だとされる RgDAAO と TvDAAO はそれぞれ 25°C で D-Met に対し 80 U/mg と D-Trp に対し 123 U/mg (どちらも最良基質) の比活性を有することが知られている(155)。したがって、既知 DAAO のなかでも、37°C においては、TdDAAO は中程度の活性を有する DAAO であることが明らかとなった。

一方、TdDDO 遺伝子を発現させた *E. coli* 粗抽出液から、TdDDO を収率 27.3% で 2.6 倍にまで精製し、6.7 mg (総タンパク質量) の精製酵素標品を取得した。精製した TdDDO は 37°C と 60°C において 20 mM D-Glu に対してそれぞれ 46.3 と 169 U/mg の比活性を示した。中温性真菌 *C. boidinii* 由来 DDO の至適温度 37°C における D-Glu に対する比活性は 41.4 U/mg であると報告されている(60)。また、hDDO と mDDO の 37°C における D-Glu に対する比活性は 7.8 U/mg であり(156)、ChDDO は 37°C において 2.3 U/mg の比活性を示す(58)。したがって、TdDDO は既知 DDO のなかでも、D-Glu に対して優れた触媒能を有する DDO であることが分かった。

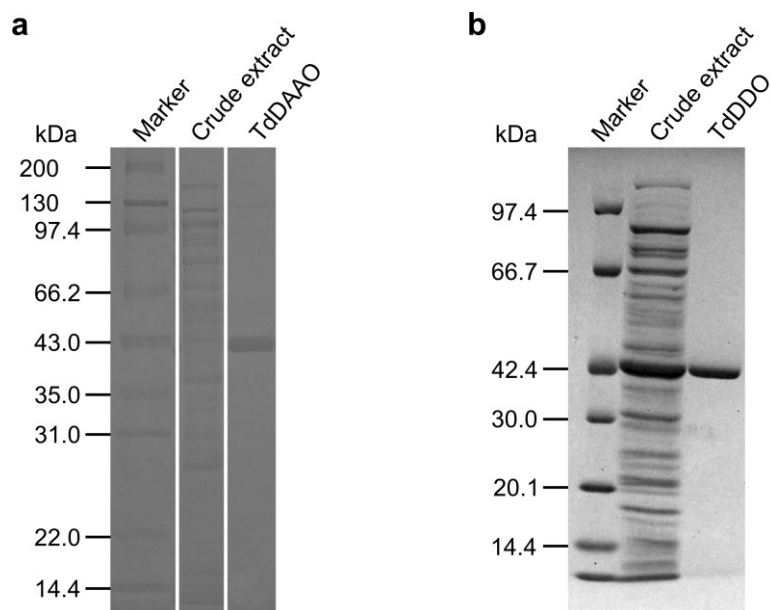


Fig. 1-5. 精製した TdDAAO と TdDDO の SDS-PAGE 解析

(a) Marker, 分子量マーカー; Crude extract, *TdDAAO* 遺伝子発現 *E. coli* 粗抽出液 (15 μ g); TdDAAO, 精製 TdDAAO (1.5 μ g). (b) Marker, 分子量マーカー; Crude extract, *TdDDO* 遺伝子発現 *E. coli* 粗抽出液 (15 μ g); TdDAAO, 精製 TdDDO (1.5 μ g). 12.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いてタンパク質を分離し, CBB G-250 を用いて染色した.

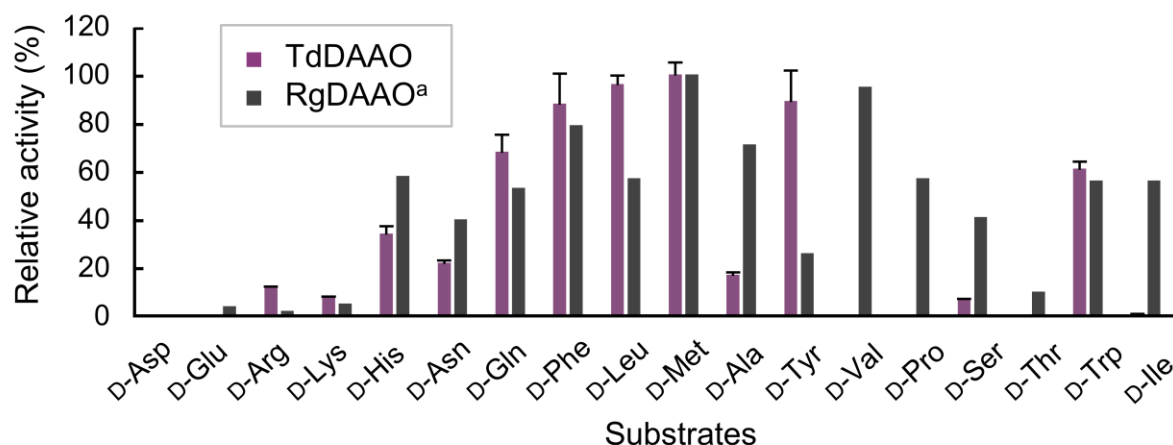
2.3. TdDAAO と TdDDO の酵素学的諸特性解析

2.3.1. TdDAAO と TdDDO の基質特異性解析

精製した TdDAAO と TdDDO を用いて基質特異性を解析した。その結果、*E. coli* 粗抽出液における基質特異性の解析結果と同様に、TdDAAO は D-Met に対して最も高い活性 (50.8 U/mg) を示した (Fig. 1-6a)。また、TdDAAO は D-Leu, D-Phe, D-Gln および D-Trp に対しても比較的高い活性を有することが分かった。一方、塩基性である D-Arg, D-Lys と D-His などの基質に対する活性は低かった。また、構造的に小さな D-Ala に対する活性も低く、疎水性側鎖を有する D-Ile や、D-Val と D-Pro などに対してはほとんど活性を示さなかった。これらの結果から、TdDAAO の基質特異性は、RgDAAO といった既知の広基質特性 DAAO と比べて、狭いことが分かった (Fig. 1-6a)。したがって、TdDAAO は本研究の目的とする広基質特異性を有する DAAO でなかったことから、さらなる解析をしないこととした。

TdDDO も、*E. coli* 粗抽出液における基質特異性の解析結果と同様に、D-Glu に対して最も高い活性 (46.3 U/mg) を示し、次いで D-Asp に高い活性を示すことが分かった (Fig. 1-6b)。また、D-Asp の α -アミノ基がメチル化されている *N*-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) と中性 D-アミノ酸である D-Gln に対しても比較的高い活性を示した。一方、他の中性と塩基性 D-アミノ酸や Gly に対してはほとんどもしくは全く活性を示さなかった。したがって、TdDDO は既知の DDO と同様に、中性と塩基性 D-アミノ酸ではなく、酸性 D-アミノ酸に高い活性を示す DDO であることが明らかとなった。また、D-Asp よりも D-Glu に対して高い活性を示すことが分かった。

a



b

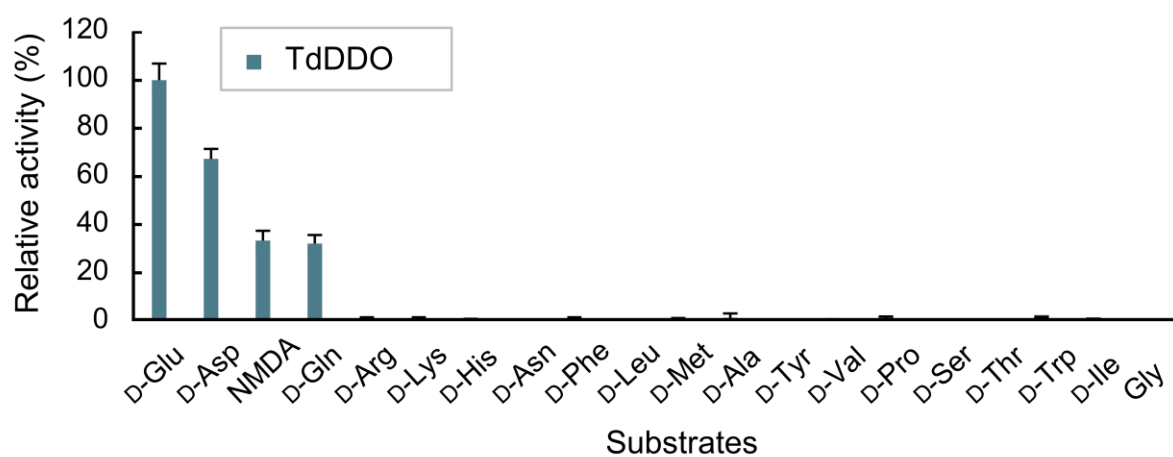


Fig. 1-6. 精製 TdDAAO と TdDDO の基質特異性

(a) 精製 TdDAAO と RgDAAO の基質特異性. (b) 精製 TdDDO の基質特異性. 精製 TdDAAO または TdDDO を用いて, 基質 20 mM アミノ酸 (1.5 mM D-Tyr を除く) に対するオキシダーゼ活性を 37°C, 20 μ M FAD 存在下で *o*-dianisidine/HRP カップリング法により測定した. TdDAAO と TdDDO において, それぞれ D-Met と D-Glu に対する比活性 (50.8 U/mg と 46.3 U/mg) を 100%とした相対活性を示した. 活性は 3 回測定し, 平均値を示した. エラーバーは標準偏差を示す. ^aは Gabler らのデータ(41)を用いた.

2.3.2. TdDDO の酵素反応速度論的パラメーター解析

TdDDO の触媒特性についてより詳細に理解するために、酵素反応速度論的パラメーターを解析した。その結果、TdDDO は D-Glu に対して最も低い K_m (2.16 mM) と最も高い k_{cat} (217 s⁻¹) を示した (Table 1-2)。したがって、TdDDO は D-Glu に対して最も高い $k_{cat} K_m^{-1}$ (100,000 s⁻¹ M⁻¹) 示し、D-Glu が最良の基質であることが分かった。また、既知の DDO なかでも、TdDDO は D-Glu に対して最も優れた反応速度論特性を有していた (Table 1-6)。

TdDDO の三次元構造モデルを作成し、その推定基質結合部位を他の既知 DAAO と DDO の結晶構造および三次元モデル構造と比較したところ、他の既知 DAAO と DDO において基質 D-アミノ酸の α -カルボキシ基と α -アミノ基と相互作用することが知られている Arg と Gly/Ser 残基に対応する位置 (Fig. 1-7b, mDDO モデル; Arg278, Ser308) に、Arg308 と Gly335 残基が見出された (Fig. 1-7a)。一方、他の既知 DAAO と DDO の全てに保存されている基質の α -カルボキシ基と相互作用する Tyr 残基に対応する位置に、アミノ酸配列アライメントからも推定されたように、TdDDO では Phe (Phe248) 残基が存在した。また、他の既知 DDO で酸性 D-アミノ酸に対する基質特異性に寄与することが知られている His, Arg および Arg 残基に対応する位置 (Fig. 1-7b, mDDO モデル; His54, Arg216, Arg237) に、His70, Arg242 および Lys263 残基が存在した (Fig. 1-7a)。

Table 1-2. TdDDO の酵素反応速度論的パラメーター

Substrates	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	$k_{cat} K_m^{-1}$ (s ⁻¹ M ⁻¹)
D-Glu	217 ± 14	2.16 ± 0.23	100,000
D-Asp	123 ± 10	8.77 ± 1.1	14,000
NMDA	155 ± 47	103 ± 23	1,500
D-Gln	144 ± 58	108 ± 32	1,330

D-Glu は 0.1–50 mM, D-Asp, NMDA および D-Gln は 1–50 mM を用いて、60°C, 20 μ M FAD 存在下で *o*-dianisidine/HRP カップリング法により DDO 活性を測定した。3 回測定し、その平均値と標準偏差を示した。

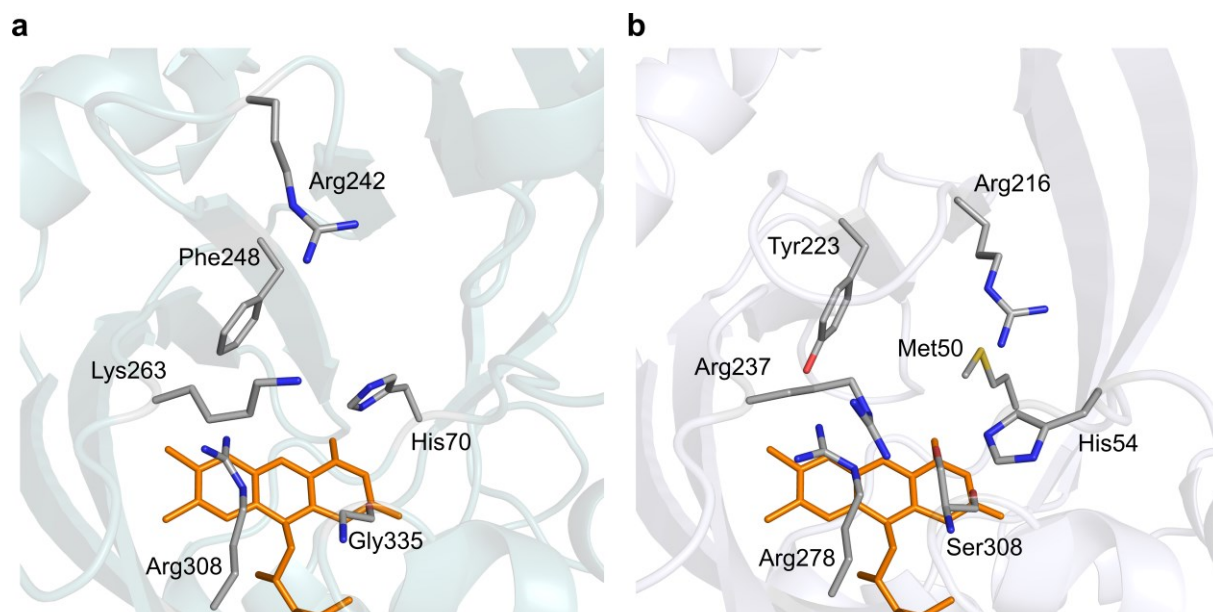


Fig. 1-7. TdDDO と mDDO モデル構造の基質結合部位の比較

原子の配色：炭素原子，灰；窒素原子，青；酸素原子，赤；硫黄原子，黄．補酵素 FAD は橙で示した．I-TASSER On-line Server (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) を用いてモデル構造を構築した．PyMOL ver 2.4 を用いて作図した．

2.3.3. TdDDO の補酵素解析

TdDDO がフラビン含有かどうかを明らかにするため、精製 TdDDO の吸収スペクトルを測定した。その結果、TdDDO は典型的なフラビン酵素で観察される 273, 375 および 455 nm に吸収極大を有するスペクトルが観察された (Fig. 1-8a)。このことから、TdDDO は他の DAAO や DDO と同様にフラビン含有することが分かった。また、酵素溶液への D-Glu 添加後の吸収スペクトルを測定したところ、375 と 455 nm の吸収極大が消失した (Fig. 1-8a)。このことから、含有するフラビンの還元が示唆され、含有する FAD が補酵素として機能していると考えられた。

次に、TdDDO が含有するフラビンが共有結合もしくは非共有結合のどちらの様式で結合しているか解析した。精製 TdDDO を熱変性させたのちに遠心分離により回収した上清はフラビン由来する黄色を呈したことから、TdDDO が含有するフラビンは、他の DAAO や DDO 同様に、非共有結合的に結合していることが示された。さらに、上清を薄層クロマトグラフィー (TLC) に供したところ、上清中のフラビンの R_f 値 (0.22) は FMN ではなく FAD の値と一致したことから、TdDDO は FAD を補酵素とすることが示唆された (Fig. 1-8b)。TLC 解析では、FMN、FAD と TdDDO が同じモル濃度になるように供したが、TdDDO 由来のフラビンの蛍光強度は、FMN や FAD と比べて弱かったことから、アポ体の存在が示唆された。そこで、0.34 mM TdDDO タンパク質の熱変性後の遠心上清の FAD を定量したところ、その濃度は 0.16 mM だった。また、FAD を含む反応系では酵素活性が 57.6 U/mg であったのに対し、FAD を含まない反応系では 39.4 U/mg だった。これらのことから、精製した TdDDO の 40–50%程度はアポ体として存在すると考えられた。

次に、TdDDO と FAD の結合強度 (解離定数 K_d) を明らかにするため、TdDDO のアポ化を検討した。その結果、2 M KBr に対し TdDDO 溶液を 5 日間透析したにもかかわらず、FAD の有意な量の放出は観察されなかった。したがって、TdDDO の FAD に対する K_d を求めることは出来なかったが、その結合は非常に強固と考えられた。

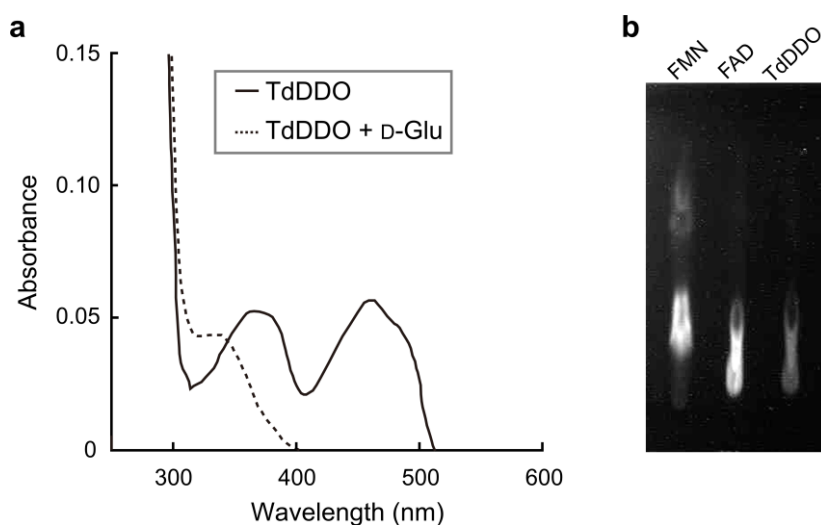


Fig. 1-8. TdDDO の補酵素フラビンの解析

(a) TdDDO の吸収スペクトル解析. 20 μ M TdDDO の 200–600 nm における吸光度を測定した. 実線は D-Glu を添加せずに 40°C で 10 分間保温後, 点線は終濃度 50 mM D-Glu を添加し 40°C で 10 分間保温後に測定した吸収スペクトルを示す. (b) TLC 解析. 左から順に, 1 μ l 標準 100 μ M FMN; 1 μ l 標準 100 μ M FAD; 1 μ l 100 μ M TdDDO タンパク質熱変性後の遠心上清. 展開溶媒としてクロロホルム, 酢酸および蒸留水の混合液 (6:7:1) を用いた.

2.3.4. TdDDO の四次構造解析

TdDDO の四次構造を明らかにするために, TdDDO (タンパク質濃度 0.5 mg/ml) をゲル濾過クロマトグラフィーに供し, 分子量を求めた. その結果, TdDDO の分子質量は約 38 kDa であり, His タグを付加したアミノ酸配列から算出された分子質量 44.5 kDa と概ね一致した (Fig. 1-9). したがって, TdDDO はタンパク質濃度 0.5 mg/ml において単量体として存在することが明らかとなった.

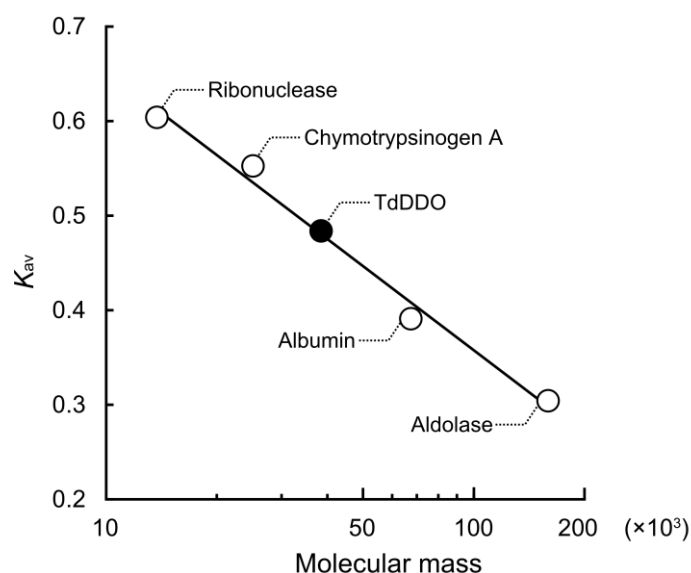


Fig. 1-9. TdDDO のゲル濾過クロマトグラフィー

タンパク質濃度 0.5 mg/ml の TdDDO の分配係数 K_{av} を標準タンパク質から得られたものと比較することで算出した. 標準タンパク質として以下を用いた: ribonuclease A, 13.7 kDa; chymotrypsinogen A, 25.0 kDa; albumin, 67.0 kDa; aldolase, 158 kDa.

2.3.5. TdDDO の至適 pH と pH 安定性の解析

TdDDO の至適 pH を明らかにするため、pH 6.0–10.0 でそれぞれ TdDDO の活性を測定した。その結果、TdDDO は pH 8.0 で最も高い活性を示したことから至適 pH は 8.0 であることが明らかとなった (Fig. 1-10a)。また、pH 6.5–7.0 の弱酸性領域と pH 8.5 の弱塩基性領域においても高い活性 (80–90%の相対活性) を示した。一方、pH が 6.0 以下や 9.0 以上になるにつれて活性は低下していった。

次に、TdDDO の pH 安定性を明らかにするため、異なる pH で TdDDO をそれぞれ 1 時間保温した後の残存活性を測定した。その結果、TdDDO は pH 5.0–10.0 で比較的高い残存活性を示したことから、この pH 領域で安定であることが明らかとなった (Fig. 1-10b)。一方、pH 5.0 以下の酸性領域や pH 11.0 の塩基性領域での残存活性は著しく低下し、失活することが分かった。

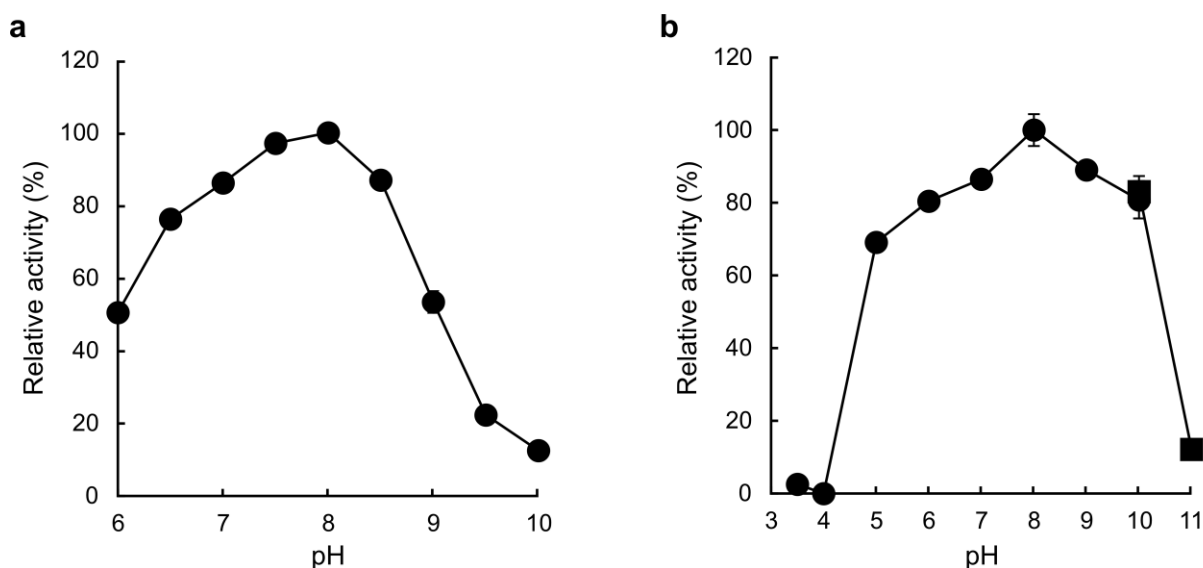


Fig. 1-10. TdDDO の pH 特性

(a) pH が活性に与える影響. pH 6.0–10.0 (25 mM GTA buffer) の反応系で、20 mM D-Glu を基質として用いて、20 μ M FAD 存在下で 2, 4-DNPH 法により 60°C で活性を測定した。pH 8.0 における活性を 100%とした相対活性を示した。(b) pH が安定性に与える影響. pH 3.5–10.0 (25 mM GTA buffer) と pH 10.0–11.0 (25 mM CAPS buffer) で 45°C で 1 h 保温後、20 mM D-Glu を基質として用いて、20 μ M FAD 存在下で *o*-dianisidine/HRP 法により 60°C で活性を測定した。pH 8.0 で保温後の活性を 100%とした相対活性を示した。3 回測定し、その平均値を示した。エラーバーは標準偏差を示す。

2.3.6. TdDDO の至適温度と耐熱性の解析

TdDDO の至適温度 (T_{opt}) を明らかにするため、30–75°C で TdDDO の活性を測定した。その結果、TdDDO は 60°C において最も高い活性を示したことから、 T_{opt} は 60°C であることが分かった (Fig. 1-11a)。

次に、TdDDO の温度安定性を明らかにするため、20–75°C で 1 時間保温後の TdDDO (0.1 mg/ml) の残存活性を測定した。その結果、TdDDO の残存活性は 45°C まで一定で高かったことから (Fig. 1-11b)、この温度範囲で安定であることが分かった。また、TdDDO の 0.1 mg/ml における T_{50}^{60} (初期活性の 50% が失われる 60 min の保温温度) は 51°C であった。さらに、0.1 mM の FAD を添加した場合の T_{50}^{60} は 56°C であり、無添加の T_{50}^{60} よりも 5°C 増加したことから、アポ体への FAD 結合による安定化が示唆された (Fig. 1-11b)。

次に、タンパク濃度が TdDDO の耐熱性に与える影響を明らかにするため、0.005, 0.02, 0.1 mg/ml のタンパク質濃度で 45°C で 60 min 保温後の TdDDO の残存活性を測定した。その結果、0.1 から 0.02 mg/ml のタンパク質濃度の低下に伴い TdDDO の残存活性は約 60% 減少し、0.1 から 0.005 mg/ml への濃度低下では約 70% 減少した (Fig. 1-11c)。これらの結果から、TdDDO の耐熱性はタンパク質濃度に依存することが明らかとなった。また、0.1 mM FAD を添加した場合、0.02 mg/ml においてわずかに安定化効果が見られたが、0.005 mg/ml では安定化効果が見られなかったことから、TdDDO のタンパク質濃度低下による不安定化は FAD 添加により抑制できないことが分かった (Fig. 1-11c)。

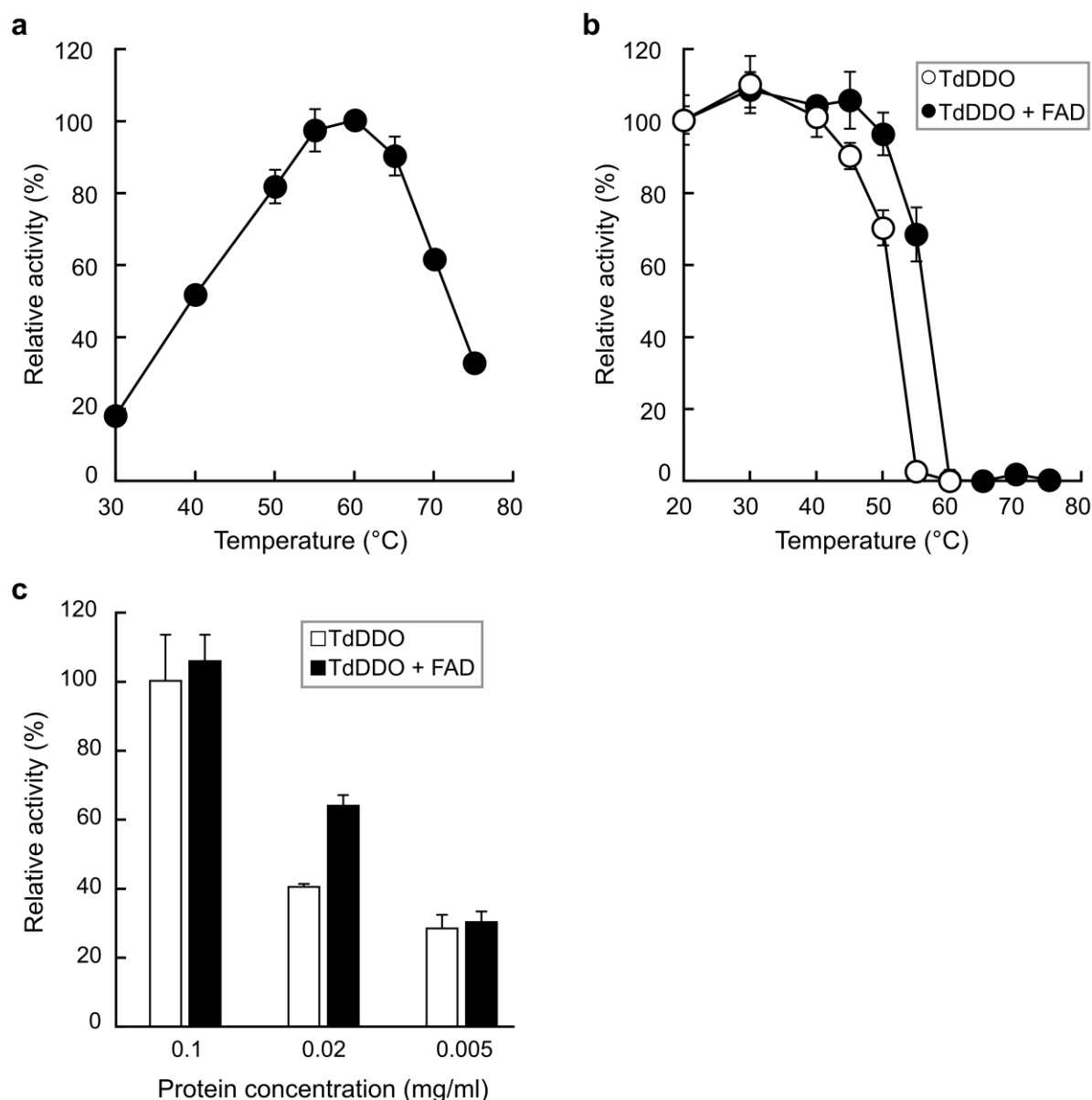


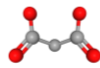
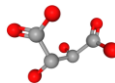
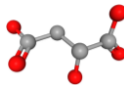
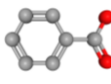
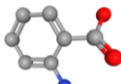
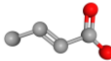
Fig. 1-11. TdDDO の温度特性

(a) 温度が活性に与える影響. 30–75°C の反応温度で, 20 mM D-Glu を基質として用いて, 20 μ M FAD 存在下で 2, 4-DNPH 法により DDO 活性を測定した. 60°C での活性を 100%とした相対活性で示した. (b) 温度が安定性に与える影響. 20–75°C で TdDDO (タンパク質濃度 0.1 mg/ml) を 1 h 保温した後, 20 mM D-Glu を基質として用いて, 20 μ M FAD 存在下で *o*-dianisidine/HRP 法により 60°C で残存 DDO 活性を測定した. 20°C での保温後の残存活性を 100%とした相対活性で示した. (c) タンパク質が耐熱性に与える影響. タンパク質濃度 0.1, 0.02, 0.005 mg/ml の TdDDO を 0.1 mM FAD 存在または非存在下で 45°C で 1 h 保温した後, 20 mM D-Glu を基質として用いて, 20 μ M FAD 存在下で *o*-dianisidine/HRP 法により 60°C で残存活性を測定した. 0.1 mg/ml で FAD 非存在下における保温後の残存活性を 100%とした相対活性で示した. 活性はそれぞれ 3 回測定し, その平均値を示した. エラーバーは標準偏差を示す.

2.3.7. TdDDO の DAAO および DDO 阻害剤の影響解析

TdDDO の DDO と DAAO 競合的阻害剤に対する影響を解析した。その結果, 10 mM では, DAAO 競合的阻害剤 (benzoate, anthranilate, crotonate) だけでなく DDO 競合的阻害剤 (malonate, *meso*-tartrate, D-malate) でも阻害は観察されなかった (Table 1-3)。50 mM では, DDO 競合的阻害剤のなかで最も構造の小さい malonate による阻害は見られなかったが, *meso*-tartrate と D-malate によりそれぞれ 23%と 38%の活性が阻害された。一方, 50 mM DAAO 競合的阻害剤では, anthranilate のみが約 11%とわずかに活性を阻害した。

Table 1-3. DDO と DAAO 競合的阻害剤の TdDDO 活性への影響

Compounds		Concentration (mM)	Mean relative activity \pm SD (%)
None			100
DDO inhibitors			
Malonate		10	108 \pm 2.8
		50	96.1 \pm 1.8
<i>meso</i> -Tartate		10	103 \pm 0.6
		50	76.9 \pm 0.8
D-Malate		10	95.9 \pm 0.6
		50	61.6 \pm 1.6
DAAO inhibitors			
Benzoate		10	106 \pm 2.5
		50	100 \pm 3.1
Anthranilate		10	102 \pm 4.0
		50	89.1 \pm 0.2
Crotonate		10	102 \pm 4.0
		50	95.9 \pm 1.9

10 または 50 mM 阻害剤存在下で, 20 mM D-Glu を基質として用い, 20 μ M FAD 存在下で 2,4-DNPH 法により 37°C で活性を測定した。3 回測定し, その平均値と標準偏差 (SD) を示した。原子の配色: 灰, 炭素原子; 赤, 酸素原子; 青, 窒素原子。

2.4. *TdDDO F248Y* バリエント遺伝子の *E. coli* における発現と精製

前述したように, *TdDDO* のアミノ酸配列アライメントや三次元構造モデルから, 既知の *DDO* や *DAAO* において基質 α -カルボキシ基と水素結合を形成する Tyr 残基に対応する位置に Tyr 残基が存在せず Phe 残基 (Phe248) の存在が示唆された (Fig. 1-7, Fig. 1-16, Fig. 1-18). そこで, 実際に Phe248 残基が基質結合部位に存在する可能性を探ること, 基質との水素結合導入による基質親和性の向上を期待し, Phe248 残基を Tyr 残基に置換したバリエント (*F248Y* バリエント) を作成し野生型と同様な方法で *E. coli* で発現させた. 100 ml の TB 培地から *TdDDO F248Y* 遺伝子を IPTG で誘導発現させた *E. coli* が 1.2 g (湿重量) 得られた. 得られた菌体から *TdDDO* を精製し, SDS-PAGE に供したところ, His タグ融合としての分子質量 42.4 kDa に対応する位置に単一のバンド (>95%以上) を示したことから, 電気泳動的に単一に精製されたことが分かった (Fig. 1-12). 最終的に, *TdDDO F248Y* 遺伝子を発現させた *E. coli* 粗抽出液から, *TdDDO F248Y* を収率 27.9% で 5.5 倍にまで精製し, 3.9 mg (総タンパク質量) を取得した. 精製した *TdDDO F248Y* は 37°C において 20 mM D-Glu に対して 6.7 ± 1.2 U/mg の活性を示したことから, 変異導入により活性が低下した.

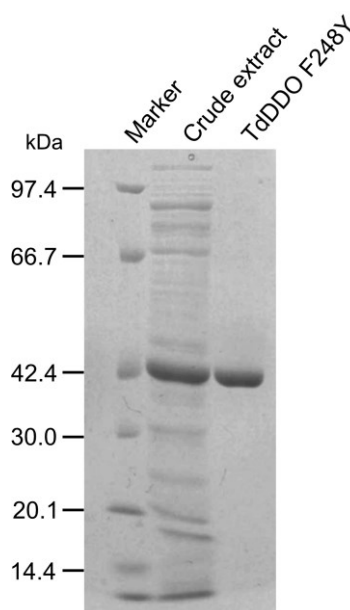


Fig. 1-12. *TdDDO F248Y* バリエントの SDS-PAGE 解析

Marker, 分子量マーカー; Crude extract, *TdDDO F248Y* 遺伝子発現 *E. coli* 粗抽出液 (10 μ g); *TdDDO F248Y*, *TdDDO F248Y* (2.0 μ g). 12.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いてタンパク質を分離し, CBB G-250 を用いて染色した.

2.5. TdDDO F248Y バリエントの酵素学的諸特性解析

2.5.1. TdDDO F248Y バリエントの基質特異性

変異導入による基質特異性への影響を明らかにするため、TdDDO F248Y バリエントの種々の D-アミノ酸 (20 mM) に対する活性を測定した。その結果、F248Y バリエントは野生型とは異なり、NMDA に対しても最も高い活性 12.8 U/mg を示した (Fig. 1-13)。次いで、D-Glu に 8.4 U/mg、D-Gln に 7.2 U/mg、D-Asp に 6.0 U/mg の活性を示した。また、野生型と同様に、F248Y バリエントは他の中性および塩基性 D-アミノ酸に対してほとんど活性を示さなかった。

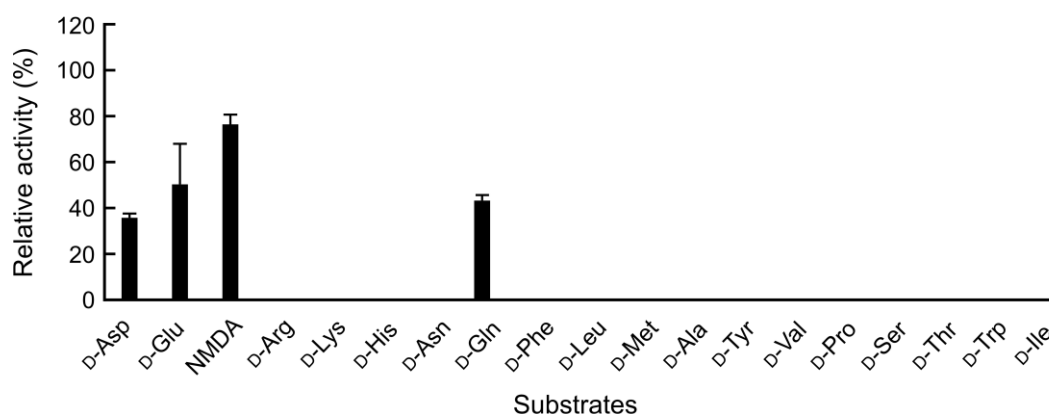


Fig. 1-13. TdDDO F248Y バリエントの基質特異性

精製 TdDAAO F248Y バリエントを用いて、基質 20 mM D-アミノ酸 (1.5 mM D-Tyr を除く) に対するオキシダーゼ活性を 20 μ M FAD 存在下で *o*-dianisidine/HRP カップリング法により 37°C で測定した。NMDA に対する比活性 12.8 U/mg を 100%とした相対活性を示した。活性は 3 回測定し、平均値を示した。エラーバーは標準偏差を示す。

2.5.2. TdDDO F248Y バリエーションの酵素反応速度論的パラメーター解析

TdDDO F248Y バリエーションの触媒特性についてより詳細に理解するために、酵素反応速度論的パラメーターを解析した。その結果、D-Glu に対する K_m は 0.713 mM と最も小さく、野生型の 1/3 となった (Table 1-4)。また、D-Asp, D-Gln と NMDA に対する K_m もそれぞれ野生型の約 1/10, 1/4 と 1/15 となった。一方、F248Y バリエーションの D-Glu に対する k_{cat} は野生型の約 1/4 となり、また D-Asp, NMDA と D-Gln に対する k_{cat} も野生型の約 1/2–1/4 となった。結果として、F248Y バリエーションの $k_{cat} K_m^{-1}$ は D-Asp に対して野生型より大きくなったが、それ以外の基質ではほとんど変化がなかった (Table 1-2, Table 1-4)。これらの結果より、F248Y 置換により、触媒活性は低下するものの、予想通り基質親和性の増加が観察された。また、推測どおり Phe248 残基が基質結合部位に存在することが示唆された。

Table 1-4. TdDDO F248Y バリエーションの酵素反応速度論的パラメーター

Substrates	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	$k_{cat} K_m^{-1}$ ($s^{-1} M^{-1}$)
D-Glu	58.1 ± 2.8	0.713 ± 0.081	81,500
D-Asp	50.9 ± 2.4	0.869 ± 0.096	58,600
NMDA	68.9 ± 13	6.73 ± 6.7	10,200
D-Gln	39.9 ± 7.5	25.7 ± 5.2	1,550

D-Glu は 0.1–50 mM, D-Asp, NMDA および D-Gln は 1–50 mM を用いて、20 μ M FAD 存在下で *o*-dianisidine/HRP カップリング法により DDO 活性を 60°C で測定した。3 回測定し、その平均値と標準偏差を示した。

3. 考察

好熱性真菌における DAAO と DDO ホモログ遺伝子

好熱性真菌 *T. dupontii* において DAAO と DDO 遺伝子がそれぞれ 1 つずつ見出されたことから、他の好熱性真菌においても各ホモログ遺伝子が存在するか真菌ゲノムデータベース Genozymes (<https://pub.fungalgenomics.ca/>) に登録されている 5 株の好熱性真菌—*Thermomyces lanuginosus*, *Thermoascus aurantiacus*, *Chaetomium thermophilum*, *Crassiacarpon thermophilum* および *Thermothelomyces thermophilus*—において各ホモログ遺伝子を探索した。その結果、DAAO と DDO に共通して保存されているアミノ酸残基を有し、かつ真菌の DAAO と DDO にそれぞれ特異的な Asn と His 残基を有するタンパク質をコードする遺伝子が 5 株全てにおいてそれぞれ 1 つずつ見出された (Fig. 1-14)。このことから、DAAO と DDO の両方の存在は好熱性真菌において一般的であると考えられた。したがって、他の好熱性真菌からも耐熱性を有する DAAO や DDO を取得できる可能性が示唆された。多くの動物においても両 D-アミノ酸酸化酵素の存在が報告されている(31)。真核生物の DAAO と DDO のアミノ酸配列同一性と分子系統解析から、真菌 DAAO と DDO は真菌内で、動物 DAAO と DDO は動物内で分岐進化した可能性が示されていることから、DAAO を基に必要に応じて DDO が作り出されてきたと考えられる(58)。しかし、ゲノム上の *TdDAAO* 遺伝子は 5 つのイントロンで分断されていたが、*TdDDO* 遺伝子にはイントロンが存在せず、1 つのエキソンで構成されていた (Fig. 1-14)。 *T. dupontii* と同属の *T. lanuginosus* の両遺伝子も同数のイントロンで同様な位置で分断されていた。一方、*T. dupontii* と同目 (*Eurotiales*) だが異なる科 (*Thermoascaceae*) に属する *Thermoascus aurantiacus* の DAAO 遺伝子は同様であったが、DDO 遺伝子は 2 つのイントロンで分断されていた。また、*Sordariales* 目の *Cheatomiaceae* 科に属する 3 株の DAAO 遺伝子と DDO 遺伝子はそれぞれ 3 つと 2 つのイントロンで分断されていたが、*Thermothelomyces thremophilus* の DDO 遺伝子におけるイントロン位置は他と大きく異なっていた。このように、好熱性真菌の DAAO と DDO 遺伝子は多様なエキソン-イントロン構造を有することから、両遺伝子は真菌の早い段階で分岐し進化したと考えられる。

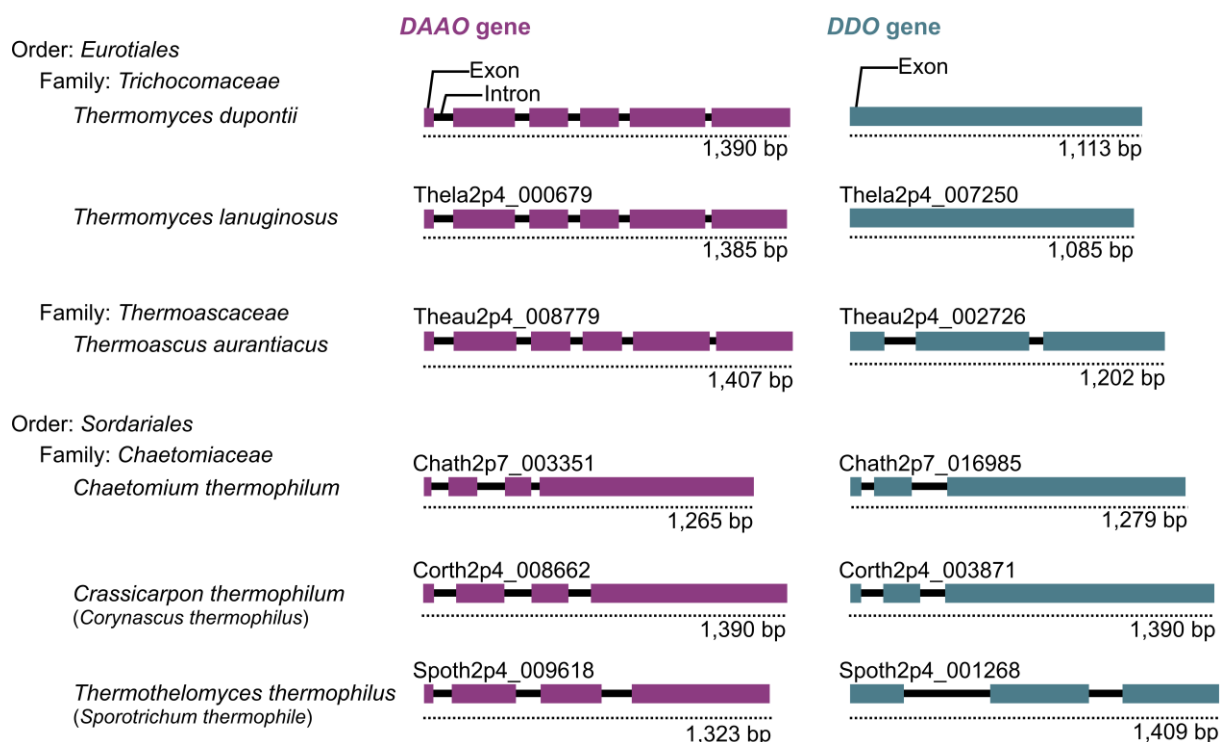


Fig. 1-14. ゲノム配列既知の好熱性真菌における *DAAO* と *DDO* ホモログ遺伝子のエクソン-イントロン構造

TdDAAO または TdDDO のアミノ酸配列を用いて、真菌ゲノムデータベース Genozymes (<https://pub.fungalgenomics.ca/>) の“confident”と明記された好熱性真菌のゲノム配列に対して、TdDAAO または TdDDO のアミノ酸配列を用いて BLAST 検索を行い、*DAAO* と *DDO* 遺伝子を探索した。

一般的に *DAAO* と *DDO* はペルオキシソームタンパク質であることから、そのアミノ酸配列にペルオキシソーム標的シグナル (PTS) が観察される。PTS には、タンパク質の C 末端に存在する PTS type 1 (PTS1; [S/T/A/G/C/N]-[R/K/H]-[L/I/V/M/A/F/Y]; PROSITE, PS00342) と N 末端領域に存在する PTS type 2 (PTS2; [R/K]-[L/V/I/Q]-X-X-[L/V/I/H/Q]-[L/S/G/A/K]-X-[H/Q]-[L/A/F];(157)) がある。*DAAO* や *DDO* には PTS1 が見出されており、PTS1 受容体である peroxin protein 5 (Pex5p) に結合してペルオキシソームに輸送され则认为られている(158)。しかし、本研究で見出された TdDDO には PTS1 は観察されず、また PTS2 も見出されなかったことから、TdDDO は細胞質に局在している可能性が示唆された。線虫 *C. elegans* に見出される 3 つの *DDO* (CeDDO-1, 2 および 3) のうち、CeDDO-2 は PTS シグナルを持たないことから細胞質に局在していると考えられている(159)。しかし、ヒト由来の hDDO の C 末端配列は S-N-L (Fig. 1-2) であり PTS1 配列に一致しないが、Pex5p と相互作用しペルオキシソームに局在することが明らかにされている(160, 161)。また、PTS1 のコンセンサスに一致しない配列を持つタンパク質のペルオキシソーム局在性が複数観察されていることから、TdDDO も hDDO と同様にペルオキシソームに局在する可能性はある(162)。

TdDAAO と TdDDO 遺伝子の *E. coli* における発現

様々な生物種由来の DDO や DAAO の構造や酵素学的特性は主に *E. coli* で発現された組換え体を用いて解析されている(31, 93). しかし, 本研究において, *E. coli* を宿主として TdDDO 遺伝子を発現させると *E. coli* の生育は停止した (Fig. 1-3). DAAO や DDO 遺伝子発現により *E. coli* の生育が停止する例はこれまでに報告されていないが, TvDAAO の *E. coli* における生産において, 培養液に D-Ala や D-Met を添加しておくことで, DAAO の収量が増加することが報告されている(163). この理由として, 細胞壁 PG (Fig. 1-15) の構成原料となる細胞内の D-Ala が発現した TvDAAO により分解されることで *E. coli* の生育が低下するが, D-Ala や D-Met (競合分解による D-Ala 分解の抑制によると推測) を培養液に添加することで細胞壁に D-Ala を十分に供給できるため生育の低下が抑制され DAAO の収量が増加したと考えられている. これと同様に, TdDDO 遺伝子発現で観察された *E. coli* の生育停止も PG 構成要素である D-Glu の枯渇が原因と考えられた. しかし, LB 培地に D-Glu を 5 mM 添加しても TdDDO 遺伝子を導入した *E. coli* の生育停止を抑制できなかった (データ無し). このことから, D-Glu の枯渇以外の因子, 恐らく反応による H_2O_2 の発生も生育停止に寄与している可能性が考えられる. 一方, 他の DDO 遺伝子発現において, *E. coli* の生育停止は報告されていない. これは TdDDO よりも D-Glu に対する活性が低いためであると考えられる. また, TdDDO と同等の代謝能を有する DAAO の *E. coli* 発現においても生育停止は報告されていないことから, D-Glu の分解の方が D-Ala 分解より *E. coli* の生育に厳しいかもしれない. また, TdDAAO の発現においても他の DAAO と同様に *E. coli* の生育停止は観察されなかったが, これは D-Ala が TdDAAO の貧基質であることも要因の一つと考えられる.

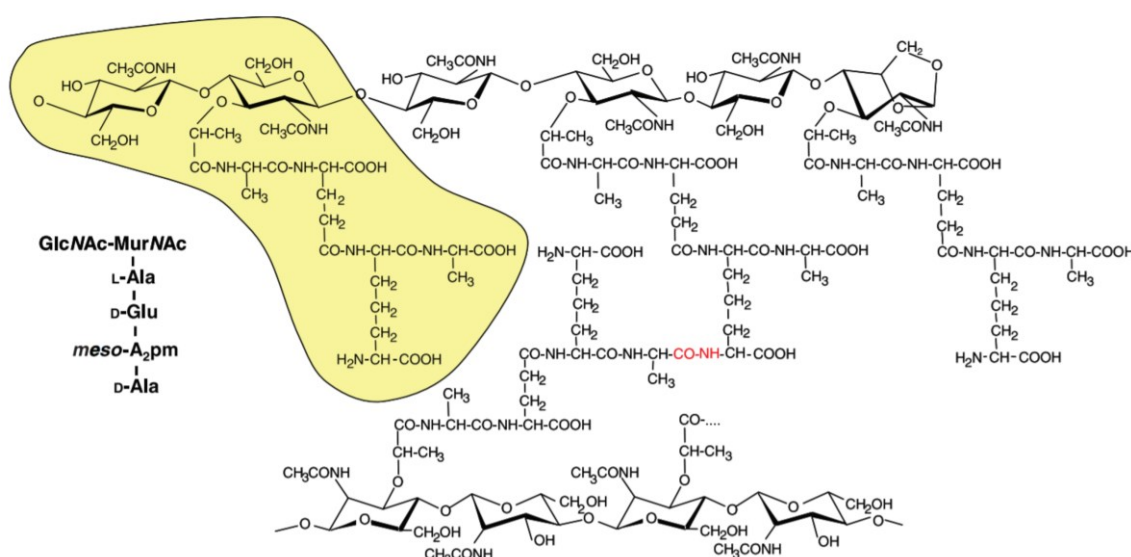


Fig. 1-15. *E. coli* 細胞壁 PG の構造

略語: GlcNAc, N-acetylglucosamine; MurNAc, N-acetylmuramic acid; A₂pm, 2,6-diaminopimelic acid. Vollmer らの論文(164)の Fig. 1 を引用した.

TdDDO の酵素学的特性

基質特異性と酵素反応速度論

DDO の結晶構造やモデル構造と部位特異的な変異導入実験や基質ドッキングシミュレーション解析などから、ChDDO の His56 や Arg243 残基, mDDO と hDDO の Arg216 や Arg237 残基が基質 D-Asp 側鎖のカルボキシ基と相互作用することで酸性 D-アミノ酸に対する基質特異性が付与されると考えられている (Fig. 1-16bc) (53, 60, 88). TdDDO モデル構造において, His70, Arg242 および Lys263 残基が ChDDO の His56 や Arg243 残基, hDDO と mDDO の Arg216 と Arg237 残基に空間的に対応する位置に観察されたことから (Fig. 1-16abc), TdDDO におけるこれらアミノ酸残基が酸性 D-アミノ酸に対する基質特異性に寄与すると考えられた. しかし, TdDDO は, ChDDO や mDDO とは異なり, D-Asp よりも D-Glu に対して高い比活性と $k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ を示した (Fig. 1-6b と Table 1-2). TdDDO と同様に, 真菌 *C. boidinii* 由来 DDO (CbDDO) と線虫 *C. elegans* の 3 種類の DDO (CeDDO-1, 2 および 3) も D-Asp より D-Glu に対して高い $k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ を示すが, その構造的要因と生理的な理由は明らかにされていない(53, 60). TdDDO は, D-Glu の側鎖がアミド化された D-Gln に対して, より構造が小さい D-Asp 側鎖のアミド体である D-Asn よりも高い活性を示すこと (Fig. 1-6b と Table 1-2), また DDO 競合的阻害剤による阻害において malonate よりも構造的により大きな D-malate でより強く阻害されたことから (Table 1-3), 基質が結合する空隙が D-Asp よりも D-Glu の結合により適した大きさである可能性が考えられる (Fig. 1-6b). しかし, TdDDO の基質特異性に関して構造的観点からより詳細に明らかにするためには, 結晶構造の決定や部位特異的な変異導入による解析が必要である.

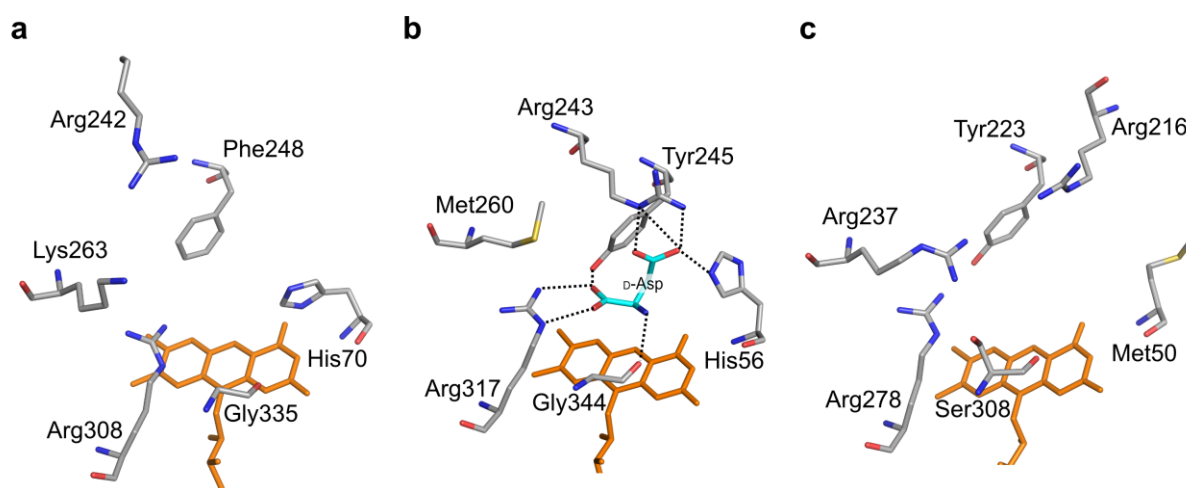


Fig. 1-16. TdDDO と既知 DDO の基質結合部位の比較

(a) TdDDO モデル構造, (b) ChDDO 結晶構造および (c) hDDO 結晶構造 (PDB entry: 6RKf) の活性部位. 原子の配色: 炭素原子, 灰 (アミノ酸残基) とシアン (基質 D-Asp); 窒素原子, 青; 酸素原子, 赤; 硫黄原子, 黄. 補酵素 FAD は橙で示した. 点線は水素結合を示す. PyMOL ver 2.4 を用いて作図した.

pH 特性と温度特性, 耐熱性

TdDDO の至適 pH は 8.0 であった (Fig. 1-10a). 真菌由来 CbDDO や ChDDO の至適 pH は 7.0–7.5 であるため, TdDDO は他の真菌 DDO と同様な至適 pH を有することが分かった(58, 60). また, TdDDO は弱酸性 (pH 5.0) から弱塩基性 (pH 10.0) 領域の pH で安定であった (Fig. 1-10b). 真菌 *Trichoderma harzianum* DDO (ThDDO) は pH 6.0–9.0 で安定であり, TdDDO は他の真菌 DDO よりも幾分広い pH 安定性を有したことから, pH 安定性の観点において TdDDO は他の真菌 DDO よりも応用的利用において有用と考えられた.

TdDDO の T_{opt} (至適温度) は 60°C であった (Fig. 1-11a). これは *T. dupontii* の生育至適温度 (45–50°C) よりも高く, 生育上限温度である 60°C と一致した(143). また, TdDDO の T_{opt} は, 常温性真菌由来の CbDDO, ThDDO および ChDDO よりも 20°C 以上高く, 好熱性細菌由来の RxDAAO と同等であった(57, 60, 165). TdDDO のタンパク質濃度が 0.1 mg/ml の時の T_{50}^{60} (初期活性の 50% が失われる 60 min の保温温度) は約 51°C であった (Fig. 1-11b). この T_{50}^{60} の値は, より高いタンパク質濃度 (0.35 mg/ml) かつより短い保温時間 (10 min) で算出された ChDDO の T_{50}^{10} より 5°C 高かったことから, TdDDO は他の DDO よりも高い耐熱性を有していることが示され, 温度安定性の観点においても他の真菌 DDO よりも応用的利用に有用と考えられた(58, 165).

これまでに DDO の耐熱性に寄与する因子は報告されていないが, DAAO においてオリゴマー化と補酵素 FAD 結合が耐熱性に寄与することが報告されている(125, 126). 本研究において, TdDDO は単量体であり (Fig. 1-9), アボ化できなかったことから, TdDDO の高い耐熱性には, タンパク質構造の高い剛性や FAD との強固な結合が寄与する可能性が考えられた. しかし, TdDDO では過剰量の FAD 添加による失活抑制効果は観察されなかった (Fig. 1-11c). 常温性真菌由来の TvDAAO では, 過剰量の FAD 添加による変性抑制効果が観察され, 2 つの独立した不可逆的な熱変性経路が提案されている(166). 一つは, FAD を保持したまま変性する経路で (Native enzyme → Denatured enzyme, Fig. 1-17a), 他方は FAD を放出したのち凝集し不活性化する経路である (Native enzyme ↔ Apo enzyme + FAD → aggregation, Fig. 1-17b). 後者の変性経路では, FAD の再結合により Native enzyme に戻ることができるため, 過剰量の FAD の存在は熱安定化に寄与すると考えられる. したがって, TdDDO の高い耐熱性には, FAD との結合よりも, 主にタンパク質構造そのものの高い剛性が寄与すると考えられ, アボ化が困難な理由もタンパク質構造の高い剛性によると考えられる. 一般的に, 高い耐熱性を有する酵素は疎水性相互作用, ジスルフィド結合, 水素結合や塩橋といったサブユニット内またはサブユニット間相互作用が常温性生物由来の酵素よりも多いことで構造剛性を高めていることが知られている(116, 119, 167). 古細菌 *Methanococcus* 属内の好熱性種と常温性種の比較研究により, 好熱性種由来のタンパク質には塩橋の形成に必要な荷電を有する極性アミノ酸残基 (Arg, Lys, Glu および Asp) と疎水性相互作用の形成に必要な疎水性アミノ酸残基がより多く含まれているが, 高温において脱アミド化を受けやすい Asn と Gln

や脱アミド化を促進する Ser と Thr はより少ないことが報告されている(168). TdDDO の総アミノ酸残基に対する Asp, Glu, Lys および Arg 残基の合算数の割合を調べたところ, その割合は約 30% であり, 常温性真菌由来の DDO と DAAO や好熱性細菌由来の RxDAAO のものよりも顕著に高かった (Table 1-5). このことから, TdDDO では他の DDO と DAAO よりも塩橋が多く形成されており, これによりタンパク質構造の剛性が高まっている可能性が考えられた. また, TdDDO における Asn, Gln, Thr および Ser 残基の合算数の割合は約 15% であり, RxDAAO よりは高いが, 常温性 DDO や DAAO と同等もしくは低かった. したがって, TdDDO はより高い温度における Gln または Asn 残基の脱アミドが生じにくい DDO であることが示唆された. 一方, TdDDO の疎水性アミノ酸残基については, Met, Phe および Ile 残基の割合が常温性 DDO と DAAO よりも高い傾向にあったが, 他の疎水性アミノ酸残基の割合は同等かもしくは低い傾向にあった.

今後, より詳細な考察のためには, 結晶構造解析により TdDDO の立体構造を解き, 種々の相互作用の解析が必要である.

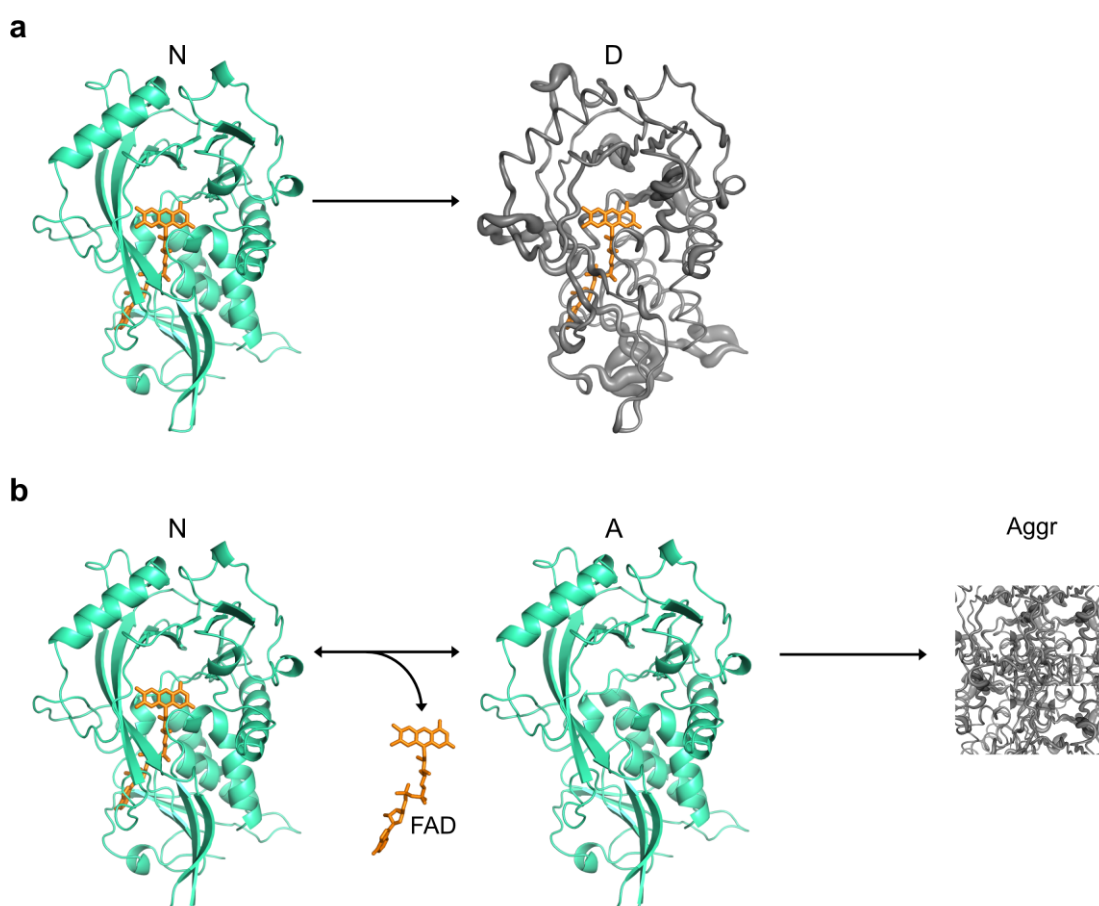


Fig. 1-17. DAAO における変性経路

(a) FAD を保持したまま変性する経路. “N”と“D”はそれぞれ天然状態と (部分) 変性状態の DAAO を示す. (b) FAD を放出したのち凝集し不活性化する経路. “N”, “A”および“Aggr”はそれぞれ天然, アポおよび凝集状態の DAAO を示す. Dib らの論文(166)の Scheme 1 に基づき作図した.

Table 1-5. 各 DDO と DAAO のアミノ酸残基の割合の比較

Amino acid residues	TdDDO	ChDDO	RgDAAO	pkDAAO	RxDAAO
/ Total amino acid residues (%)					
RKDE					
Arg	11.6	8.1	7.1	6.1	12.7
Lys	3.0	0.8	4.6	3.5	0.3
Asp	6.2	5.9	5.2	3.7	3.1
Glu	8.9	3.5	5.7	6.3	9.6
Total	29.7	18.3	22.6	19.6	25.7
NQST					
Asn	2.2	1.4	1.6	5.5	1.5
Gln	3.8	2.4	3.8	4.0	0.6
Ser	4.3	4.1	7.6	3.7	4.0
Thr	4.6	6.5	6.0	6.3	4.6
Total	14.9	14.4	19.0	19.5	10.7
Others					
Gly	8.6	10.5	9.5	9.2	12.0
Ala	7.0	14.9	9.5	4.9	11.4
Val	5.1	8.4	7.3	7.5	9.6
Leu	8.1	9.2	9.0	10.4	9.6
Ile	5.9	3.5	4.3	5.8	1.5
Phe	3.5	2.2	2.2	4.3	2.2
Tyr	2.7	2.7	3.0	4.0	3.1
Trp	2.2	2.7	2.2	2.9	1.9
Pro	6.5	6.5	6.2	6.3	7.4
Cys	1.4	1.6	1.6	1.4	2.8
Met	2.4	2.2	1.1	1.4	0.9
His	1.9	3.0	2.4	2.6	1.2

ExPASy server 内の ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) を用いて、DDO と DAAO における総アミノ酸残基に対する各アミノ酸残基の割合を算出した。

TdDDO Phe248Tyr バリエント

一般的に、DDO と DAAO の活性部位には保存された Tyr 残基が存在し、このヒドロキシ基が基質 D-アミノ酸の α -カルボキシ基と水素結合を形成することで基質結合に関与している (Fig. 1-17: ChDDO, Tyr245; hDDO, Tyr223)。一方、TdDDO では Tyr 残基に対応する位置には Phe 残基 (Phe248) が存在した (Fig. 1-16, Fig. 1-18)。しかし、TdDDO の酸性 D-アミノ酸に対する速度論パラメーターは他の DDO のものと同等か優れていた (53, 60, 169) (Table 1-6)。RgDAAO において、この Tyr223 残基を Phe 残基および Ser 残基に置換したバリエントが作成され、Tyr223 の触媒能における機能が解析されている (84)。Tyr223 残基の Phe 残基への置換は D-Ala に対する k_{cat} と K_m に影響を与えなかったが、Ser 残基への置換は k_{cat} を減少させ K_m を増加させたことから、Tyr223 残基のヒドロキシ基ではなく芳香環と基質との相互作用が触媒能に重要と考えられている (84)。したがって、TdDDO における Phe 残基の存在は速度論パラメーターに大きな影響を与えなかったと考えられた。しかし、pkDAAO の Tyr228 残基の Phe 残基への置換は D-Ala に対する k_{cat} を低下させ、 K_m を増加させたことから、酵素や基質の違いで Tyr 残基のヒドロキシ基の触媒能における重要性は異なるかもしれない (170)。実際、TdDDO の Phe248 残基の Tyr 残基への置換は解析した全ての D-アミノ酸に対する k_{cat} や K_m を大きく低下させたことから、その触媒能における重要性が示唆される (Table 1-4)。TdDDO ではヒドロキシ基を有さない Phe248 残基を配置することで、あえて基質に対する親和性を低下させることで k_{cat} を高めていると考えられる。本研究で作成された TdDDO F248Y バリエントの酸性 D-アミノ酸に対する K_m 値は、他の DDO の値よりも、一桁小さい値であることから (Table 1-6)、検出感度の点において酸性 D-アミノ酸の検出・定量に有用と考えられる。

Table 1-6. TdDDO と他の DDO との酵素反応速度論的パラメーター

DDOs	k_{cat} (s^{-1})		K_{m} (mM)		$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)	
	D-Glu	D-Asp	D-Glu	D-Asp	D-Glu	D-Asp
TdDDO	217	123	2.16	8.77	100,000	14,000
TdDDO F248Y	58.1	50.9	0.713	0.869	81,500	58,600
ChDDO ^a	2.00	82.6	62.6	2.92	25.0	28,300
CbDDO ^b	60.0	19.2	20.1	12.9	2,980	1,490
hDDO ^c	5.54	70.6	40.0	2.14	139	33,000
mDDO ^d	-	7.37	-	9.83	-	1,350
CeDDO-1 ^c	35.4	26.1	1.06	5.54	33,400	4,710

(-)はデータ未報告を示す。 ^aは Takahashi らのデータ(58), ^bは Fukunaga らのデータ(60), ^cは Katane らのデータ(53) および ^dは Katane らのデータ(156)を用いた。

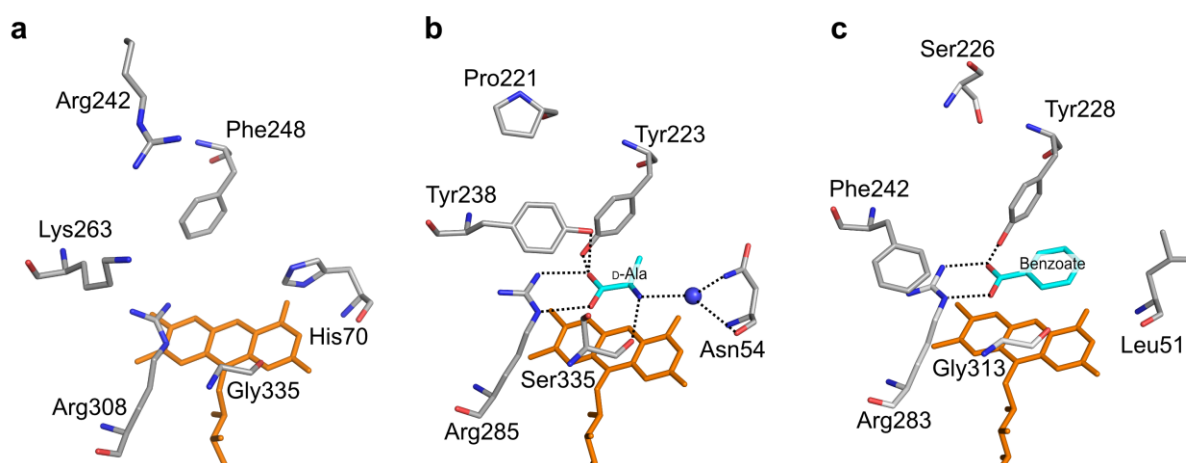


Fig. 1-18. DDO と DAAO 結晶構造の活性部位

(a) TdDDO モデル構造, (b) RgDAAO 結晶構造 (PDB entry: 1C0P) および(c) pkDAAO 構造 (PDB entry: 1VE9) の活性部位. 原子の配色: 炭素原子, 灰 (アミノ酸残基) とシアン (基質 D-Ala と benzoate); 窒素原子, 青; 酸素原子, 赤; 硫黄原子, 黄. 補酵素 FAD は橙で示した. 青の小球は水分子を示す. 点線は水素結合を示す. PyMOL ver 2.4 (<https://pymol.org/2/>) を用いて作図した.

4. 材料と方法

材料

試薬は特記しない場合、Nacalai tesque, Merk, Takarabio, Toyobo または Fujifilm Wako から購入した。D-Ile と D-Tyr はペプチド研究所から購入し、D-Asp は田辺製薬から寄贈されたものを用いた。オリゴヌクレオチドは、Eurofins Genomics から購入した。

好熱性真菌 *T. dupontii* NRRL2115 株における *DAAO* と *DDO* ホモログ遺伝子の探索

RgDAAO または ChDDO のアミノ酸配列を用いて、真菌ゲノムデータベース Fungal Genomes (http://fungalignomics.ca/wiki/Fungal_Genomes) における好熱性真菌 *Thermomyces dupontii* NRRL2155 株のゲノム配列に対して BLAST を用い、有意なアミノ酸配列同一性を有する *DAAO* と *DDO* ホモログ遺伝子を探索した。

供試菌、プラスミドおよび培地

Thermomyces dupontii NRRL2155 株は（独）製品評価技術基盤機構（NITE）から入手し、malt extract agar（MEA）培地（2.0% malt extract, 2.0% glucose, 0.1% peptone, 2.0% agar; pH 6.0）を用いて 37°C で生育させた。DNA 組換えの宿主として *E. coli* DH5α を、遺伝子発現の宿主として、*E. coli* BL21(DE3) pLysS を用いた。*E. coli* の培養には、LB（lysogeny broth）液体培地（5 g/l yeast extract, 10 g/l tryptone, 5 g/l NaCl, pH 7.0）と TB（terrific broth）液体培地（24 g/l yeast extract, 12 g/l tryptone, 4 ml/l glycerol, 12.54 g/l K₂HPO₄, 2.31 g/l KH₂PO₄, pH 7.2）を用いた。LB 寒天培地には精製寒天粉末を終濃度 15 g/l となるように添加した。抗生物質を添加する場合、終濃度が 100 µg/ml となるように ampicillin を添加し培地名に“A”を付記し、また、終濃度が 34 µg/ml となるように chloramphenicol を添加し培地名に“C”を付記した。培地に glucose を添加する場合、終濃度が 1%（w/v）となるように添加し培地名に“G”を付記した。

T. dupontii NRRL2155 株のゲノム調製

T. dupontii NRRL2155 株のゲノムは主に Yu JH らの方法(171)に従い調製した。菌体を 500 µl の breaking buffer（2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0）、500 µl の phenol: chloroform: isoamyl alcohol（25:24:1）および 300 µl の φ 0.5 mm glass beads を含むチューブに懸濁し、細胞破碎機 Mini-BeadBeater-8（Bio Spec Products）で 2 min 最高速度でホモジナイズした。ホモジナイズ溶液を遠心（16,000×g, 4°C, 10 min）した後、上清から DNA をエタノール沈殿により沈殿させた。沈殿した DNA を 10 µg/ml RNaseA を含む TE buffer（pH 8.0）に再溶解し、使用するまで -20°C で保存した。

TdDAAO 遺伝子発現ベクターの構築

pET15b に *E. coli* のコドン使用頻度を基にコドンを変更した *TdDAAO* 遺伝子が組み込まれた *TdDAAO* 遺伝子発現ベクター（pET15b-*TdDAAO*）は GenScript 社に委託して合成した。

TdDDO 遺伝子発現ベクターの構築

ゲノム DNA を鋳型として、*T. dupontii* NRRL 2155 株に見出された *DDO* ホモログ遺伝子 ORF（Talth1p4_002474）の 5' と 3' 末端配列にアニールするプライマー pTt2474F2（5'- CCCATATGCCACCTCGAATCATCATTCTCG-3'）と pTt2474R2（5'- CGGATCCTCATTTAAGATTCTCCGAGACTC-3'）を用い、*TaKaRa Ex Taq* DNA polymerase により

94°C で 2 min の後、94°C で 30 s・55°C で 30 s・72°C で 1 min を 1 サイクルとして 30 サイクルした後、最後に 72°C で 7 min 反応した。増幅産物を pGEM-T Easy ベクターに一度クローニングしたのち、NdeI/BamHI で消化して切り出し、pET15b の NdeI/BamHI サイトに挿入することで、*TdDDO* 遺伝子発現ベクター (pET15b-TdDDO) を作成した。

***TdDDO F248Y* 遺伝子発現ベクターの構築**

F248Y 遺伝子発現ベクターは Agilent 社の QuickChange 法 (<https://www.chem-agilent.com/contents.php?id=300131>) を参考にして構築した。具体的には、pET15b-TdDDO ベクターを鋳型とし、プライマー F248Yf (5'-CGGGACGGCAGCTGGATCTATCTGATCCCCGGCCGTTC-3') と F248Yr (5'-GAACGGCCGGGGGATCAGATAGATCCAGCTGCCGTCCCG-3')、KOD-Plus-を用いて、94°C で 2 min の後、98°C で 10 s・68°C で 7 min を 1 サイクルとして 10 サイクル反応した。反応液を DpnI で処理した後、*E. coli* DH5α を形質転換した。抽出したプラスミドの塩基配列を解析し、遺伝子発現ベクター (pET15b-TdDDOF248Y) とした。

***E. coli* の形質転換**

pET15b-TdDAAO, pET15b-TdDDO または pET15b-TdDDOF248Y を含む DNA 溶液 1 μl を 20 μl の *E. coli* BL21 (DE3)pLysS に添加して、氷上で 30 min 静置した。その後、42°C で 45 s 保温して、氷上で 2 min 静置した後、SOC 培地を 500 μl 添加して、37°C で 1 h 振盪培養し、LBACG 寒天培地に 50 μl 添塗り 37°C で一晚培養した。

LB 培地における *TdDAAO* と *TdDDO* 遺伝子発現条件の検討

pET15b-TdDAAO, pET15b-TdDDO または pET15b-TdDDOF248Y を導入した *E. coli* BL21 (DE3)pLysS を 10 ml の LBACG 液体培地で前培養 (30°C, 169 rpm, 16 h) した。次に、前培養液 50 μl を 10 ml の LBACG 液体培地を入れた試験管に接種し、振盪培養 (37°C, 200 rpm) した。OD₆₀₀ が 0.3 に達した時に isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 1 mM となるように培養液に添加し、5 h 培養した。培養液の OD₆₀₀ を 1 h ごとに分光光度計 UV-1800 (SHIMADSU) を用いて測定した。同様に、IPTG を添加せずに培養した *E. coli* の生育もモニタリングした。培養液を遠心 (4°C, 3,000×g, 15 min) して菌体を回収し、使用するまで -30°C で保存した。

TB 培地における *TdDDO* と *F248Y* 遺伝子発現条件の検討

LBACG 培地で前培養した培養液 500 μl を 100 ml の TBACG 液体培地に接種し、振盪培養 (37°C, 200 rpm) した。OD₆₀₀ が 3 に達した時に IPTG を終濃度 1 mM となるように培養液に添加し、5 h 培養した。培養液の OD₆₀₀ を 1 h ごとに UV-1800 を用いて測定した。培養液を遠心 (4°C, 3,000×g, 15 min) して菌体を回収し、使用するまで -30°C で保存した。

***E. coli* 粗抽出液の調製**

保存していた菌体を 5 倍量の 20 ml の平衡化 buffer (50 mM KH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 7.0 または 8.0) で懸濁した後、ソニケーター Ultrasonic Disruptor Ud-201 (Tomy) を用いて超音波破碎 (output 3, duty cycle 50: 破碎 30 s, 氷上 30 s, 15 サイクル) した。破碎後、遠心 (4°C, 20,000×g, 20 min) して得られた上清を Minisart Single use filter φ 0.2 μm (Sartorius) を用いてフィルター過し、粗抽出液とした。

金属アフィニティークロマトグラフィーによる精製

粗抽出液に 10 mM となるように imidazole を添加し、平衡化 buffer で平衡化した His TALON Superflow Cartridge (Clontech) に全量供した。その後、洗浄 buffer (30 mM imidazole, 50 mM KH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 7.0 または 8.0) 25 ml でカラムを洗浄し、溶出 buffer (150 mM imidazole, 50 mM KH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 7.0 または 8.0) 10 ml でカラムに結合したタンパク質を溶出した。

Imidazole 溶出画分の濃縮

溶出画分を遠心式ろ過ユニット Amicon Ultra Centrifugal Filters Ultracel 10 K, Regenerated Cellulose 10,000 MWCO (Merk) により濃縮した。

濃縮 Imidazole 溶出画分の透析

濃縮した Imidazole 溶出画分を微量透析器 透くん (NIPPON Gnetetics) を用いて透析 buffer (50 mM KPi, 5% glycerol, pH 7.5 または 8.0) 400 ml に対して 3 h 透析した後、透析 buffer を交換し、再度 12 h 透析した。透析後のタンパク質溶液を遠心分離 (4°C, 20,000×g, 30 min) して変性タンパク質を除去し精製酵素とした。精製酵素は使用するまで -80°C で保存した。

タンパク質濃度測定

タンパク質濃度は、Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad) を用いて添付のプロトコルに従い Bradford 法により測定した。標準タンパク質と酵素試料の吸光度を 2 点ずつ、マイクロプレートリーダー SpectraMax Paradigm (Molecular Devices) を用いて測定し、検量線は 0–1 mg/ml BSA を用いて作成した。

SDS-PAGE 解析

SDS-PAGE 解析は、ラビタス・ミニスラブ電気泳動装置 (Atto), 12% polyacrylamide gel を用いて、Laemmli 法により行った。タンパク質マーカーとして、Thermo, Unstained Protein Molecular Weight Marker と Fluorescent Protein Molecular Weight Marker for SDS-PAGE (EZBiolab) を用いた。泳動後のタンパク質は coomassie brilliant blue R-250 染色または LED トランスイルミネーター ゲルみえーる (Fujifilm Wako) を用いて可視化し、デジタルカメラ COOLPIX P7800 (Nikon) で撮影した。

o-Dianisidine–horseradish peroxidase (*o*-dianisidine/HRP) カップリング法

DAAO または DDO 反応によって生じる H₂O₂ を *o*-dianisidine と horseradish peroxidase (HRP) によるカップリング反応により検出することで活性を測定した。具体的には終濃度 20 mM D-アミノ酸, 20 μM FAD, 0.86 mM *o*-dianisidine, 10 U/ml HRP を含む 50mM KPi buffer (pH 7.5 または 8.0) を 37°C で 5 min 保温した後、*E. coli* 粗抽出液または精製酵素溶液を添加して反応を開始した。活性は反応により生成する酸化型 *o*-dianisidine を波長 436 nm ($\epsilon=8,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) で UV-1800 または SpectraMax Paradigm を用いて継続的にモニタリングすることで算出した。なお、コントロールとして、基質を含まない反応液も同様に調整し、基質を含む反応液で得られた活性値からコントロールの活性値を引いた値を活性値とした。1 min 当たりに 1 μmol の基質を代謝する酵素量を 1 U と定義した。また、反応系における補酵素添加の影響解析では、上記の反応系における 20 μM FAD の代わりに 20 μM フラビン

モノスクレオチド (FMN) もしくは蒸留水を用いた。

2, 4-Dinitrophenylhydrazine (2, 4-DNPH) 法

基質 20 mM d-Glu と 20 μ M FAD を含む 50 mM KPi buffer (pH 7.5) 950 μ l を各温度で 5 min 保温した後、50 μ l の酵素溶液を添加して各温度で 5 min 反応させ、400 μ l の 25% trichloroacetic acid を添加して反応を停止した。反応液を遠心 (3,500 rpm, 10 min) し、上清を 500 μ l 回収した後、0.1% 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) を含む 2 M HCl 溶液 100 μ l を添加し、37°C で 15 min 反応させた。反応後、3.75 M NaOH 溶液 400 μ l を添加し、室温で 15 min 静置した後、波長 430 nm における吸光度を SpectraMax Paradigm を用いて測定した。DDO 活性は、吸光度 430 nm における α -ketoglutarate のモル吸光係数 ($\epsilon=16,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を用いて算出した。1 min 当たりに 1 μ mol の D-Glu を代謝する酵素量を 1 U とした。

基質特異性解析

20 mM D-アミノ酸 (D-Tyr は 1.5 mM) と N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) を基質として用い、37°C で *o*-dianisidine/HRP カップリング法により DAAO または DDO 活性を測定し、相対活性を算出した。

酵素反応速度論的パラメーター解析

0.1–50 mM D-Glu, D-Asp, D-Gln および NMDA を基質として用い、60°C で *o*-dianisidine/HRP カップリング法により精製 TdDDO または TdDDO F248Y バリエントの活性を測定した。最大反応速度 (V_{\max}) とミカエリス定数 (K_m) の算出には、データ解析ソフトウェア Sigma Plot 12.5 (Hulink) の酵素反応速度分析モジュールを用い、ミカエリス-メンテンの式を基にした非線形回帰分析によるカーブフィッティングから算出した。分子活性 (k_{cat}) 値は、 V_{\max} 値と His タグ融合 TdDDO または TdDDO F248Y バリエントの分子量 44,497 または 44,513 から算出した。

四次構造解析

TdDDO の四次構造は AKTAprius plus (GE Healthcare) に接続したカラム Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより解析した。カラム洗浄には孔径 0.22 μ m の Vacuum Driven Disposable Filtration System (Millipore) により濾過し、脱気した milliQ 水を用いた。カラムの平衡化には同様に濾過・脱気した 150 mM NaCl と 5% glycerol を含む 50 mM KPi buffer (pH 8.0) を用いた。カラムを平衡化 (流速 0.2 ml/min, 4 h) した後、タンパク質濃度 0.5 mg/ml の TdDDO 溶液を流速 0.2 ml/min でカラムに供した。TdDDO の分子質量は、標準タンパク質 Aldolase (158 kDa), Albumin (67.0 kDa), Chymotrypsinogen A (25.0 kDa) および Ribonuclease A (13.7 kDa) (GE Healthcare) を用いて算出した。

三次元構造モデルの作製

TdDDO と mDDO の三次元構造モデルは I-TASSER On-line Server (zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) を用いて作製した。TdDDO F248Y バリエントの三次元構造モデルは、TdDDO モデルを鋳型として分子グラフィックツール PyMOL ver. 2.4 (<https://pymol.org/2/>) の Mutagenesis ツールにより作製した。

スペクトル解析

20 μ M TdDDO 溶液 (0.89 mg/ml) の波長 250-600 nm における吸収スペクトルを、ブラック石英セルと UV-1800 を用いて測定した。還元型 FAD を有する TdDDO の吸収スペクトルは、同様の 20 μ M TdDDO 溶液に D-Glu を終濃度 50 mM になるように添加し、40°C で 10 min 保温した後に、同様の波長範囲で測定した。なお、コントロールには 50 mM KPi buffer (pH 7.5) を用いた。

薄層クロマトグラフィー (TLC) 解析

300 μ M TdDDO 溶液 (13.5 mg/ml) をサーマルサイクラー PTC-100 (MJ-Research) を用いて遮光しながら 100°C で 10 min 保温した。保温後、遠心 (20,000 \times g, 4°C, 30 min) し、補酵素を含む上清を回収した。5% glycerol を含む 50 mM KPi buffer (pH 7.5) を用いて、回収した上清を 3 倍希釈した。希釈した上清 1 μ l をシリカゲル薄層プレート TLC employing a silica gel 60 F-254 plate, 2 mm thickness (Merck) に滴下し、クロロホルム/酢酸/蒸留水の 6:7:1 混合液を展開溶媒として展開した。薄層プレート上のフラビンは、Handy UV Lamp LUV-4 (AS-ONE) を用いて UV 照射 (365 nm) し、CCD カメラ (UVP, BioDoc-It imaging system) で撮影することで検出した。標準フラビンには 5% glycerol を含む 50 mM KPi buffer (pH 7.5) に溶解させた 1 μ l の 100 μ M FMN と FAD を用いた。

FAD 含有量解析

TLC と同様に熱変性させ回収した TdDDO 上清の 450 nm における吸光度を、超微量分光光度計 NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific) を用いて測定した。標準 FAD として、5% glycerol を含む 50 mM KPi buffer (pH 7.5) を用いて調製した 0.05–0.2 mM FAD 溶液を用いた。

アポ化

TdDDO のアポ化は Casalin らの方法⁽¹⁷²⁾に従い透析法により検討した。15.0 mg/ml TdDDO 溶液 10 μ l をアポ化 buffer (2 M KBr, 250 mM KPi, 0.3 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, pH 7.5) に対して遮光しながら透くんを用いて 4°C で 5 day 透析した。透析後、NanoDrop 1000 spectrophotometer を用い、波長 273 と 455 nm における吸光度 (A_{273} と A_{455}) を測定し、透析前後の A_{273}/A_{455} を比較した。

至適 pH 解析

20 mM D-Glu を基質として含む pH 6.0–10 の 25 mM GTA buffer を用い、37°C で 2, 4-DNPH 法により TdDDO の活性を測定し、相対活性を算出した。

pH 安定性解析

23.2 mg/ml TdDDO を pH 3.5–10.0 の 25 mM GTA buffer または pH 10.0–11.0 の 25 mM CAPS buffer で 231 倍希釈し 0.1 mg/ml に調整した。調整した各 TdDDO 溶液を PTC-100 で遮光しながら 45°C で 1 h 保温した。保温後、20 mM D-Glu を基質として用い、60°C で *o*-dianisidine/HRP カップリング法により残存 DDO 活性を測定し、相対活性を算出した。

至適温度解析

20 mM D-Glu を基質として用い、30–75°C で 2, 4-DNPH 法により DDO 活性を測定し、相対活性を算出した。

耐熱性解析

0.1 mg/ml TdDDO 溶液を PTC-100 で遮光しながら 20–75°C で 1 h 保温した後, 20 mM D-Glu を基質として用い, 60°C で *o*-dianisidine/HRP カップリング法により残存 DDO 活性を測定し, 相対活性を算出した.

耐熱性に及ぼす FAD 添加の影響解析

15.0 mg/ml TdDDO を 50 mM KPi buffer (pH 7.5) を用いて 0.1–0.005 mg/ml に希釈した. 希釈した各 TdDDO 溶液を PTC-100 で遮光しながら 45°C で 1 h 保温した. 保温後, 各 TdDDO 溶液を 5% glycerol を含む 50 mM KPi buffer (pH 7.5) を用いて 0.005 mg/ml になるように希釈し, 20 mM D-Glu を基質として用い, 60°C で *o*-dianisidine/HRP カップリング法により残存 DDO 活性を測定し, 相対活性を算出した. また, 終濃度 0.1 mM FAD を添加して調製した 0.1–0.005 mg/ml の TdDDO 溶液も同様に保温して残存 DDO 活性を測定し, 相対活性を算出した.

DDO と DAAO 競合的阻害剤影響解析

10 mM もしくは 50 mM の DDO 競合的阻害剤(malonate, *meso*-tartrate, D-malate)と DAAO 競合的阻害剤(benzoate, anthranilate, crotonate) 存在下における DDO 活性を 20 mM の D-Glu を基質として用い, 37°C で 2,4-DNPH 法により測定し, 相対活性を算出した.

第 2 章 D-アミノ酸資化能を有する好熱性真菌の単離とその DAAO の酵素学的諸特性解析

1. 緒言

第 1 章では、応用的に有用な高活性かつ高安定性を有する DDO と高活性、高安定性かつ広基質特異性を有する DAAO を取得するため、好熱性真菌 *T. dupontii* NRRL 2155 株のゲノム配列に DDO と DAAO ホモログ遺伝子を見出した。*E. coli* で発現させた各遺伝子発現産物は、各々酸性 D-アミノ酸と中性及び塩基性 D-アミノ酸に対してオキシダーゼ活性を示したことから、それぞれ DDO (TdDDO) と DAAO (TdDAAO) をコードしていることが明らかとなった。しかし、TdDAAO の基質特異性は広基質特異性を有する真菌由来 RgDAAO や TvDAAO と比べて狭かったことから、目的とした広基質特異性を有する DAAO でなかった。一方、TdDDO は目的とした高い耐熱性を有しており、また D-Glu に対して高い触媒活性を有する DDO であった。

現在のところ、DAAO の広基質特異性に寄与する構造的知見はほとんどないため、DAAO の一次構造から広基質特異性であるか否かを判断することは非常に困難と考えられる。また、既知の広基質特異性 DAAO (RgDAAO と TvDAAO) が単離されている常温性真菌 *R. gracilis* や *T. variabilis* はそれぞれ *Basidiomycota* と *Ascomycota* 門に属することから、系統分類からも広基質特異性を有する DAAO が存在する可能性のある好熱性真菌を推定するのは難しいと考えられた。したがって、広基質特異性を有する DAAO をコードする遺伝子を好熱性真菌のゲノムデータベースから見出すことは非常に困難と考えられた。

そこで第 2 章では、広基質特異性 DAAO を有する可能性のある好熱性真菌を単離したのちに、単離した好熱性真菌から DAAO 遺伝子を単離することで、広基質特異性を有する好熱性真菌 DAAO の取得を目指した。

2. 結果

2.1. 好熱性真菌の単離と単離した好熱性真菌株の D-アミノ酸資化能の解析

序論で述べた通り、多くの好熱性真菌が発酵堆肥から単離されているため、単離源として 6 種類の多様な市販の発酵堆肥（バーク発酵堆肥 2 種：バーク A と B，牛糞発酵堆肥 2 種：牛糞 A と B，鶏糞発酵堆肥 1 種，馬糞発酵堆肥 1 種）を入手した。これら発酵堆肥にどの程度の好熱性真菌が存在するか不明であったため、はじめに真菌の一般的な検出培地である PDA 培地を用いて好熱性真菌の存在を確認した。好熱性細菌の生育を抑制するために抗生物質を添加した PDA 培地に、各種市販堆肥の懸濁液を塗布し、60°C で 2 週間培養した。その結果、堆肥懸濁液を塗布した全ての PDA 培地において好熱性真菌の生育は観察されなかった。そこで、培養温度を 50°C に変更し、再度培養したところ、バーク A、牛糞 A と B の懸濁液を塗布した培地においてそれぞれ 1 株の好熱性真菌の生育が観察された。このことから、用いた市販の発酵堆肥には 60°C で生育可能な好熱性真菌は存在しないが、50°C で生育可能な好熱性真菌が少数存在することが示唆された。生育した 3 株をそれぞれ YA 株、PB 株および PE 株と名付けた。

次に、単離した YA 株、PB 株および PE 株を、多くの DAAO の良基質である D-Ala、そして広基質特異性である RgDAAO と TvDAAO の良基質であり、他の DAAO では貧基質である D-Asn、D-Gln および D-His 各々を単一窒素源とした最少培地で 50°C、1 週間培養し、生育を観察した (Fig. 2-1)。観察の結果、D-Asn における生育は幾分悪いものの、3 株とも D-アミノ酸を単一窒素源とした培地において D-Ala と同等に生育した (Fig. 2-1)。なかでも、YA 株は広基質特異性 DAAO が良基質とする D-Asn、D-Gln および D-His において他の株よりも良好に生育したことから、YA 株の DAAO は RgDAAO や TvDAAO と同じく、広基質特異性である可能性が最も高いと考えられた。

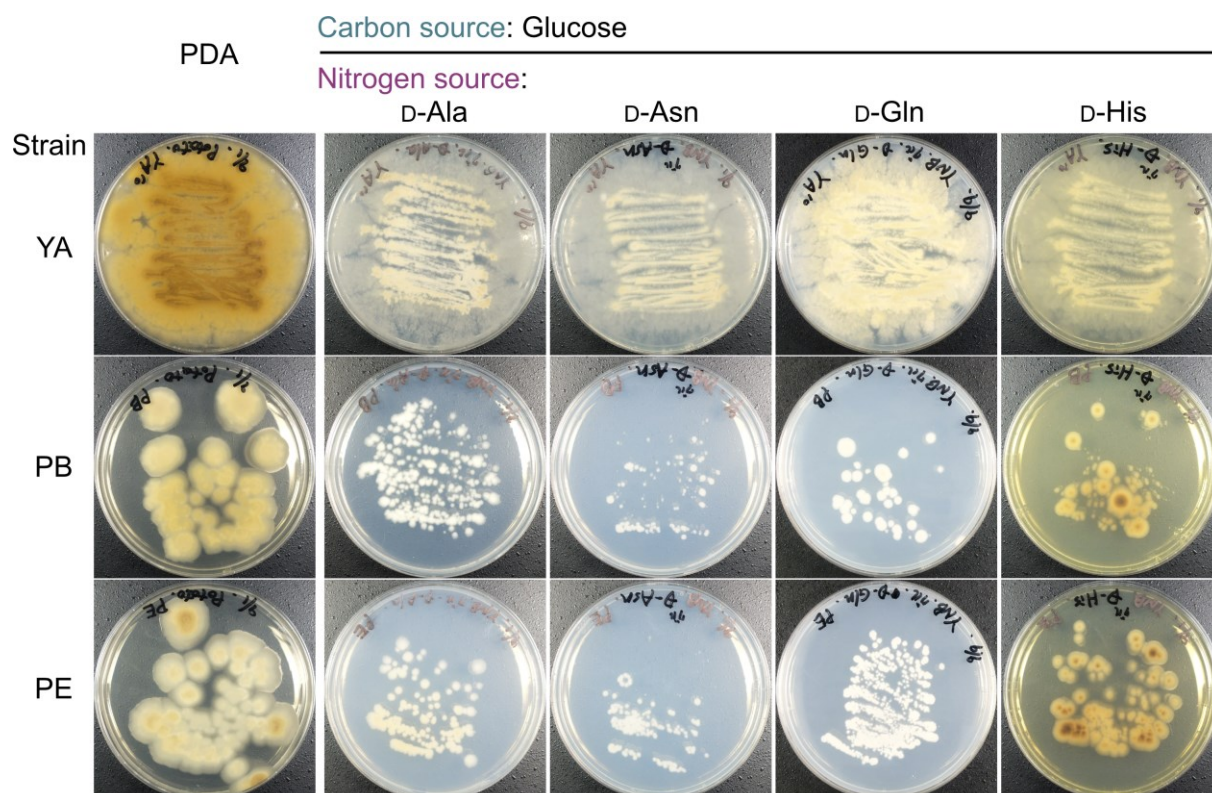


Fig. 2-1. 単離した好熱性真菌3株のD-アミノ酸資化能

PDA培地上で1週間培養した3株を、500 µg/ml クロラムフェニコールと50 µg/ml ゲンタマイシン、1.5% (w/v) グルコースを単一炭素源、各50 mM D-アミノ酸を単一窒素源として含む最少培地において、50°Cで1週間培養した。

2.2. 単離した好熱性真菌 YA 株の同定

2.2.1. ITS 領域の単離

分子系統解析により YA 株を同定するために、YA 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR により Internal transcribed spacer (ITS) 領域の増幅を試みた。ITS 領域は 18S, 5.8S と 28S リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) の間にある領域 (ITS1 と ITS2) である (Fig. 2-2a)。YA 株, PB 株および PE 株のゲノム DNA を鋳型にした PCR の結果、それぞれ約 600 bp の ITS 領域配列と考えられる増幅産物が得られた (Fig. 2-2b)。塩基配列解析の結果、プライマー配列を除いた YA 株の ITS 領域配列の全長は 577 bp であり、ITS1/ITS4 プライマーセットを用いた PCR から得られる真菌 ITS 領域の一般的な長さ 420-825 bp と同等だった⁽¹⁷³⁾。また、PB 株と PE 株のプライマー配列を除いた ITS 領域配列の全長はともに 591 bp であり、これらの塩基配列は同一だった。したがって、PB 株と PE 株は同種の真菌であると判断した。

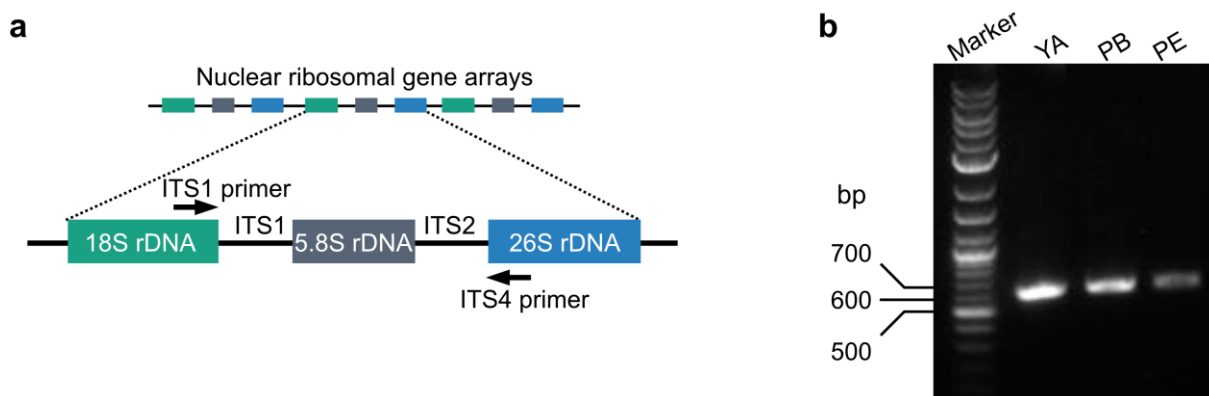


Fig. 2-2. D-アミノ酸資化性好熱性真菌 YA 株の ITS 領域の PCR 増幅

(a) 真菌 ITS 領域とプライマー結合部位. (b) 電気泳動解析. 左から順に、DNA マーカーと PCR 増幅産物を示す.

2.2.2. 分子系統解析

YA 株, PB 株および PE 株の ITS 領域配列を用いて NCBI の塩基配列データベースにおいて BLAST によるホモロジー探索を行った. その結果, YA 株の ITS 領域配列は *Ascomycota* 門-*Eurotiomycetes* 綱-*Eurotiales* 目-*Trichocomaceae* 科に分類される好熱性真菌 *Rasamsonia emersonii* の基準株である CBS 393.64 株と CBS 396.64 株の ITS 領域配列に対してそれぞれ 99.7%と 100%の塩基配列同一性を有することが分かった. また, PB 株と PE 株の ITS 領域配列は *R. emersonii* と同様に *Trichocomaceae* 科に分類される好熱性真菌 *Thermomyces dupontii* の基準株である NRRL 2155 株に対して 99.7%の塩基配列同一性を有していた. 真菌において, ITS 領域は種の判別に最も適した正式な DNA バーコーディング領域とされており, ITS 領域の塩基配列同一性と, 同定の絶対的基準である染色体 DNA-DNA ハイブリダイゼーションに基づく DNA 相同性を比較すると, 同一種内の変種以上の関係では ITS 領域の塩基配列同一性は約 99%以上であり, 別種では 99%未満であることが報告されている(174, 175). したがって, YA 株は *R. emersonii* と同種であり, PB 株と PE 株は *T. dupontii* と同種と判断した. *R. emersonii* YA 株と *T. dupontii* PB 株/PE 株の系統関係を明らかにするため, *Eurotiales* 目の *Trichocomaceae* 科または他の科に属するいくつかの真菌基準株の ITS 領域配列を用いて系統樹を作製した (Fig. 2-3). その結果, *R. emersonii* と *T. dupontii* は比較的近縁な種であることが分かった. *T. dupontii* PB 株/PE 株が有する DAAO の基質特異性は, 第 1 章において狭い基質特異性を有していた TdDAAO とほぼ同じであると考えられることから, PB 株と PE 株における DAAO の解析は検討しないことにした.

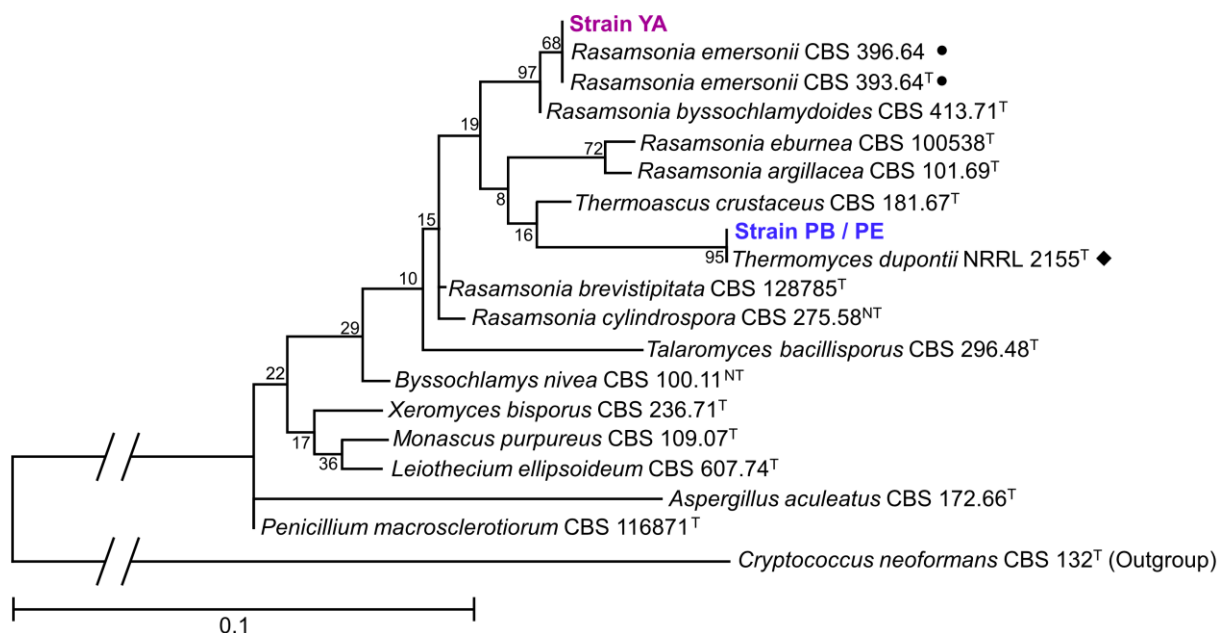


Fig. 2-3. ITS 配列による YA 株, PB 株および PE 株の分子系統解析

系統樹は MEGA 7.0 の maximum likelihood 法を用いて, bootstrap 試行 1,000 回によって構築した. 枝の数字は bootstrap 値 (%), スケールバーの長さは 10%の相違塩基を表す. 株名に付記された上付き文字の“T”と“NT”はそれぞれ type strain と neotype strain を示す. (●)または(◆)はそれぞれ YA 株または PB 株と PE 株に 99%以上の配列同一性を示す真菌株を表す. 解析に用いた ITS 領域配列の NCBI accession no.を以下に示す: *R. emersonii* CBS 396.64, JF417479; *R. emersonii* CBS 393.64, JF417478; *R. byssochlamydoides* CBS 413.71, JF417476; *R. eburnea* CBS 100538, JF417483; *R. argillacea* CBS 101.69, JF417491; *T. dupontii* NRR 2155, JF412001; *T. crustaceus*, JF412002; *T. bacillisporus* CBS 296.48, JN899329; *R. cylindrospora* CBS 275.58, JF417470; *R. brevistipitata* CBS 128785, JF417488; *R. brevistipitata* CBS 128785, JF417488; *B. nivea* CBS 100.11, FJ389934; *M. purpureus* CBS 109.07, KY635851; *X. bisporus* CBS 236.71, KY635854; *L. ellipsoideum* CBS 607.74, KF732839; *A. aculeatus* CBS 172.66, FJ629320; *P. macrosclerotiorum* CBS 116871, KJ834511; *C. neoformans* CBS 132, AF444326.

2.3. *R. emersonii* YA 株からの *DAAO* ホモログ遺伝子の単離

2.3.1. *R. emersonii* CBS 393.64 基準株における *DAAO* ホモログ遺伝子の探索

R. emersonii と同定された YA 株の *DAAO* ホモログ遺伝子の塩基配列は、ゲノム配列が明らかにされている *R. emersonii* 基準株である CBS 393.64 株の *DAAO* ホモログ遺伝子の塩基配列に似ている可能性が高いと考えた。そこで、まず CBS 393.64 株のゲノム配列に対して RgDAAO と TvDAAO のアミノ酸配列に高い同一性を有するタンパク質をコードする遺伝子を探索した。その結果、RgDAAO と TvDAAO に対して有意なアミノ酸配列同一性を有するタンパク質をコードする遺伝子が2つ (T310_5354 と T310_4950) 見出された (Fig. 2-4)。ゲノム DNA 上の T310_5354 は5つのイントロンで分断された構造をしており、イントロンを含む全長は 1,442 bp であった。遺伝子領域の全長は 1,107 bp であり 368 アミノ酸からなるタンパク質 (KKA20625) をコードしていた。KKA20625 は RgDAAO, TvDAAO, TdDAAO, ChDDO および TdDDO にそれぞれ 30.2, 40.7, 77.0, 30.0 および 29.0% のアミノ酸配列同一性を有していた (Table 2-1)。一方、T310_4950 は2つのイントロンで分断されており、イントロンを含む全長は 1,214 bp であった (Fig. 2-4)。遺伝子領域の全長は 1,007 bp であり 358 アミノ酸からなるタンパク質 (KKA21004) をコードしていた。KKA21004 は RgDAAO, TvDAAO, TdDAAO, ChDDO および TdDDO にそれぞれ 33.0, 32.0, 31.0, 28.0 および 47.0% のアミノ酸配列同一性を有していた (Table 2-1)。また、KKA20625 と KKA21004 のアミノ酸配列同一性は 31.0% であった。

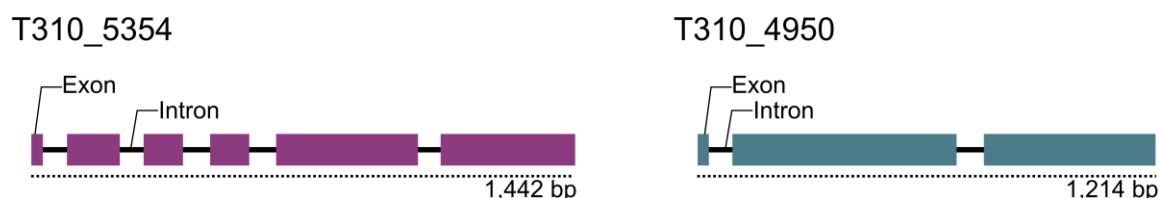


Fig. 2-4. *R. emersonii* CBS 393.64 基準株のゲノム配列に見出された推定 *DAAO* と *DDO* ホモログ遺伝子

真菌ゲノムデータベース Ensembl Fungi (<https://fungi.ensembl.org/index.html>) における *R. emersonii* CBS393.64 株に見出された推定 *DAAO* と *DDO* ホモログ遺伝子のエキソン-イントロン構造。

Table 2-1. *R. emersonii* CBS 393.64 株の推定 DAAO (KKA20625) と DDO (KKA21004)

Gene ID	T310_5354	T310_4950
Protein ID	KKA20625	KKA21004
Number of amino acid residues	368	358
Amino acid identity ^a (%)		
vs RgDAAO	30.2	33.0
vs TvDAAO	40.7	32.0
vs TdDAAO	77.0	31.0
vs ChDDO	30.0	28.0
vs TdDDO	29.0	47.0

^a アミノ酸配列同一性 (%) は Needleman-Wunsch アルゴリズムによるグローバルアライメントによって決定した。アライメントに用いた配列の UniProtKB accession no. を以下に示す: RgDAAO, P80324; DAAO, Q99042; DDO, Q75WF1; DDO, A3KCL7.

見出された KKA20625 と KKA21004 が DAAO または DDO であるか推定するために、既知の DAAO および DDO のアミノ酸配列とアライメントした (Fig. 2-5)。その結果、KKA20625 と KKA21004 の N 末端領域に、他の DAAO や DDO と同様に、FAD 結合に関わる Wierenga ADP 結合配列 (GxGxxG : x は任意のアミノ酸残基(79)) が観察された。また、KKA20625 の C 末端には PTS1 ([S/T/A/G/C/N]-[R/K/H]-[L/I/V/M/A/F/Y; PROSITE, PS00342) に一致する配列 A-R-L が存在したが、KKA21004 における配列は A-A-L であり一致しなかった。KKA20625 には、DAAO と DDO で基質 D-アミノ酸の α -アミノ基と α -カルボキシ基と相互作用する Tyr, Arg および Gly 残基に対応する位置に、Tyr244, Arg308 および Gly335 残基が観察された。一方、KKA21004 には、同位置に Arg293 と Gly329 残基が観察されたが、Tyr 残基は観察されず、TdDDO と同様に Phe232 残基が観察された。また、KKA21004 には、DDO で基質酸性 D-アミノ酸の側鎖カルボキシ基との相互作用する Arg 残基に対応する位置に Arg223 残基が観察された。KKA20625 には真菌 DAAO に特異的に見出される Asn 残基 (Asn53) が観察され、KKA21004 には真菌 DDO に特異的に見出される His 残基 (His55) が観察された。これらの結果から、KKA20625 をコードする遺伝子 T310_5354 は DAAO をコードし、KKA21004 をコードする遺伝子 T310_4950 は DDO をコードすると考えられた。

KKA20625	MAT-NNIVVLGAGVSGLTAAWLISKD-----PSNKI-----TVAAKHMRGD-----YDIEYCSPHAGANYL	55
ReDAAO	MAT-NNIVVLGAGVSGLTAAWLISKD-----PSNKI-----TVAAKHMRGD-----YDIEYCSPHAGANYL	55
TdDAAO(f)	MEN-TNIVVLGAGVIGLTAAWLISRD-----PKKKI-----TVVAKHMRGD-----YDIEYASPHAGANYL	55
RgDAAO(f)	MHSQKRVVVLGSGVIGLSSAAILARK-----GYSV-----HILARDLREDV-----SSQTFASPHAGANWT	56
TvDAAO(f)	MA---KIVVIGAGVAGLTAAQLLRK-----GHEV-----TIVSEFTRGD-----LSIGYTSAPHAGANWL	52
pkDAAO	M---RVVVIAGVIGLSTALCIHER-----YHSLVQLPDKVYADRFTF-----FTTTDVAAAGLWQ	53
hDAAO	M---RVVVIAGVIGLSTALCIHER-----YHSLVQLPHIKVYADRFTF-----LTTTVDVAAAGLWQ	53
RxDAAO	MRCGRVAVVVGCVIGLSAAILVLRER-----GFGV-----RVVAREPHERT-----TSVAALAAVWY	51
KKA21004	MTA-ETIVVIGAGVIGLSTALAIQHH-----LKPQGS-----LIVAREFNTT-----SINVASPHAGAHYR	57
ChDDO(f)	MPPSDPTIVLGAAGVIGLTTAVRLLEAH-----LGANV-----HILADHMRSDA-----LDAQVASTIAGAHHL	58
TdDDO(f)	MPP--RIIILGAGITIGLSTAVELQRRHQHRSAPRPSI-----TIVSAELISQPSSEWTEPRCRPSPDYASPHAGAHYR	72
KKA20625	PVGA-----ENSRVQGERATMPHLRDIAQNHP--EAGIHFQDTVVYNRKTDQGSSTGQWFSELVKPNWYGVKVLPNFRE	128
ReDAAO	PVGA-----ENSRVQGERATMPHLRDIAQNHP--EAGIHFQDTVVYNRKTDQGSSTGQWFSELVKPNWYGVKVLPNFRE	128
TdDAAO(f)	PVVLQGVGAENNKVGKFEKATMPHLRDIAQNHP--EAGIHFQDTVVYNRKTDQGSSTGQWFSELVKPNWYGVKVLPNFRE	133
RgDAAO(f)	PFMTL---TDGPQAKHEESTFKKWELVPT-----GHAMWLKGTTRFAQNE-----DGL-LGHWYKDTIPNYPR	117
TvDAAO(f)	TFY-----DGGLADYDAVSYPILRELARSSP--EAGIRLISQSHVLKRDLPK-LEVAMSAICQRNWFKNITVDSREI	123
pkDAAO	PYTSSE---PSNPQEANINQQTIFYNLISHIGSPNAANMGLTPVSGYNLF-----REA-VPDPRYKMDMLGFRK	116
hDAAO	PYLSLSD---PNNPQEAIDSQQTIFYNLISHVHSPNAENGLLFGISGYNLF-----HEA-IPDPSWKDTVLGFRK	116
RxDAAO	PYRA-----YPEDRVLRNGARTYEVFRGLA-ADP-RSGVRLREGVELL-----RRTSTGEPMWRGAVSGFRK	111
KKA21004	PAPGK---SPQVVRARWARHTYDIFQKIAAEEP--AAQVEFMEGIEHFENPPQ-----EYLDARDPDSAYAHLDGSLRE	128
ChDDO(f)	SFAD---DGDARQRRNDMRITFDVLYDEWKAVG-ERTGLMALTQTEMM-----EGA-TSHLAVYEGNPDPRV	119
TdDDO(f)	PFIGA---TPQLQREAOHAMDIFRRMRRIARDAP--EAGVRMPGIEYLEDSPK-----EY-GRLR-TGDRYAGEHDEFV	141
KKA20625	LSKDEL--P--PGIDNANRFTSVCINTAVYLPNHLVGQCRKNGVVFRAVFKHVAEAA---NAHHSQKADLVNCTGLS	200
ReDAAO	LSKDEL--P--PGIDNANRFTSVCINTAVYLPNHLVGQCRKNGVVFRAVFKHVAEAA---NAHHSQKADLVNCTGLS	200
TdDAAO(f)	LPKSEL--A--PGIDNNSFTSVCINTAVYLPNHLVGQCRKNGVVFRAVFKHVAEAA---SAHHSQKADLVNCTGLS	205
RgDAAO(f)	LPSSCE--P--PGA-IGVYDTLTVSHAPKVCQYLARELQKLGAFTERRVTLSLEQAF-----DGAALVVNATGLG	182
TvDAAO(f)	IEDRSRIVH---DDVAVLVEFRSVCIIHTGVYLNHLMSQCLSLGATVVKRRVNHKIDAN---LLHSSGSRPDVINCSELF	197
pkDAAO	ITPREL--DMFEDYRYGWFNTSLILEGRKYLQMLTERLTERGVKFFLRKVESFEVA-----RGGAADVIINCTGVW	185
hDAAO	ITPREL--DMFEDYRYGWFNTSLILEGRKYLQMLTERLTERGVKFFLRKVESFEVA-----REGADVIINCTGVW	185
RxDAAO	CRREEL--P--PGCRGGRYFVAPVAEMPAYLAYLGRFREAGGELELREVSSLEEV-----AGGADVAVNCSGAG	177
KKA21004	LSPAEL--P--EGVKWIRYWAYCINPPVYCAHLRKFLRGQTKYTLASLLEAF-----HL---ASNVTITVNCAGLGR	199
ChDDO(f)	LDPRTA--PC-SNITHMVSFTSLTIAPTIVYLAALEARVRDLGAKLHRAHVPSLGALRDPALLALYTRPPAAVFCAGLGR	196
TdDDO(f)	LKAEEL--P--EGVAMGCRYQTSYNAPHYSRHLDRFLAGGQIVHRKLERLEAF-----TLFE-DGSQPLVINCIGRN	212
KKA20625	SRKLGGVQ-DNTLLPARGQIVVRNDPGLMCSIS---GT-D--DGDD---EVTYMMTRAAGGGTILGGTYQKHNWDSLDP	270
ReDAAO	SRKLGGVQ-DNTLLPARGQIVVRNDPGLMCSIS---GT-D--DGDD---EVTYMMTRAAGGGTILGGTYQKHNWDSLDP	270
TdDAAO(f)	SRKLGVL-DNTLLPARGQIVVRNDPGLMCSIS---GS-D--DGDD---EVTYMMTRAAGGGTILGGTYQKHNWDPNDP	275
RgDAAO(f)	AKSIAGID-DQAAEIRGGQTVLKS-PCKRCTM---D-S--SDPA---SPAYITPRPG-GEVTCGGTYGVGDWDSLVDN	248
TvDAAO(f)	ARFLGGVE-DKKMYRIRGGQVLRNLSPLFMASFS---ST-PEKENED---EALYIMTRF-DGTSIGGCFPNNSSEDP	268
pkDAAO	AGVLQ--P-DPLLQGRGGQIKVDA-PNLKNFI---IT-H--DLERGIYNSPYIIPGL-Q-AVTLGGTFQVGNINENN	252
hDAAO	AGALQ--R-DPLLQGRGGQIKVDA-PNLKNFI---LT-H--DPERGIYNSPYIIPGT-Q-TVTLGGTFQVGNINENN	252
RxDAAO	ARKLVG---DPAVFRIRGGQVLRVAN-PGLERFM---LD-E--ENPE---GLTYIVPRIT-E-DCVLGGTAEEGSSTRPD	241
KKA21004	F-----A-DPKSFIIRGGQICLVRN-PSRTTIT---R-Q--NADG---SWSFSIPRPLEGGTILGGTKQPHDNPEPL	258
ChDDO(f)	ARHLVPAPAAALFIRGGQVVRN-PNMRAGFTRQVGLG--GGEGG--TRTYIPRC-NQEVVLGGTMEQGDWTPYPR	270
TdDDO(f)	FD-----Q-DKMRIRIRGGQVLRN-QFDRITIT---R-Q--NRDG---SWIFLIPRPF-AGTILGGTKEPGDMEVKPR	273
KKA20625	PNLAVRIMKRILEICSLVAPGQ-----GIEG--LDIIRHGVGLRPVREDSPRIEKELI-----322	322
ReDAAO	PNLAVRIMKRILEICSLVAPGQ-----GIEG--LDIIRHGVGLRPVREDSPRIEKELI-----322	322
TdDAAO(f)	PNLAVRIMKRILEICSLVAPGQ-----GIEG--LSIIRHGVGLRPLRRDGPVRAEKI-----327	327
RgDAAO(f)	PETVQRILKHLRLDPTISSDG-----TIEG--IEVLRHNVGLRPAARGGPVRAERIVLPLDRTKSPLSLGRGSAR	318
TvDAAO(f)	PSLTHRLSRALDRFELTKDG-----P--LDIVRECVGHRPREGGPRVLEKI-----316	316
pkDAAO	IDQHNTMEGECRLERTLK-----D--AKIVGEYTFRPRVPRQ-VRLEREQLRF-----298	298
hDAAO	IDQHNTMEGECRLERTLK-----N--ARIIEGATFRPRVPRQ-VRLEREQLRT-----298	298
RxDAAO	PVTAYSILHRTALERTLQ-----G--APVLEHRAGLRPGRPE-VRLERTTLP-----286	286
KKA21004	PIRATLLANAAKWFPTPES-----NGQ--FDVIRDIVRRPARREGGVRLAETVSV--VG-----TD	313
ChDDO(f)	DETVDLTLRALQICPDIAAPPYARSWPKDDQVAALRSIVVDVAGFRPSRAGGARVALASA-----331	331
TdDDO(f)	METRLKLLNENVRAPREFVDR-----LED--FDVVLNDVRRPMDGGLRLLEERIE-----323	323
KKA20625	---DG-VVVVHNYGHGGYGYQTSFCATTAVEVV-REALQQQK-QRKD-KAR-L	368
ReDAAO	---DG-VVVVHNYGHGGYGYQTSFCATTAVEVV-REALQQQK-QRRD-KAR-L	368
TdDAAO(f)	---DG-QVVVHNYGHGGYGYQASVBSVAVAEAV-EQALQKK-----TAK-L	368
RgDAAO(f)	AAKEKE-VTLVHAVFSSAGYQSSGAAEDVAQLV-DEAFQRYH-GAAR-ESK-L	368
TvDAAO(f)	---PVGTVVVHNYGAAGAGYQSSYGMDEAVSYV-ERALTTP-----N-L	356
pkDAAO	-G-SSN-TEVITHNYGHGGYGLTIHNGCALEAKLF-GKVLERNLLTMP-PSH-L	347
hDAAO	-G-PSN-TEVITHNYGHGGYGLTIHNGCALEAKLF-GRILEEKLSRMP-PSH-L	347
RxDAAO	---DG-TPCITHNYGHGGSVTLISWGCREEAAEA-AAALDRN-----P	324
KKA21004	-GQTSN-RVVVHAYGAGGRGYEISWGAEDVKGLLERGVLQER-----AA-L	358
ChDDO(f)	---AG-MRVVHNYGHGGAGYQSSGAAEDVAQLV-AGGAGGA-----R-L	370
TdDDO(f)	---DG-KTVTHAVGAGGRGYELSWGIAKEVADELV-LA-TERSK-FECRVSENLK	370

Fig. 2-5. *R. emersonii* CBS393.64 株の推定 DAAO と DDO および既知 DAAO と DDO のアミノ酸配列比較

青塗りは N 末端領域の Wierenga ADP 結合配列: GxGxxG (x は任意のアミノ酸残基) を示す。緑塗りは C 末端領域の PTS1 を示す。マゼンタ塗りは pkDAAO と hDAAO の active-site lid を示す。(▽)は真菌 DAAO 特異的な Asn 残基または真菌 DDO に特異的な His 残基を示す。(▼)は既知 DAAO と DDO において基質 D-アミノ酸の α-アミノ基または α-カルボキシ基と相互作用する Tyr, Arg および Gly (Ser) 残基を示す。(●)は RgDAAO の Met213 残基に対応する位置を示す。波線は RgDAAO における二量体化ループを示す。既知の DAAO と DDO 名に続く(f)は真菌由来を示す。アライメントには *T-COFFEE server* (<http://tcoffee.crg.cat/>) を用いた。用いたアミノ酸配列の UniProtKB accession no. を以下に示す: RgDAAO, P80324; TvDAAO, Q99042; pkDAAO, P00371; hDAAO, P14920; ChDDO, Q75WF1.

2.4. *R. emersonii* YA 株の *DAAO* ホモログ (*ReDAAO*) 遺伝子の単離

アミノ酸配列から推定された *R. emersonii* CBS 393.64 株の *DAAO* ホモログ遺伝子 (T310_5354) の 5' と 3' 末端に相補的なプライマーを用いて、YA 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR により、YA 株の *DAAO* ホモログ遺伝子の単離を試みた。PCR の結果、長さの異なる増幅産物が 2 つ得られた (Fig. 2-6)。このうち、長い増幅産物の塩基配列を解析したところ、配列全長は 1,443 bp であり、その塩基配列は T310_5354 の塩基配列と 3' 末端領域の 1 塩基を除き同じであった。したがって、得られた増幅産物は単離した YA 株の *DAAO* ホモログ (*ReDAAO*) 遺伝子と考えられ、単離した塩基配列を Genbank に登録した (accession no. : LC436777)。遺伝子配列の 1 塩基の違いにより、363 番目のアミノ酸残基が *R. emersonii* CBS 393.64 株 *DAAO* では Lys, *ReDAAO* では Arg 残基であった。

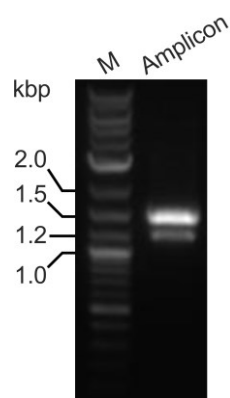


Fig. 2-6. *R. emersonii* YA 株の *DAAO* ホモログ遺伝子の PCR 増幅

左から順に、DNA マーカーと PCR 増幅産物を示す。

2.5. *ReDAAO* 遺伝子の *E. coli* における発現と発現産物の精製

R. emersonii YA 株に見出された *ReDAAO* 遺伝子が機能的な DAAO をコードすることを明らかにするため、*E. coli* における発現を検討した。*ReDAAO* 遺伝子を有する pET-15b ベクターを *E. coli* BL21(DE3)pLysS に導入して LB 培地で培養したのち、IPTG 添加により遺伝子を誘導発現させた。その結果、*ReDAAO* 遺伝子を導入した *E. coli* は生育が OD₆₀₀ において約 2.0 程度まで増殖し、最終的に 600 ml の LB 培地から湿重量 4.0 g の菌体を得ることができた。

得られた *ReDAAO* 遺伝子を発現させた *E. coli* から粗抽出液を調製し、種々の D-アミノ酸に対するオキシダーゼ活性を測定した (Fig. 2-7)。測定の結果、*ReDAAO* 遺伝子を発現させた *E. coli* の粗抽出液は D-Ile に対して最も高い活性 (2.8 U/mg) を示した。また、D-Phe や D-Tyr といった嵩高く疎水性の強い中性 D-アミノ酸や、D-Leu、D-Val や D-Gln といった中程度の大きさの中性 D-アミノ酸に対しても D-Ile と同程度の活性を示した。さらに興味深いことに、DDO の基質であり DAAO の基質でない酸性 D-アミノ酸である D-Glu に対しても中性 D-アミノ酸と同程度の活性を示した。一方、酸性 D-アミノ酸である D-Asp に対してはほとんど活性を示さなかった。これらの結果から、アミノ酸配列から推定されたように、*ReDAAO* 遺伝子は機能的な DAAO をコードしていることが明らかになった。また、第 1 章で報告した基質特異性の狭い TdDAAO とは異なり、*ReDAAO* は D-Glu を含む多様な D-アミノ酸に作用する新奇な広基質特異性を有すると考えられた。

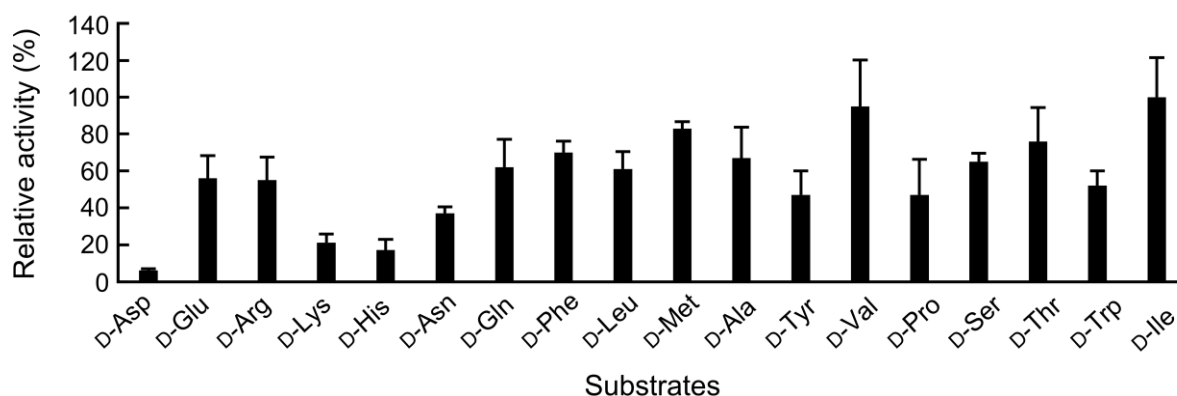


Fig. 2-7. *E. coli* 粗抽出液を用いた *ReDAAO* 遺伝子発現産物の基質特異性

各 20 mM D-アミノ酸 (D-Tyr は 1.5 mM) を基質として 37°C で 4-AA/HRP カップリング法によりオキシダーゼ活性を測定した。D-Ile に対する比活性 2.8 U/mg を 100%とした相対活性を示した。測定は 3 回行いその平均値を示した。エラーバーは標準偏差を示す。

次に、*ReDAAO* 遺伝子を発現させた *E. coli* 粗抽出液から *ReDAAO* を His タグアフィニティークラムを用いて精製した。精製した *ReDAAO* を SDS-PAGE に供したところ、His タグ融合タンパク質としての分子質量 (42 kDa) に相当する位置に単一のバンド (>95%以上) が観察され、電気泳動的に単一に精製されたことが分かった (Fig. 2-8)。最終的に、*ReDAAO* 遺伝子を発現させた *E. coli* 粗抽出液から、*ReDAAO* を収率 25.7% で 24.6 倍にまで精製し、1.43 mg (総タンパク質量) の精製酵素標品を取得した。精製した *ReDAAO* は 37°C と 55°C において 20 mM D-Ile に対してそれぞれ 70.0 と 112 U/mg の比活性を示した。*E. coli* で His タグ融合体として発現され、精製された常温性真菌由来の *RgDAAO* と *TvDAAO* は、37°C においてそれぞれ 81.0 U/mg (基質 D-Met) と 123 U/mg (基質 D-Trp) の比活性を有することが報告されている(155)。また、好熱性細菌由来の His タグ融合 *RxDAAO* は 21.1 U/mg (60°C, 基質 D-Val) の比活性を示すことが報告されている(45)。したがって、*ReDAAO* は、*RgDAAO* や *TvDAAO* と同様に、高い触媒活性を有する *DAAO* であることが分かった。

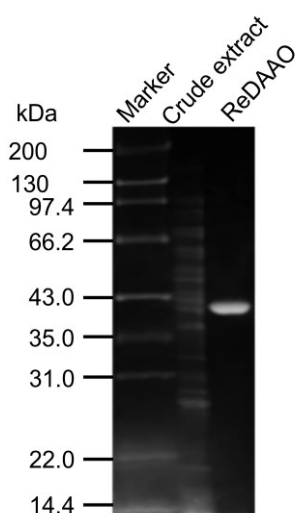


Fig. 2-8. 精製 *ReDAAO* の SDS-PAGE 解析

Marker, 分子量マーカー; Crude extract, *ReDAAO* 遺伝子発現 *E. coli* 粗抽出液 (10 µg); 精製 *ReDAAO* (2 µg). 蛍光染色試薬 Instant-Bands を用いて染色したタンパク質を 12.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し、LED トランスイルミネーター (λ500 nm) を用いて検出した。

2.6. ReDAAO の酵素学的諸特性解析

2.6.1. ReDAAO の基質特異性解析

精製した ReDAAO の基質特異性を解析した。その結果、*E. coli* 粗抽出液とは異なり、ReDAAO は D-Val に対して最も高い活性 (79.2 U/mg) を示した (Table 2-2)。また、ReDAAO は多様な D-アミノ酸に対して高い活性を示し、なかでも D-Ile, D-Phe, D-Met や D-Ala に対しては比較的高い活性を示した。さらに、前述した粗抽出液の結果と同様に、ReDAAO は酸性 D-アミノ酸の D-Glu に対しても高い活性を示した。現在まで、広基質特異性を有する常温性真菌由来の RgDAAO や TvDAAO を含め、酵素学的諸特性が解析されている既知 DAAO において、本来 DDO の基質となる酸性 D-アミノ酸の D-Glu に対して高い活性を示すものは報告されていない。したがって、ReDAAO は新奇的な広基質特異性を有することが明らかとなった。また、ReDAAO は cephalosporin C (CPC) に対しても高い活性を示した。この ReDAAO の CPC に対する活性は、現在 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) 生産に工業的に利用されている常温性真菌由来の TvDAAO に匹敵したことから、ReDAAO が 7-ACA 生産に利用できる可能性が期待された。反対に、塩基性 D-アミノ酸である D-Lys や酸性 D-アミノ酸である D-Asp に対しては低い活性を示した。また、精製 ReDAAO は広基質特異性を有する RgDAAO や TvDAAO と同様に、鏡像異性体を持たない Gly に対して著しく低い活性を示した。さらに、高い活性を示した D-Ile, D-Val および D-Met の鏡像異性体である L-Ile, L-Val および L-Met に対しては活性を示さなかった。したがって、ReDAAO は他の既知 DAAO と同様に高い立体選択性を有することが分かった。

Table 2-2. ReDAAO と他の既知 DAAO の基質特異性比較

Substrates	Relative activity \pm SD (%)					
	ReDAAO	TdDAAO ^a	RgDAAO ^b	TvDAAO ^b	pkDAAO ^b	RxDAAO ^c
D-Val	100	0.2	95	100	28	100
D-Ile	88.4 \pm 5.3	0.1	56	76	35	26.7
D-Phe	82.3 \pm 9.6	95.7	79	36	84	2.1
D-Met	74.2 \pm 2.3	100	100	78	75	2
D-Ala	70.0 \pm 15.9	16.1	71	97	40	1.6
D-Leu	64.6 \pm 5.3	94.2	57	32	21	27.2
D-Gln	60.5 \pm 11.8	77.0	53	81	1	1
D- <i>allo</i> -Thr	53.2 \pm 2.2	-	-	-	-	-
D-Glu	53.0 \pm 0.8	0.9	4	9	n.d.	5.1
D-Arg	45.9 \pm 2.0	10.4	2	43	4	1.1
D-Ser	41.3 \pm 4.7	6.2	41	22	18	1.3
D-His	30.6 \pm 3.8	42.1	58	88	3	3.6
D-Tyr	30.4 \pm 0.8	79.5	26	17	4	17.6
D-Asn	27.6 \pm 0.7	23.7	40	65	n.d.	0
D-Trp	17.3 \pm 3.8	44.1	56	38	2	1.5
D-Thr	16.1 \pm 1.1	0.1	10	4	2	11.5
CPC	14.0 \pm 0.5	-	2	13	0	n.d.
D-Lys	12.6 \pm 1.4	6.8	5	17	2	2.4
D-Pro	5.2 \pm 0.4	0.4	57	25	100	0
D-Asp	2.5 \pm 0.1	<0.1	0	4	1	n.d.
Gly	0.9 \pm 0.7	-	3	0	n.d.	0
L-Ile	n.d.	-	-	-	-	<1
L-Val	n.d.	-	-	-	-	<1
L-Met	n.d.	-	-	-	-	n.d.

ReDAAO において, 1.5 mM D-Tyr と 1 mM cephalosporin C (CPC) を除く, 各 20 mM D-アミノ酸を基質として 37°C, pH 8.0, 4-AA/HRP カップリング法により DAAO 活性を測定した. D-Val に対する比活性値 (79.2 U/mg) を 100% とした相対活性を示した. 測定は 3 回行い, 平均値を示した. n.d. は不検出, (-) はデータなしを表す. ^a は第 1 章におけるデータ, ^b は Tishkov らのデータ(38), ^c は Takahashi らのデータ(56)を用いた.

2.6.2. 酵素反応速度論的パラメーター解析

より詳細な ReDAAO の酵素学的な反応特性を明らかにするため、基質特異性解析において高い活性が観察された中性 D-アミノ酸の D-Val, D-Met および D-Ala, 塩基性 D-アミノ酸の D-Arg, そして酸性 D-アミノ酸の D-Glu に対する酵素反応の速度論的パラメーターを解析した (Table 2-3). 解析の結果, ReDAAO は D-Met に対して最も低いミカエリス定数 K_m (0.213 mM) を示した. また, D-Val に対して最も高い分子活性 k_{cat} (225 s⁻¹) を示した. そして, D-Met に対して最も高い特異性定数 $k_{cat} K_m^{-1}$ (562,000 s⁻¹ mM⁻¹) を示し, 次に D-Val に高い $k_{cat} K_m^{-1}$ を示した (Table 2-3). D-Glu に対しては, 比較的高い k_{cat} (90.7 s⁻¹) を示したが, K_m が高いことから特異性定数は D-Met で得られた値よりも 75 倍低かった. しかし, D-Glu に対する k_{cat} は DAAO の基質とされている D-Arg に対する k_{cat} よりも 2 倍高く, K_m は 1.5 倍低かったことから, D-Glu に対する $k_{cat} K_m^{-1}$ は, D-Arg に対する $k_{cat} K_m^{-1}$ よりも高い値を示し, D-Glu は D-Arg よりも良い基質であることが分かった.

Table 2-3. ReDAAO の酵素反応速度論的パラメーター

Substrate	Mean ± SD			
	V_{max} (U/mg)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	$k_{cat} K_m^{-1}$ (s ⁻¹ M ⁻¹)
D-Val	318 ± 3.4	225 ± 2.4	0.628 ± 0.04	358,000
D-Met	169 ± 4.4	120 ± 3.1	0.213 ± 0.03	562,000
D-Ala	267 ± 7.3	189 ± 5.2	2.7 ± 0.3	69,900
D-Glu	128 ± 9.3	90.7 ± 6.6	12.1 ± 2.9	7,490
D-Arg	64.5 ± 6.3	45.6 ± 4.5	19.2 ± 4.3	2,380

D-Val と D-Met は 0.125–50 mM, D-Ala は 0.5–50 mM, D-Glu は 0.5–100 mM, D-Arg は 1.0–50 mM を用いて, 55°C で 4-AA/HRP カップリング法により DAAO 活性を測定した. 測定は 3 回行い, その平均値を示し, SD は標準偏差を示す.

2.6.3. ReDAAO の補酵素解析

ReDAAO がフラビンを含むかどうかを明らかにするため、精製 ReDAAO の吸収スペクトルを測定した (Fig. 2-9a). その結果、ReDAAO は典型的なフラビン酵素において観察される 273, 375 および 455 nm に吸収極大を有するスペクトルが観察された. このことから、ReDAAO は他の DAAO や DDO と同様にフラビンを含むことが分かった. また、酵素溶液への D-Ile 添加後の吸収スペクトルを測定したところ、375 と 455 nm の吸収極大が消失した. このことから、反応において含有するフラビンの還元が示唆され、含有 FAD が補酵素として機能していると考えられた.

次に、ReDAAO が含有するフラビンが共有結合もしくは非共有結合のどちらの様式で結合しているか解析した (Fig. 2-9b). 精製 ReDAAO を熱変性させたのちに遠心分離により回収した上清はフラビンに由来する黄色を呈したことから、ReDAAO が含有するフラビンは、他の DAAO や DDO 同様に、非共有結合的に結合していることが示された. さらに、上清を薄層クロマトグラフィー (TLC) に供したところ、上清中のフラビンの R_f 値 (0.70) は FMN ではなく FAD の値と一致したことから、ReDAAO は FAD を補酵素として含有すると考えられた.

次に酵素標品中のホロ体の量を明らかにするため、また、0.18 mM ReDAAO タンパク質の熱変性後の遠心上清の FAD を分光法により定量したところ、その濃度は 0.18 mM だった (Fig. 2-9c). したがって、精製した ReDAAO の 100% がホロ体として存在することが示唆された.

次に、ReDAAO と FAD の結合強度 (解離定数 K_d) を明らかにするため、ReDAAO のアポ化を検討した. その結果、2 M KBr に対し ReDAAO 溶液を 5 日間透析したにもかかわらず、FAD の有意な量の放出は観察されなかった. したがって、ReDAAO の FAD に対する K_d を求めることは出来なかったが、その結合は RxDAAO や TdDDO と同様に非常に強固であると考えられた.

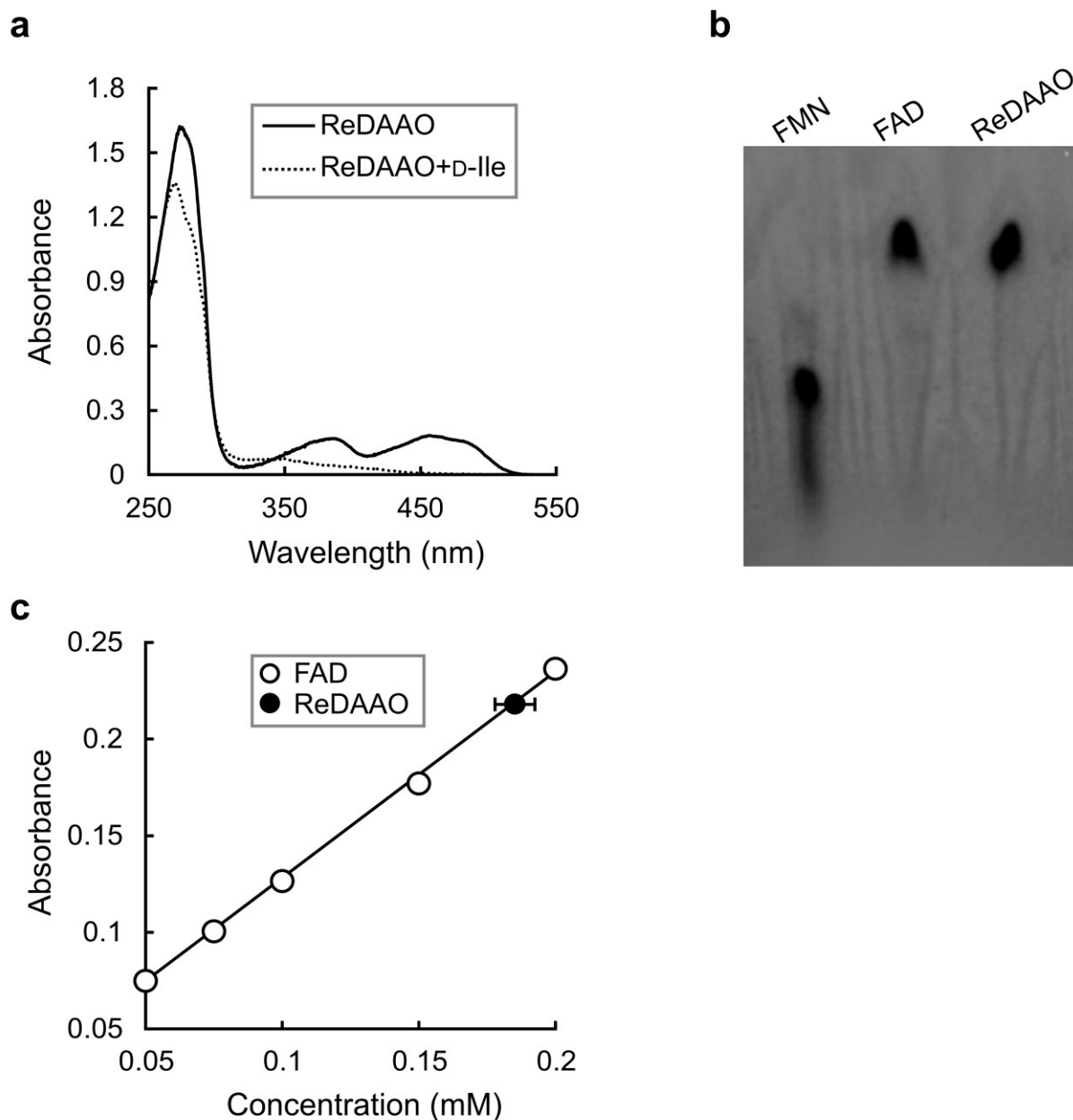


Fig. 2-9. ReDAAO の補酵素フラビンの解析

(a) ReDAAO の吸収スペクトル. 20 μ M ReDAAO の 250–550 nm における吸光度を測定した. 実線は D-Ile を添加せずに 40°C で 10 分保温後, 点線は終濃度 50 mM D-Ile を添加し 40°C で 10 分間保温後に測定した吸収スペクトルを示す. (b) TLC 解析. 左から順に, 1 μ l 標準 100 μ M FMN; 1 μ l 標準 100 μ M FAD; 1 μ l 183 μ M ReDAAO タンパク質熱変性後の遠心上清. 展開溶媒として 5% (w/v) Na_2HPO_4 溶液を用いた. (c) ReDAAO の FAD 含有量測定. 0.05–0.2 mM 標準 FAD の 450 nm における吸光度をもとに 0.18 mM ReDAAO の熱変性後の遠心上清の 450 nm の吸光度を測定.

2.6.4. ReDAAO の四次構造解析

ReDAAO の四次構造を明らかにするために、ReDAAO (タンパク質濃度 0.1 mg/ml) をゲル濾過クロマトグラフィーに供し、分子量を求めた (Fig. 2-10). その結果、ReDAAO の分子量は約 180 kDa であり、His タグを付加したアミノ酸配列から算出された分子質量 42 kDa の 4 倍の値と概ね一致した。したがって、ReDAAO はタンパク質濃度 0.1 mg/ml において四量体として存在することが明らかとなった。

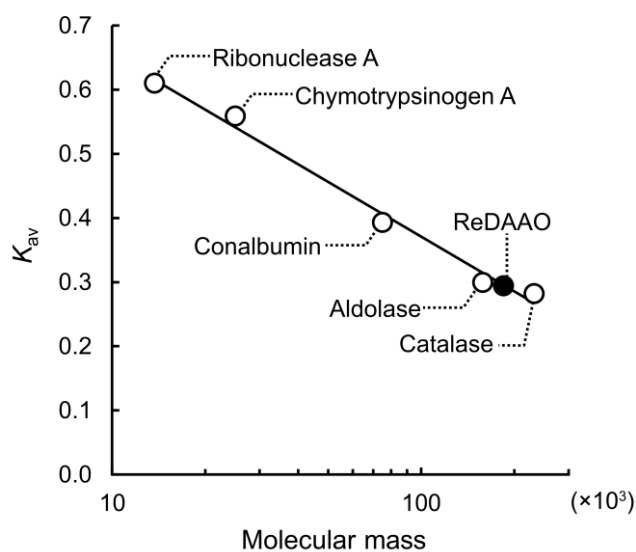


Fig. 2-10. ReDAAO の四次構造解析

タンパク質濃度 0.1 mg/ml の ReDAAO の分配係数 K_{av} を標準タンパク質から得られたものと比較することで算出した。標準タンパク質として以下を用いた: ribonuclease A, 13.7 kDa; chymotrypsinogen A, 25.0 kDa; conalbumin, 75.0 kDa; aldolase, 158 kDa; catalase, 232 kDa.

2.6.5. ReDAAO の至適 pH と pH 安定性の解析

ReDAAO の至適 pH を明らかにするため、pH 4.0–10.0 でそれぞれ ReDAAO の活性を測定した (Fig. 2-11a)。その結果、ReDAAO は pH 8.0 で最も高い活性を示したことから至適 pH は 8.0 であることが明らかとなった。また、pH 8.0–pH 10.0 の塩基性領域においても高い活性 (pH 8.0 の約 90%の相対活性) を示した。一方、pH 8.0 より低い pH では活性は急激に低下した。

次に、ReDAAO の pH 安定性を明らかにするため、異なる pH で ReDAAO をそれぞれ 1 時間保温した後の残存活性を測定した (Fig. 2-11b)。その結果、ReDAAO は pH 7.0–10.0 で比較的高い残存活性を示したことから、この pH 領域で安定であることが明らかとなった。一方、pH 6.0 以下の酸性領域や pH 11.0 の塩基性領域での残存活性は著しく低下した。

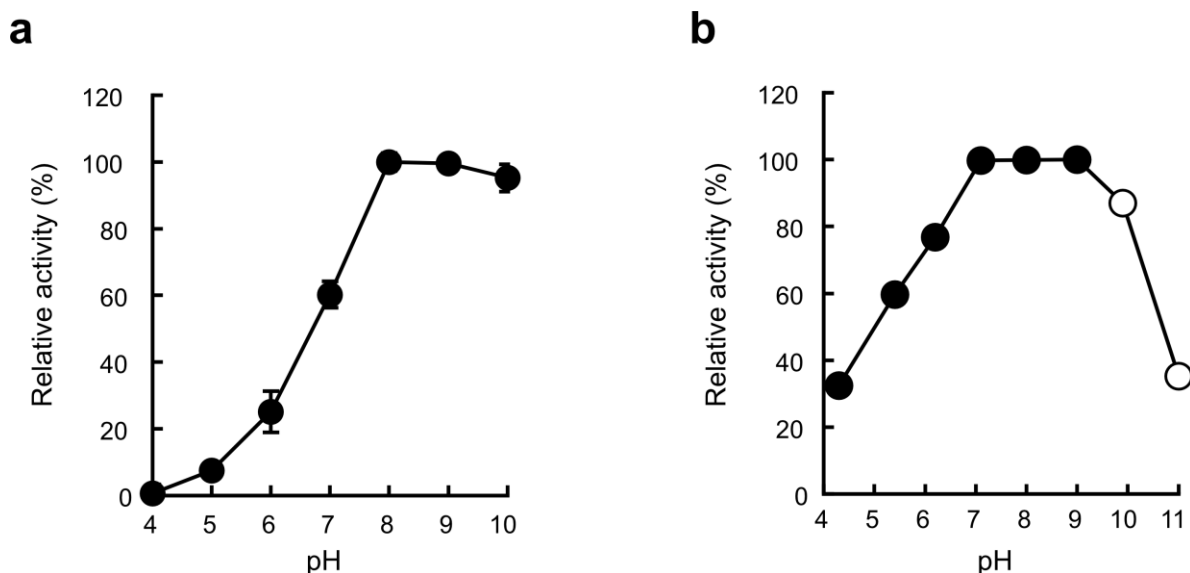


Fig. 2-11. ReDAAO の pH 特性

(a) pH が活性に与える影響. pH 4.0–10.0 (50 mM GTA buffer) において、20 mM D-Val を基質として用いて、20 μ M FAD 存在下で 2, 4-DNPH 法により 55°C で活性を測定した。pH 8.0 における活性を 100%とした相対活性を示した。(b) pH が安定性に与える影響. pH 4.3–10.0 (50 mM GTA buffer, ●) と pH 10.0–11.0 (50 mM CAPS buffer, ○) で 45°C で 1 h 保温後、20 mM D-Val を基質として用いて、20 μ M FAD 存在下で 4-AA/HRP 法により 55°C, pH 8.0 で活性を測定した。pH 8.0 で保温後の活性を 100%とした相対活性を示した。3 回測定し、その平均値を示した。エラーバーは標準偏差を示す。

2.6.6. ReDAAO の至適温度と耐熱性の解析

ReDAAO の至適温度 (T_{opt}) を明らかにするため、30–70°C で ReDAAO の活性を測定した (Fig. 2-12a). その結果、ReDAAO は 55°C において最も高い活性を示したことから、 T_{opt} は 55°C であることが分かった.

次に、ReDAAO の耐熱性を明らかにするため、20–70°C で 1 時間保温後の ReDAAO (0.1 mg/ml) の残存活性を測定した (Fig. 2-12b). その結果、ReDAAO の残存活性は 50°C まで一定で高かったことから、この温度範囲で安定であることが分かった. また、ReDAAO の 0.1 mg/ml における T_{50}^{60} (初期活性の 50% が失われる 60 min の保温温度) は 60°C であった.

次に、タンパク濃度が ReDAAO の耐熱性に与える影響を明らかにするため、0.1 と 0.01 mg/ml のタンパク濃度で 1 時間保温後の ReDAAO の残存活性を測定した (Fig. 2-12c). その結果、0.1 から 0.01 mg/ml のタンパク濃度の低下に伴う ReDAAO の残存活性の減少は約 10% に留まった. したがって、タンパク濃度は ReDAAO の耐熱性に大きな影響を与えないと考えられた.

次に、ReDAAO の熱安定性に及ぼす FAD の添加効果を解析した (Fig. 2-12c). 0.01 mg/ml ReDAAO に終濃度 0.1 mM になるように FAD を添加し、熱安定性を解析したところ、FAD の添加により保温後の残存活性がわずかに上昇し、0.1 mg/ml タンパク濃度の熱安定性と同等になった. このことから、FAD の添加は熱安定性を高めると考えられた.

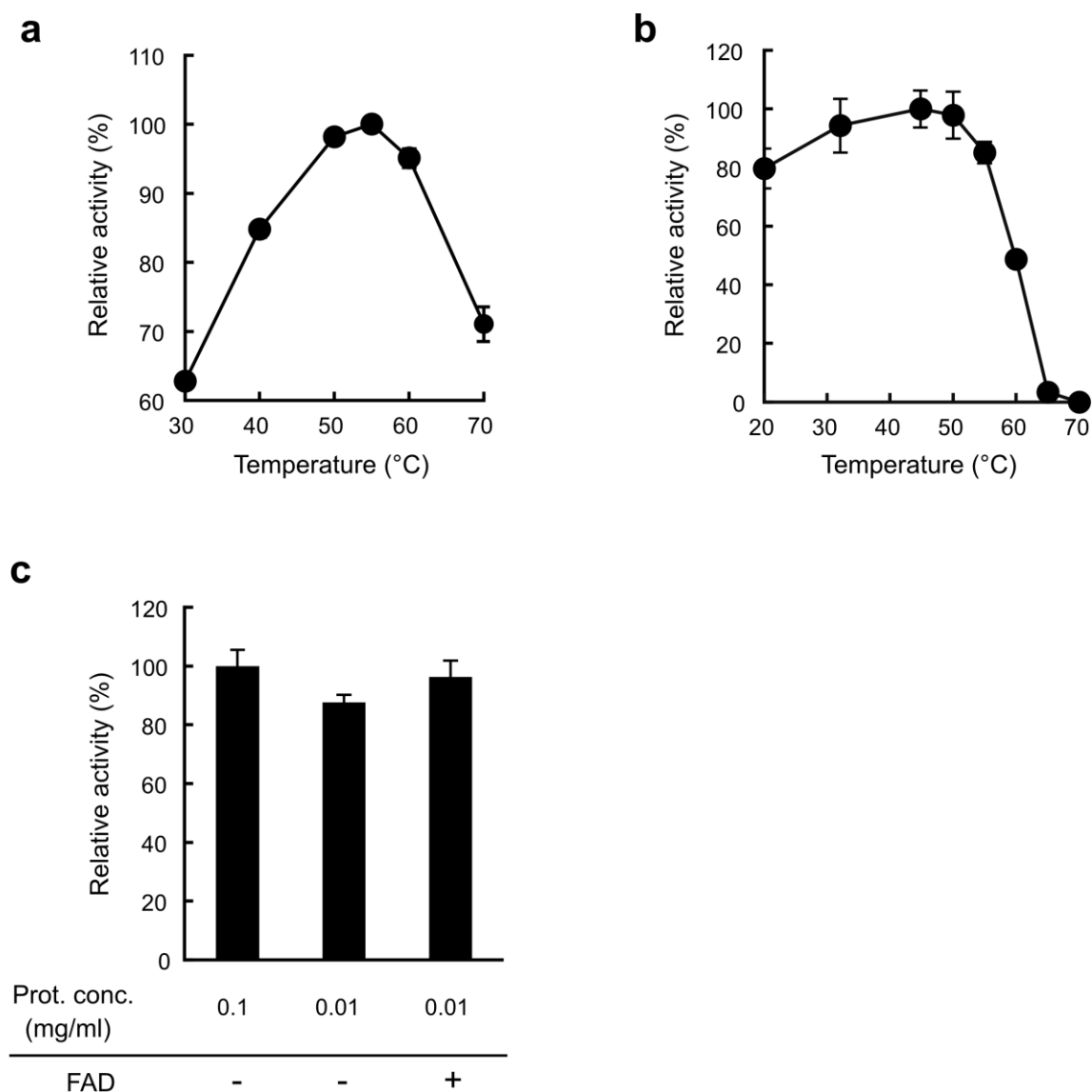


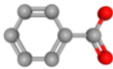
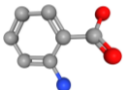
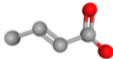

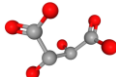
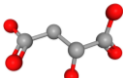
Fig. 2-12. ReDAAO の温度特性

(a) 温度が活性に与える影響. 30–70°C の反応温度で, 20 mM D-Val を基質として用いて, 20 μ M FAD 存在下で 2, 4-DNPH 法により DAAO 活性を測定した. 55°C での活性を 100%とした相対活性で示した. (b) 温度が安定性に与える影響. 20–70°C で ReDAAO (タンパク質濃度 0.1 mg/ml) を 1 h 保温した後, 20 mM D-Val を基質として用いて, 20 μ M FAD 存在下で 4-AA/HRP 法により 55°C で残存 DAAO 活性を測定した. 45°C での保温後の残存活性を 100%とした相対活性で示した. (c) タンパク質が耐熱性に与える影響. タンパク質濃度 0.1 と 0.01 mg/ml の ReDAAO を 0.1 mM FAD 存在または非存在下で 45°C で 1 h 保温した後, 20 mM D-Val を基質として用いて, 20 μ M FAD 存在下で 4-AA/HRP 法により 55°C で残存活性を測定した. 0.1 mg/ml で FAD 非存在下における保温後の残存活性を 100%とした相対活性で示した. 活性はそれぞれ 3 回測定し, その平均値を示した. エラーバーは標準偏差を示す.

2.6.7. ReDAAO の DAAO および DDO 阻害剤の影響解析

ReDAAO の DAAO と DDO 競合的阻害剤に対する影響を解析した (Table 2-4). その結果, 10 mM では, DDO 競合的阻害剤である D-malate により約 14%の活性が阻害されたが, 他の DAAO 競合的阻害剤 (benzoate, anthranilate, crotonate) と DDO 競合的阻害剤 (malonate, *meso*-tartrate) ではほとんど活性阻害は観察されなかった. 一方, 50 mM では, benzoate と crotonate によりそれぞれ約 13%と 23%の活性が阻害された. また, D-malate により約 17%の活性が阻害された. これらの結果から, ReDAAO は基質特異性解析で明らかにされたように, 競合的阻害剤に対する感受性においても, DAAO と DDO の両方の阻害剤感受性を有することが示された. RxDAAO の活性は 10 mM benzoate, anthranilate および crotonate により, それぞれ 63%, 17%および 11%阻害されることが報告されている(45). また, 第 2 章において, TdDDO の活性は, 50 mM malonate, *meso*-tartrate および D-malate により 4%, 23%および 38%阻害された (Table 1-3). したがって, ReDAAO のこれら競合的阻害剤に対する感受性は他の DAAO や DDO と比較して低いことが分かった.

Table 2-4. DAAO と DDO 競合的阻害剤の ReDAAO 活性への影響解析

Compounds		Concentration (mM)	Mean relative activity \pm SD (%)
Inhibitors			
None			100
DAAO inhibitors			
Benzoate		10	93.5 \pm 1.4
		50	86.8 \pm 6.5
Anthranilate		10	95.7 \pm 3.4
		50	103 \pm 1.8
Crotonate		10	101 \pm 0.8
		50	77.4 \pm 2.2
DDO inhibitors			
Malonate		10	91.5 \pm 4.5
		50	98.6 \pm 3.1
<i>meso</i> -Tartate		10	96.5 \pm 2.7
		50	93.5 \pm 5.7
D-Malate		10	86.5 \pm 2.8
		50	82.8 \pm 1.3

10 mM もしくは 50 mM DAAO と DDO 競合的阻害剤存在下における DAAO 活性を, 20 mM D-Val を基質として用いて, 55°C で 2, 4-DNPH 法により測定した. 測定は 3 回行い, 阻害剤非存在下における活性値を 100%とする相対活性を示した. SD は標準偏差を示す. 原子の配色: 灰, 炭素原子; 赤, 酸素原子; 青, 窒素原子.

3. 考察

好熱性真菌の単離と D-アミノ酸資化能

発酵堆肥からの好熱性真菌の単離を検討したところ、60°C の培養温度において全ての堆肥試料から好熱性真菌を単離できなかった。2000 年までに 29 種の好熱性真菌の至適生育温度と限界生育温度が解析されている(143)。そのなかで、60°C 以上の至適生育温度を有する好熱性真菌は報告されていない。また、60°C 以上の限界生育温度を有する好熱性真菌はわずか 6 種であり、その最高温度は *Cheatomium thermophile*, *Thermoascus aurantiacus* および *Thermomyces ibadanensis* における 61°C である。また、50°C の培養温度においても、本研究で単離できた好熱性真菌はわずか 3 株であった。至適生育温度と限界生育温度が解析されている 29 種の好熱性真菌のうち、その全てが 50°C 以上の限界生育温度を有するが、50°C 以上の至適生育温度を有する好熱性真菌はわずか 7 種である。したがって、本研究で用いた堆肥試料には好熱性真菌があまり存在しなかった可能性に加え、好熱性真菌の単離において 50°C 以上の培養温度は厳しい単離条件であると考えられた。

現在までに、微生物において様々な D-アミノ酸代謝に関わる酵素が知られている(23, 176)。このうち、真菌において報告されているものは DAAO, DDO, DSD, DNT, Alr および Srr である (Table 1)。そして、これらの 6 つの酵素のなかで、単離に用いた 4 種の D-アミノ酸を窒素源として利用するために機能しうる酵素は Alr (D-Ala の L-Ala への変換を触媒) と DAAO (D-Ala, D-Asn, D-Gln および D-His の酸化的脱アミノ反応を触媒) の 2 つのみである。D-Ala は多くの DAAO にとって良基質である、一方、D-Asn, D-Gln および D-His は既知 DAAO のなかでも広基質特異性として知られる常温性真菌由来である RgDAAO と TvDAAO にとって良基質であるが、基質特異性が狭い他の既知 DAAO にとっては貧基質であることが報告されている(38)。したがって、D-Asn, D-Gln および D-His を唯一の窒素源として良好に生育できる真菌は、発現量の差が影響する可能性はあるが、基質特異性が広い DAAO を有している可能性が高いと考えた。実際、広い基質特異性を有する DAAO (ReDAAO) を有する *R. emersonii* YA 株は、1 章で述べた狭い基質特異性を有する DAAO (TdDAAO) とほぼ同じ基質特異性を有すると考えられる *T. dupontii* PB 株および PE 株よりも D-Asn, D-Gln および D-His を単一窒素源とした培地で良好に生育したことからも支持された (Fig. 2-1)。今後、同様の手法で真菌から様々な基質特異性、例えば逆に特定の D-アミノ酸に対してのみ作用する DAAO などの取得が可能かもしれない。

R. emersonii YA 株は D-Gln と D-His をそれぞれ単一窒素源とした培地上で D-Ala を用いた場合よりも良好に生育したにもかかわらず、ReDAAO の D-Gln と D-His に対する活性は D-Ala に対する活性よりも低かった (Fig. 2-1, Table 2-2)。この原因は不明であるが、これら D-アミノ酸を唯一の窒素源として用いているため、単純に D-Gln と D-His には D-Ala よりも窒素原子が多く含まれていることによるかもしれない。また、真菌において DAAO は培養液中の D-アミノ酸の存在によりその発現が誘導され、D-アミノ酸の種類の違いにより発現レベルが異なることが報告されている

とから(177), YA 株において D-Ala よりも D-Gln と D-His において ReDAAO の発現レベルが高い可能性がある。しかし, D-アミノ酸による DAAO の誘導発現が解析されている全ての真菌において D-Ala が最もよいインデューサーであることが明らかにされていることから, 発現レベルの違いが原因である可能性は低いかもしれない(177-179)。また, YA 株の各 D-アミノ酸の取り込み能の違いも要因の一つである可能性もある。真菌において, D-アミノ酸の取り込みに関する解析は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で行われており, general amino-acid permease 1 (Gap1p) などの広基質特性アミノ酸トランスポーターがいくつかの D-アミノ酸の取り込みに関与することが報告されている(180)。しかし, D-アミノ酸種の違いによる取り込み能の違いは不明である。また, *R. emersonii* の基準株である CBS 393.64 株にも Gap1 ホモログ (Gene ID: T310_0539) が存在するが, アミノ酸の取り込みに関する解析はなされていないため, 各 D-アミノ酸種の違いによる取り込み能の違いが生育に与える影響は現在のところ不明である。

ReDAAO の酵素学的諸特性

触媒活性

ReDAAO は既知の常温性真菌由来で高い触媒活性を有する RgDAAO と TvDAAO と同等の比活性を有していた。低い触媒活性を有する pkDAAO を含む動物由来の DAAO は、活性部位を覆う“active-site lid”と呼ばれる 13 アミノ酸 (pkDAAO: Thr216–Tyr228) からなるループを有し、これが活性部位への基質の進入と生成物の放出に伴い開閉することが知られている(81) (Fig. 2-5, Fig. 2-13)。このコンフォメーション変化は遅いため、結果として active-site lid を有する動物由来の DAAO は代謝回転数 (k_{cat}) が小さくなると考えられている(181)。一方、真菌由来 RgDAAO の active-site lid は 9 アミノ酸からなり (Fig. 2-13)、pkDAAO のものより短いために開閉が速く、高い触媒活性を有すると考えられている(87)。ReDAAO 三次元構造モデルの active-site lid は RgDAAO と同様に短いことから、ReDAAO は高い触媒活性を有すると考えられる。

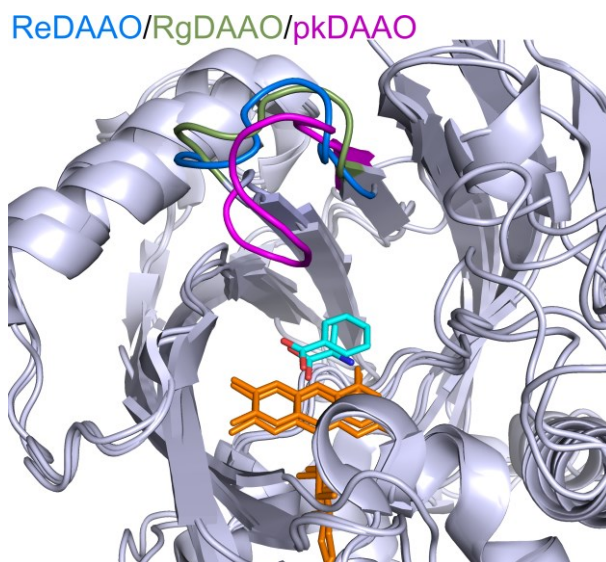


Fig. 2-13. ReDAAO, RgDAAO と pkDAAO の active-site lid の比較

ReDAAO の三次元構造モデル、RgDAAO の結晶構造 (PDB entry, 1C0P) および pkDAAO の結晶構造 (PDB entry, 1VE9) を重ね合わせた。ループの配色：青, ReDAAO；緑, RgDAAO；マゼンタ, pkDAAO。スティックの配色：赤, 酸素原子；青, 窒素原子；シアン, D-Ala または benzoate の炭素原子；橙, FAD。構造の描画と重ね合わせには PyMOL ver. 2.4 (<https://pymol.org>) を用いた。

基質特異性

ReDAAO は CPC を含む多様な D-アミノ酸に対して高い活性を示したが、同様に広い基質特異性を有する RgDAAO や TvDAAO とはいくつもの特異性の違いが観察された (Fig. 2-14). RgDAAO は嵩高い疎水性の D-Trp や D-Pro に対して中程度の活性を示すが、ReDAAO はこれら基質にあまり高い活性を示さなかった。一方、RgDAAO は D-Arg に対してほとんど活性を示さないが、ReDAAO は TvDAAO と同様に、中程度の活性を示した。また、ReDAAO は、RgDAAO と TvDAAO を含む既知の全ての DAAO がほとんど活性を示さない酸性の D-Glu に対しても高い活性を示した。D-Glu は本来 DDO の基質であることから、ReDAAO は DAAO と DDO の両方の活性を有する新規な DAAO であり、応用的利用において RgDAAO や TvDAAO より有用と考えられる。

真菌において DAAO や DDO は、D-アミノ酸の解毒酵素としての機能や D-アミノ酸の生育利用の役割を担っていることが報告されている(39)。恐らく、ReDAAO も YA 株において同様な機能を担っていると考えられる。近年、様々なバクテリアが、D-Leu, D-Met, D-Tyr や D-Trp など細胞壁 PG を構成する D-アミノ酸以外の D-アミノ酸を生産し、細胞壁リモデリングやバイオフィーム分散などの様々な機能を有していることが報告されている(2)。発酵堆肥には *Lactobacillus* 属や *Bacillus* 属を含む多様なバクテリアが存在するため(182)、ReDAAO は発酵堆肥に存在するバクテリアが生産した様々な D-アミノ酸を利用もしくは解毒するために広い基質特異性を有している可能性が考えられる。

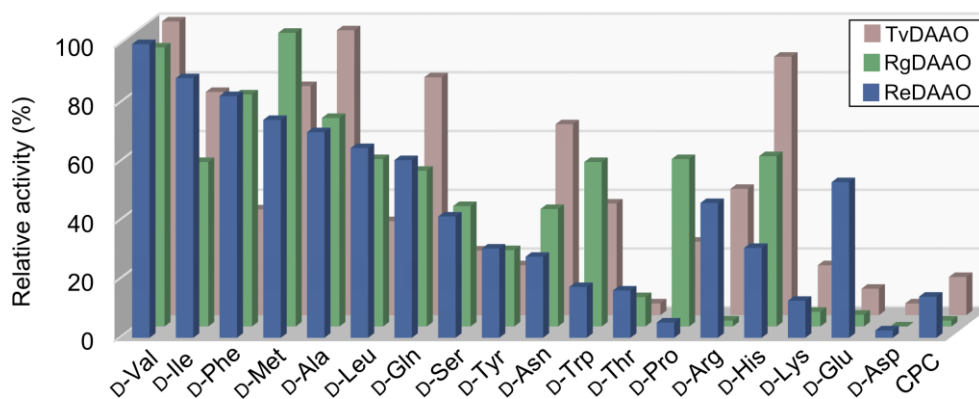


Fig. 2-14. ReDAAO と他の広基質特異性を有する DAAO の比較

ReDAAO において、1.5 mM D-Tyr と 1 mM cephalosporin C (CPC) を除く、各 20 mM D-アミノ酸を基質として 37°C, pH 8.0, 4-AA/HRP カップリング法によりオキシダーゼ活性を測定した。D-Val に対する比活性値 (79.2 U/mg) を 100%とした相対活性を示した。測定は 3 回行い、平均値を示した RgDAAO と TvDAAO においては Tishkov らのデータ(38)を用いた。

既知の DAAO と DDO において、FAD のイソアロキサジン環が位置する活性部位の上部に存在する active-site lid やアミノ酸残基がその基質特異性に関与することが明らかとなっている (50, 183). RgDAAO において、Met213 を Arg 残基に置換したバリエントが野生型では活性を示さない D-Asp に対して活性を示すことが報告されている (183). ReDAAO において、RgDAAO の Met213 に対応するアミノ酸残基を確認したところ、一次構造上では Ile232 であったが、三次構造モデルでは Ser233 が存在した (Fig. 2-5, Fig. 2-15b). したがって、ReDAAO において Ser233 残基の側鎖のヒドロキシ基が D-Glu の側鎖カルボキシ基と水素結合を形成することで D-Glu に対する活性に寄与する可能性が示唆された. また、hDDO, mDDO および ChDDO では、活性部位上部に位置する Arg 残基が基質側鎖のカルボキシ基と塩橋を形成することで酸性 D-アミノ酸に対する触媒活性を付与していることが知られている (Fig. 2-15c, ChDDO:Arg243). そこで、ReDAAO 三次元構造モデルの活性部位の上部に位置する Arg 残基を確認したところ、空間的に対応する位置に Arg97 が存在した (Fig. 2-15a). 一方、RgDAAO の結晶構造において、ReDAAO の Arg97 に空間的に対応するアミノ酸残基は Gln98 であった (Fig. 2-15b). したがって、ReDAAO において Ser233 もしくは Arg97 もしくは両アミノ酸残基が ReDAAO の D-Glu に対する活性に寄与すると考えられた.

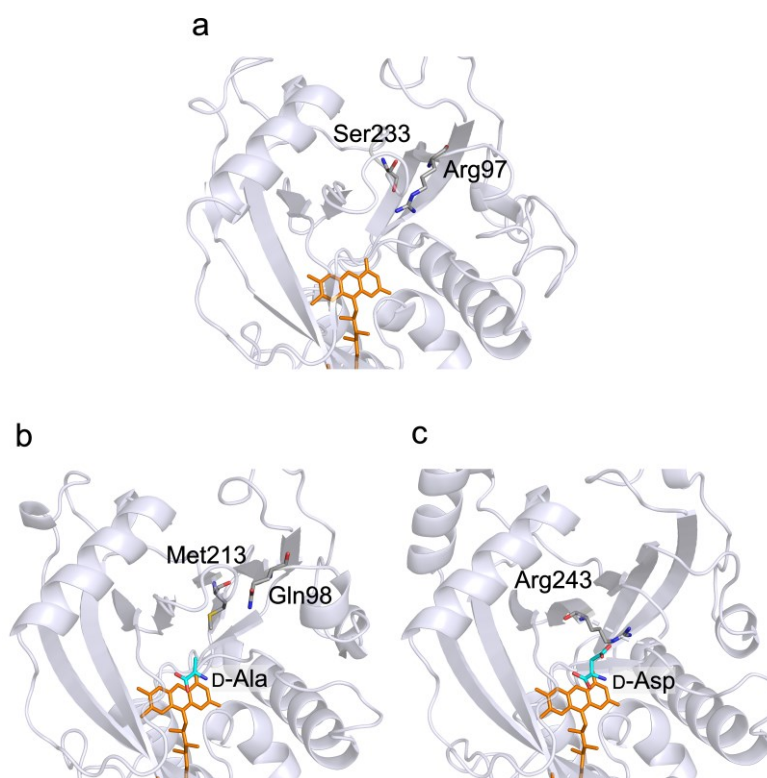


Fig. 2-15. ReDAAO の酸性 D-アミノ酸に対する活性に寄与するアミノ酸残基

(a) ReDAAO モデル構造, (b) RgDAAO (PDB entry: 1C0P) および (c) ChDDO 結晶構造の活性部位. ReDAAO の三次元構造モデルは I-TASSER On-line Server (zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/) を用いて構築した. RgDAAO の結晶構造は PDB entry 1C0P を用いた. 配色: 灰, 炭素原子; 赤, 酸素原子; 青, 窒素原子; シアン, 炭素原子 (D-アミノ酸); 黄, 硫黄原子; 橙, FAD. 構造の描画には PyMOL ver. 2.4 (<https://pymol.org>) を用いた.

ReDAAO は様々な D-アミノ酸に対して活性を示したが、特に疎水性の D-アミノ酸に対して高い活性を示した (Table 2-2). hDAAO も疎水性の D-アミノ酸に対して高い活性を示すが、これは主に基質結合部位の Leu51, Leu215, Tyr228 および Ile230 によって形成される疎水性領域の疎水性 D-アミノ酸側鎖とのファンデルワールス相互作用と疎水性相互作用によると考えられている (Fig. 2-16b) (67). ReDAAO のモデル構造において、hDAAO のこれら疎水性アミノ酸残基に対応する位置には、それぞれ Asn53, Ser233, Tyr244 および Met246 が存在した (Fig. 2-16a). 加えて、ReDAAO においては、疎水性アミノ酸残基でない Asn53 と Ser233 が活性部位に含まれていたが、Asn53 の近傍には疎水性アミノ酸残基である Tyr54, Leu55, Pro56 および Val57 が存在した。また、Ser233 の近傍にも Val94 と Phe144 が存在した。したがって、ReDAAO においても、hDAAO と同様に、基質側鎖が配置する近傍に疎水性領域が存在することで、疎水性 D-アミノ酸に高い活性を示すと考えられた。

D-Thr と D-Val, D-Asn と D-Leu は構造的に同程度の大きさであるが、ReDAAO は、D-Thr よりも疎水性度が高い D-Val に、D-Asn よりも疎水性度が高い D-Leu や D-Ile に高い活性を示した (Table 2-2). このことから、基質側鎖との疎水性相互作用が活性に重要な因子と考えられた。加えて、ReDAAO は D-Thr と D-Ile のジアステレオマーである D-allo-Thr と D-allo-Ile に対してそれぞれ D-Thr と D-Ile と大きく異なる活性を示したことから (Table 2-2), 基質側鎖の形状や向きも基質特異性に関わる重要な因子であると考えられた。また、pkDAAO において、Tyr55 は Tyr224, Tyr228 および Tyr314 残基とともに基質の活性部位への進入を制御すると考えられており、Tyr55 を Ala 残基に置換したバリエーションは、基質の活性部位へのアクセスの改善により、嵩高い D-Trp に対して野生型よりも高い活性を示すようになることが報告されている (Fig. 2-16c) (184). ReDAAO のモデル構造において、pkDAAO の Tyr55 に対応する位置には、構造的に小さな Val57 が存在したことから (Fig. 2-16), これが ReDAAO の広基質特異性の要因の一つと考えられた。しかし、ReDAAO の D-Trp に対する活性は低く、また同位置に Tyr と同程度の大きさの Phe 残基を有する RgDAAO は D-Trp に対して中程度の活性を有することから、より詳細な考察のためには、ReDAAO の結晶構造を明らかにする必要があると考えられた。

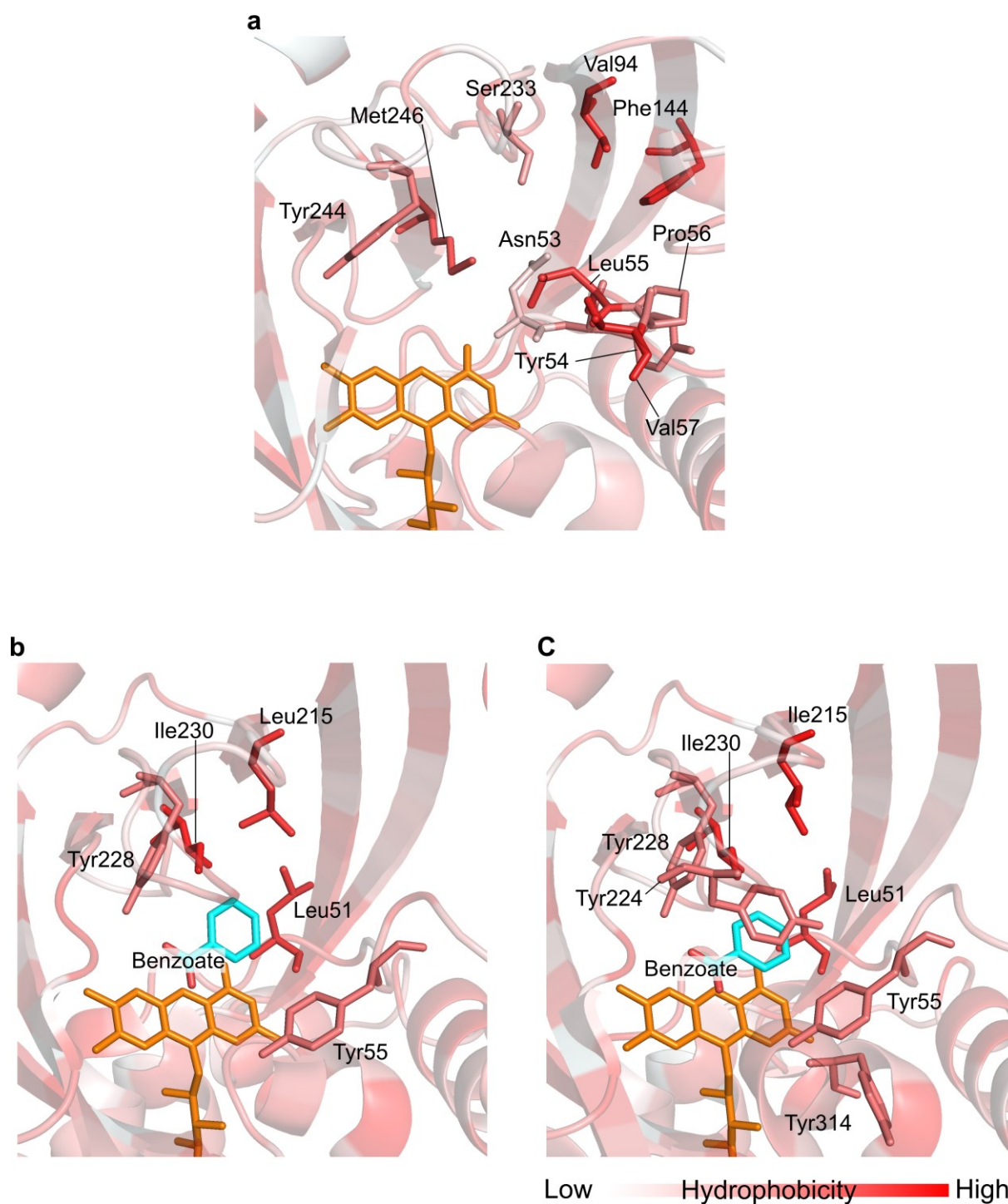


Fig. 2-16. ReDAAO の疎水性 D-アミノ酸に対する活性に寄与するアミノ酸残基

(a) ReDAAO モデル構造と (b) hDAAO および (c) pkDAAO の結晶構造の活性部位. ReDAAO のモデル構造は I-TASSER On-line Server (<https://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) を用いて構築した. hDAAO と pkDAAO の結晶構造は PDB entry 2DU8 と 1VE9 を用いた. 配色: シアン, 炭素原子 (benzoate); 赤, 酸素原子 (benzoate); 橙, FAD. 赤色のグラデーションはアミノ酸残基の疎水性の高低を示す. PyMOL ver. 2.4 (<https://pymol.org>) を用いて作図した.

ReDAAO は TdDAAO に対して極めて高いアミノ酸配列同一性を有するが (Table 2-1), ReDAAO と TdDAAO の基質特異性は大きく異なっていた (Table 2-2). そこで, この基質特性の相違を引き起こす構造的な知見を得るため, ReDAAO と TdDAAO のアミノ酸配列をアライメントしたところ, ReDAAO に存在し TdDAAO には存在しない領域 (ReDAAO, Lys300–Asp304 : KQRRD 配列) と ReDAAO には存在せず TdDAAO に存在する領域 (TdDAAO, Tyr57–Gly61 : YVLQG 配列) が見出された (Fig. 2-17a). 両 DAAO の三次元構造モデルでこれら領域の存在位置を確認したところ, KQRRD 配列は ReDAAO の活性部位から大きく離れた C 末端のループ上に, YVLQG 配列は TdDAAO の活性部位近傍のループ上に存在した (Fig. 2-17b). したがって, 活性部位近傍に存在した YVLQG 配列の有無が ReDAAO と TdDAAO の基質特異性の相違に寄与する可能性が高いと考えられた. しかし, 三次元構造モデルは実際のタンパク質構造とは異なる可能性があるため, この可能性を明らかにするためには結晶構造解析と生化学的な解析が必要と考えられた. その詳細については次章で述べる.

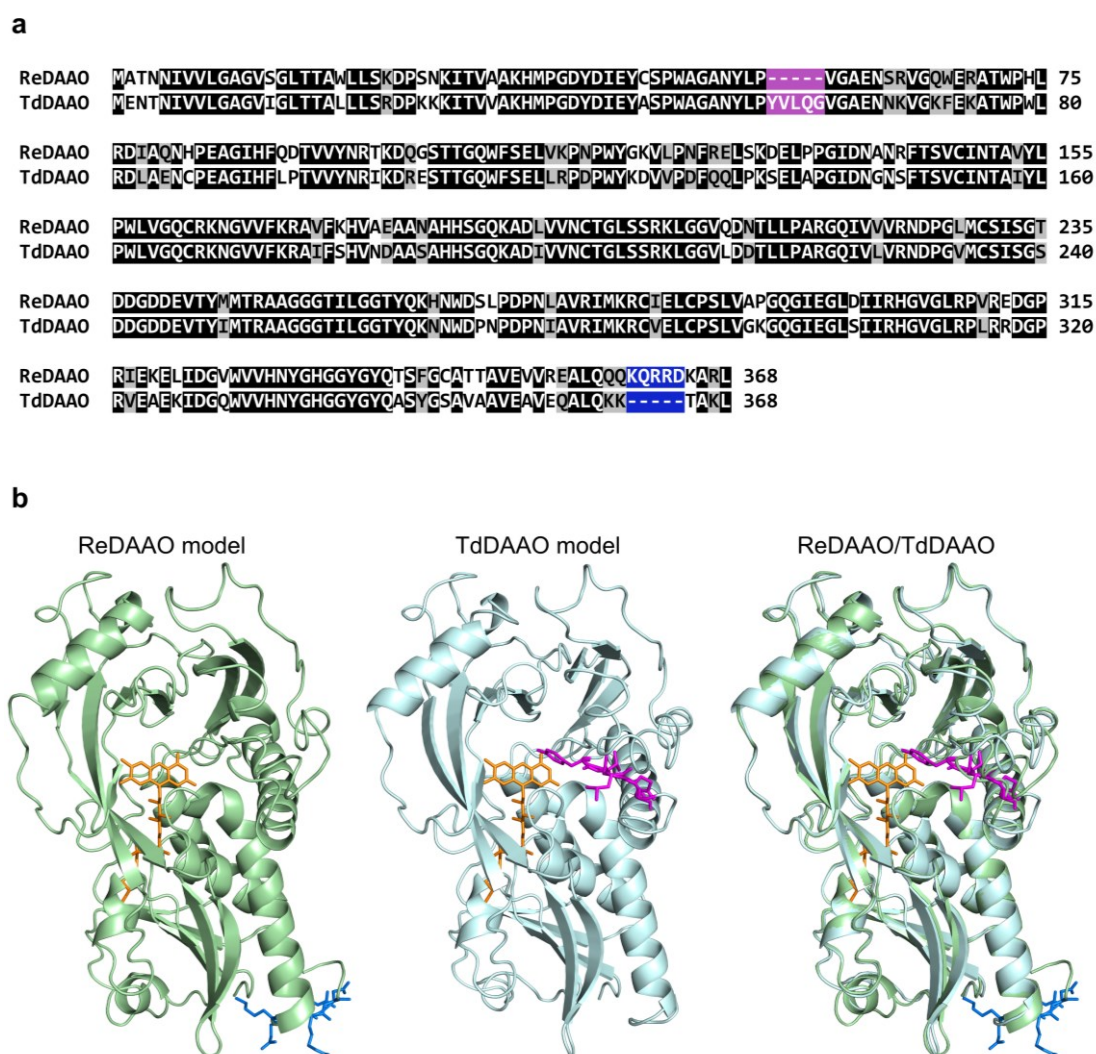


Fig. 2-17. ReDAAO と TdDAAO の一次構造上の相違領域と三次元構造モデルにおけるその位置

(a) RgDAAO と TdDAAO の一次構造の比較. 青塗りは ReDAAO に特異的な連続したアミノ酸残基(Lys300–Asp304: KQRRD)を示す. マゼンタ塗りは TdDAAO に特異的な連続したアミノ酸残基 (Tyr57–Gly61: YVLQG)を示す. アライメントには *T-COFFEE server* (<http://tcoffee.crg.cat/>)を用いた. (b) ReDAAO と TdDAAO の三次構造の比較. 順に ReDAAO の三次元構造モデル, TdDAAO の三次元構造モデル, ReDAAO と TdDAAO の重ね合わせ図を示す. スティックの配色: 青, KQRRD; マゼンタ, YVLQG. モデル構造の構築には I-TASSER On-line Server (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)を用いた. モデル構造の描画と重ね合わせには *PyMOL ver. 2.4* (<https://pymol.org>)を用いた.

酵素反応速度論

ReDAAO は種々の D-アミノ酸のなかでも, 至適温度において D-Met に対して最も高い $k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ を示し, 次いで, D-Val に対して高い $k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ を示し, また, 構造の小さい疎水性の D-Ala に対しても比較的高い $k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ を示した (Table 2-3). 広基質特異性を有する RgDAAO や TvDAAO も, D-Met に対して最も高い $k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ を示すことから (Table 2-5) (183, 185), 真菌 DAAO の多くが D-Met を最良基質とすることが分かった. 一方, ReDAAO の D-Val に対する $k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ は, RgDAAO と TvDAAO の D-Val に対する $k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ よりも 50–60 倍高かった. これは主に ReDAAO の D-Val に対する低い K_{m} に起因した (Table 2-5). したがって, ReDAAO は D-Val に対する基質親和性が他の真菌 DAAO よりも非常に強いことから, RgDAAO や TvDAAO より, D-Val に対して良好に反応すると考えられた. また, ReDAAO の D-Ala に対する $k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ は, RgDAAO と TvDAAO のそれぞれ 1/1.5 と 11 倍であった (Table 2-5). この相違は主に, ReDAAO の D-Ala に対する K_{m} が RgDAAO よりも大きく, TvDAAO よりも小さいことに起因した. しかし, k_{cat} が他の真菌 DAAO の約 2 倍高いことから, 実際の反応系では, ReDAAO の D-Ala に対する反応性が真菌 DAAO のなかで最も高いと考えられた. 一方, ReDAAO の塩基性の D-Arg に対する $k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ は中性 D-アミノ酸のものよりも低かった (Table 2-3). この様な塩基性 D-アミノ酸に対する低い反応速度特性は他の DAAO でも観察されており (Table 2-5), 塩基性 D-アミノ酸に対する低い親和性と, 活性部位に塩基性側鎖の正電荷が存在することによる活性部位の熱力学的不安定性に起因すると考えられていることから, ReDAAO の D-Arg に対する低い触媒能もこれらが原因と考えられる (186).

ReDAAO の D-Glu に対する $k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ は RgDAAO の約 520 倍と高く, DAAO であるにもかかわらず D-Glu を良好の基質とした (Table 2-5). これは, D-Glu に対する高い k_{cat} と低い K_{m} の両方に起因した. ReDAAO の D-Glu に対する k_{cat} と K_{m} は, 他の DAAO のみならず, 多くの DDO のものよりも高いことから, ReDAAO は DAAO であるのにもかかわらず, 多くの DDO よりも D-Glu に対する優れた触媒能を有することが分かった. 前述したように, ReDAAO の D-Glu に対する優れた触媒能は, ReDAAO に特異的に存在する Arg97 と Ser233 が要因であると考えられるため, 部位特異的変異導入によりバリエーションを作製し, 更なる解析を検討することにした. 詳細については次章で述べる.

Table 2-5. 各 DAAO と DDO の酵素反応速度論的パラメーターの比較

D-Met	k_{cat} (s^{-1})	/ReDAAO	K_{m} (mM)	/ReDAAO	$k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	/ReDAAO
ReDAAO	120	—	0.213	—	562,000	—
RgDAAO ^a	76.7	1/1.6	0.200	1/1.1	381,000	1/1.5
TvDAAO ^b	80.5	1/1.5	0.460	2.2	175,000	1/3.2
D-Val	k_{cat} (s^{-1})	/ReDAAO	K_{m} (mM)	/ReDAAO	$k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	/ReDAAO
ReDAAO	225	—	0.628	—	358,000	—
RgDAAO ^c	131	1/1.7	18.9	30	6,930	1/52
TvDAAO ^b	85.3	1/2.6	14.4	23	5,920	1/60
D-Ala	k_{cat} (s^{-1})	/ReDAAO	K_{m} (mM)	/ReDAAO	$k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	/ReDAAO
ReDAAO	189	—	2.70	—	69,900	—
RgDAAO ^b	83.3	1/2.3	0.800	1/3.3	104,000	1.5
TvDAAO ^c	109	1/1.7	16.7	6.2	6,530	1/11
D-Arg	k_{cat} (s^{-1})	/ReDAAO	K_{m} (mM)	/ReDAAO	$k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	/ReDAAO
ReDAAO	45.6	—	19.2	—	2,380	—
RgDAAO ^d	20.0	1/2.3	18.0	1/1.1	1,110	1/2.1
D-Glu	k_{cat} (s^{-1})	/ReDAAO	K_{m} (mM)	/ReDAAO	$k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	/ReDAAO
ReDAAO	90.7	—	12.1	—	7,500	—
RgDAAO ^a	1.00	1/91	70.0	5.8	14.3	1/520
RgDAAO M213R ^a	16.3	1/5.6	33.0	2.7	494	1/15
TdDDO	217	2.4	2.16	1/5.6	100,000	13
CbDDO ^e	60.0	1/1.5	20.1	1.7	2,980	1/2.5
ChDDO ^f	2.00	1/45	62.6	5.2	25.0	1/300
hDDO ^g	5.54	1/16.0	40.0	3.3	139	1/54
CeDDO-1 ^h	35.4	1/2.6	1.06	1/11	33,400	4.5

^a は Sacchi らのデータ(183), ^b は Komarova らのデータ(185), ^c は Pollegioni らのデータ(187), ^d は Boselli らのデータ(83), ^e は Fukunaga らのデータ(60), ^f は Takahashi らのデータ(58), ^g は Katane らのデータ(82), ^h は Katane らのデータ(53)を用いた。

pH 特性と温度特性, 耐熱性

ReDAAO の至適 pH は 8.0 であった (Fig. 2-11a). 既知の多くの DAAO の至適 pH も 8.0–10 の間にある (45, 48, 188). これは, D-アミノ酸が活性部位に結合した時, 基質 α -アミノ基のプロトンが解離することで活性部位における電荷が喪失し, それにより活性部位の実効電荷が喪失して熱力学的に安定化し, その結果基質から FAD へのヒドリド転移が促進されるため, 基質 α -アミノ基のプロトンが解離しやすい塩基性領域に至適 pH を有すると考えられている (189). したがって, ReDAAO においても同様なメカニズムが作用し, 塩基性領域に至適 pH を有すると考えられる. また, ReDAAO は中性から弱塩基性領域の pH で安定であった (Fig. 2-11b). RgDAAO や TvDAAO を含む, 既知の DAAO も同様の pH 領域で安定であることが報告されているため, ReDAAO は既知の DAAO と同等の pH 安定性を有すると考えられた (48, 190).

ReDAAO の T_{opt} (至適温度) は 55°C であったが (Fig. 2-12a), これは宿主である *R. emersonii* の生育至適温度である 45–50°C よりも高く, 生育上限温度である 55°C と一致した (143). また, ReDAAO の T_{opt} は好熱細菌由来の RxDAAO の T_{opt} (65°C) よりも低かったが, 動物由来の pkDAAO や常温性真菌由来の RgDAAO よりも 10–15°C 高く, 好熱性真菌由来の TdDDO と同等であることが明らかとなった (45, 46, 49). 高い T_{opt} を有する耐熱性酵素は応用的利用において様々な利点がある (191, 192). 例えば, i) 酵素が失活し難い, ii) 酵素の調製が容易, iii) 反応リアクターを高温にできるため中温性微生物による汚染を防止できる, iv) 高温により基質と生成物の溶解度の上昇や粘度の低下により生産性が向上するなどが挙げられる. したがって, ReDAAO は応用的利用において有用と考えられる.

ReDAAO のタンパク質濃度が 0.1 mg/ml の時の T_{50}^{60} (初期活性の 50% が失われる 60 min の保温温度) は約 60°C であった (Fig. 2-12b). これは既知の DAAO において最も高い耐熱性を有する RxDAAO のもの (64°C) よりも低かったが, 応用的に有用とされている高い触媒活性と広い基質特異性を有する RgDAAO (39°C) と TvDAAO (54°C) のものよりも有意に高かった (38, 45, 48). なお, RgDAAO と TvDAAO の T_{50} は, ReDAAO よりも高いタンパク質濃度かつ短い保温時間で測定されているため, 実際の耐熱性の差はより大きいと考えられる. したがって, ReDAAO は既知の真核生物由来 DAAO のなかで最も高い耐熱性を有し, 応用的利用に有用であることが明らかとなった. 結晶構造が解析されている RgDAAO は head-to-tail 型, pkDAAO と hDAAO は head-to-head 型の二量体を形成している (37, 47, 193, 194). また, TvDAAO も RgDAAO と同様に head-to-tail 型の二量体を形成することがバリエーションの結晶構造解析 (構造データ未登録) から明らかにされている (92). 一方, ReDAAO はゲル濾過クロマトグラフィーによる解析により, 四量体を形成することが示された (Fig. 2-10). 一般的に, 好熱性微生物由来の高い耐熱性を有する酵素は, 常温性生物由来の酵素よりもより高次の多量体を形成し, その耐熱性に寄与することが知られている (195). したがって, ReDAAO においても四量体の形成がその高い耐熱性に寄与すると考えられ,

結晶構造解析によりその四量体形成様式を明らかにする必要があると考えられた。

二量体である RgDAAO と TvDAAO において、タンパク質濃度の低下 (0.15 から 0.05 mg/ml) に伴う耐熱性の有意な低下が観察され、サブユニットの解離が DAAO の熱変性を促す要因の一つと考えられている (92, 166, 196)。しかし、ReDAAO では、タンパク質濃度の低下に伴う耐熱性の低下は RgDAAO と TvDAAO に比べてわずかであった (Fig. 2-12c)。したがって、ReDAAO のサブユニット相互作用は RgDAAO や TvDAAO よりも解離しづらいと考えられた。また、FAD の添加により ReDAAO のタンパク質濃度低下に伴う安定性の低下がわずかに緩和されることが明らかとなった (Fig. 2-12)。TvDAAO では、遊離 FAD が存在することで、タンパク質に結合している FAD の解離が妨げられ安定化すると考えられている (126)。したがって、ReDAAO においても同様のメカニズムによって安定化がもたらされたと考えられる。また、FAD 添加による安定化効果があまりなかったことから、ReDAAO からの FAD の解離は少なく、強固に結合していると考えられた。

4. 材料と方法

試薬

試薬は特記しない場合、Nacalai tesque, Merk, Takarabio, Toyobo または Fujifilm Wako から購入した。D-Ile と D-Tyr はペプチド研究所から購入し、D-Asp は田辺製薬から寄贈されたものを用いた。オリゴヌクレオチドは、Eurofins Genomics から購入した。

供試菌、プラスミドおよび培地

DNA 組換えの宿主として *E. coli* DH5 α を、遺伝子発現の宿主として、*E. coli* BL21(DE3) pLysS を用いた。*E. coli* の培養には、LB (lysogeny broth) 液体培地 (5 g/l yeast extract, 10 g/l tryptone, 5 g/l NaCl, pH 7.0) を用いた。LB 寒天培地には精製寒天粉末を終濃度 15 g/l となるように添加した。抗生物質を添加する場合、終濃度が 100 μ g/ml となるように ampicillin を添加し培地名に“A”を付記し、また、終濃度が 34 μ g/ml となるように chloramphenicol を添加し培地名に“C”を付記した。

好熱性真菌の単離

6 種類の市販の発酵堆肥 (牛糞発酵堆肥 2 種、鶏糞発酵堆肥 1 種、バーク発酵堆肥 2 種、馬糞発酵堆肥 1 種) を 1 g ずつ 50 ml コニカルチューブに量りとり、生理食塩水 (0.9% NaCl) 10 ml を用いてそれぞれの懸濁液を調製した。懸濁液 100 μ l を終濃度 0.5 g/l chloramphenicol と 0.05 g/l gentamicin を含む potato dextrose agar (PDA) 培地に塗布し、50°C で 2 週間培養した。培養後、生育が観察された糸状菌を新たな PDA 培地上で 1 週間分離培養した。単離した好熱性真菌は使用するまで PDA 培地上で 4°C で保存し、1 ヶ月毎に継代培養 (PDA 培地で 50°C で 1 週間) した。

単離した好熱性真菌の D-アミノ酸資化能の確認

PDA 培地で 50°C、1 週間培養した好熱性真菌の菌糸を白金耳で掻き取り、0.5 g/l chloramphenicol, 0.05 g/l gentamicin, 炭素源として 1.5% glucose, 窒素源として 50 mM D-Ala, D-Asn, D-Gln もしくは D-His を含む Yeast Nitrogen Base without Amino Acids and Ammonium Sulfate (YNB) (Becton, Dickinson and Company) 培地に接種し、50°C で 1 週間培養し、生育を経日観察した。

ゲノム DNA の調製

単離した好熱性真菌のゲノム DNA は、以下に示す Yu らの方法に従って調製した⁽¹⁷¹⁾。PDA 培地で 50°C、1 週間培養した好熱性真菌の菌糸を掻き取り、2 ml スクリューキャップチューブに移した。Braking buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) を 500 μ l, ϕ 0.45 mm ガラスビーズを 300 μ l, phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) 500 μ l を加え、細胞破砕機 Mini-BeadBeater-8 (Bio Spec Products) を用いて、最大スピードでホモジナイズした。ホモジネートを遠心 (16,000 \times g, 10 min) し、上清を 1.5 ml 微量遠心チューブに移した。エタノール沈殿で DNA を回収し、10 μ g/ml RNaseA を含む TE buffer (pH 8.0) 50 μ l に溶解しゲノム溶液とした。

ITS : Internal Transcribed Spacer 領域の単離と塩基配列解析

YA 株, PB 株および PE 株のゲノム DNA を鋳型とし、ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') と ITS4 (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') を用いて, The Gflex DNA Polymerase により ITS 領域を PCR 増幅 (94°C で 1 min の後, 98°C で 10 sec, 55°C で 15 sec, 68°C で 1 min を 1 サイクルとして 30 サイクル反応; Veriti 200 (Applied Biosystems)) した. 増幅産物を pGEM-T Easy vector (Promega) に導入し, *E. coli* DH5 α を用いてクローニングし, 塩基配列を解析 (Eurofins genomics) した(197). 得られた YA 株の ITS 領域配列を GenBank に登録した (accession no.: LC436776).

分子系統解析

単離した ITS 領域を Query 配列とし, NCBI の BLAST を用いてホモロジー検索を行った. *T-COFFEE server* (Swiss Institute of Bioinformatics) を用いて他の糸状菌の ITS 領域配列とマルチプルアライメントし, さらに, Gblocks Server version 0.91b (Castresana Lab) を用いてトリミング処理をした. 系統樹は MEGA 7.0 の Maximum likelihood 法を用いて構築した.

Rasamsonia emersonii CBS 393.64 基準株における *DAAO* ホモログ遺伝子の探索

RgDAAO および TvDAAO のアミノ酸配列を query 配列として, 真菌ゲノムデータベース Ensembl Fungi (EMBL-EBI) において, YA 株と同種でありゲノム配列が明らかな *Rasamsonia emersonii* CBS 393.64 株に対して BLAST によるホモロジー検索し, *R. emersonii* CBS 393.64 株における *DAAO* ホモログ遺伝子を探索した. 得られた *DAAO* ホモログ遺伝子のアミノ酸配列と, 既知の真菌 DAAO および DDO アミノ酸配列を用い, *T-COFFEE server* を用いてマルチプルアライメントを行った.

Rasamsonia emersonii YA 株の *DAAO* ホモログ遺伝子の単離

R. emersonii YA 株のゲノム DNA を鋳型とし, *R. emersonii* CBS 393.64 株 *DAAO* ホモログ遺伝子の 5' と 3' 末端に相補的なプライマー (ReDAAO-F (5'-ATGGCAACCAATAACATCG-3') と ReDAAO-R (5'-TTACAGCCTCGCCTCTCC-3')) を用いて, The Gflex DNA Polymerase により YA 株の *DAAO* ホモログ遺伝子を PCR 増幅 (94°C で 1 min の後, 98°C で 10 sec, 60°C で 15 sec, 68°C で 42 sec を 1 サイクルとして 30 サイクル反応; Veriti 200) した. 増幅産物を pGEM-T Easy vector に導入し, *E. coli* DH5 α を用いてクローニングし, 塩基配列を解析 (Eurofins genomics) した.

ReDAAO 遺伝子 *E. coli* 発現ベクターの構築

pET15b に *E. coli* のコドン使用頻度を基にコドンを改変した *ReDAAO* 遺伝子が組み込まれた *ReDAAO* 遺伝子 *E. coli* 発現ベクター (pET15b-*ReDAAO*) は, GenScript 社に委託して作成した.

E. coli の形質転換

pET15b-*ReDAAO* を含む DNA 溶液 1 μ l を 20 μ l の *E. coli* BL21 (DE3) pLysS に添加して, 氷上で 30 min 静置した. その後, 42°C で 45 s 保温して, 氷上で 2 min 静置した後, SOC 培地を 500 μ l 添加して, 37°C で 1 h 振盪培養し, LBACG 寒天培地に 50 μ l 添塗り 37°C で一晩培養した.

LB 培地における *ReDAAO* 遺伝子発現条件の検討

pET15b-*ReDAAO* を導入した *E. coli* BL21 (DE3) pLysS を 10 ml の LBACG 液体培地で前培養 (30°C, 169 rpm,

16 h) した。次に、前培養液 50 μ l を 10 ml の LBAC 液体培地を入れた試験管に接種し、振盪培養 (37°C, 200 rpm) した。OD₆₀₀ が 0.3 に達した時に isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 1 mM となるように培養液に添加し、5 h 培養した。培養液の OD₆₀₀ を 1 h ごとに分光光度計 UV-1800 (SHIMADSU) を用いて測定した。培養液を遠心 (4°C, 3,000 \times g, 15 min) して菌体を回収し、使用するまで -30°C で保存した。

***E. coli* 粗抽出液の調製**

保存していた菌体を 5 倍量の 20 ml の平衡化 buffer (50 mM KH₂PO₄, 300 mM NaCl, 5% glycerol, pH 8.0) で懸濁した後、ソニケーター Ultrasonic Disruptor UD-201 (Tomy) を用いて超音波破碎 (output 3, duty cycle 50 : 破碎 30 s, 氷上 30 s, 15 サイクル) した。破碎後、遠心 (4°C, 20,000 \times g, 20 min) して得られた上清を Minisart Single use filter ϕ 0.2 μ m (Sartorius) を用いてフィルターろ過し、粗抽出液とした。

金属アフィニティークロマトグラフィーによる精製

粗抽出液に 10 mM となるように imidazole を添加し、平衡化 buffer で平衡化した His TALON Superflow Cartridge (Clontech) に全量供した。その後、洗浄 buffer (30 mM imidazole, 50 mM KH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0) 25 ml でカラムを洗浄し、溶出 buffer (150 mM imidazole, 50 mM KH₂PO₄, 300 mM NaCl, 5% glycerol, pH 8.0) 10 ml でカラムに結合したタンパク質を溶出した。

Imidazole 溶出画分の濃縮

溶出画分を遠心式ろ過ユニット Amicon Ultra Centrifugal Filters Ultracel 10 K, Regenerated Cellulose 10,000 MWCO (Merk) により濃縮した。

濃縮 imidazole 溶出画分の透析

濃縮した imidazole 溶出画分を微量透析器 透くん (NIPPON Genetics) を用いて透析 buffer (50 mM KPi, 5% glycerol, pH 8.0) 500 ml に対して 3 h 透析した後、透析 buffer を交換し、再度 12 h 透析した。透析後のタンパク質溶液を遠心 (4°C, 20,000 \times g, 30 min) して変性タンパク質を除去し精製酵素とした。精製酵素は使用するまで -80°C で保存した。

タンパク質濃度測定

タンパク質濃度は、Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad) を用いて添付のプロトコルに従い Bradford 法により測定した。標準タンパク質と酵素試料の吸光度を 2 点ずつ、マイクロプレートリーダー SpectraMax Paradigm (Molecular Devices) を用いて測定し、検量線は 0–0.5 mg/ml BSA を用いて作成した。

SDS-PAGE 解析

SDS-PAGE 解析は、ラビタス・ミニスラブ電気泳動装置 (Atto), 12.5% e-PAGEL (Atto) を用いて、Laemmli 法により行った。タンパク質マーカーとして Fluorescent Protein Molecular Weight Marker for SDS-PAGE (EZBiolab) を用いた。泳動後のタンパク質は LED トランスイルミネーター ゲルみえーる (Fujifilm Wako) を用いて可視化し、デジタルカメラ COOLPIX P7800 (Nikon) で撮影した。

四次構造解析

ReDAAO の四次構造は AKTAprius plus (GE Healthcare) に接続したカラム Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより解析した。カラム洗浄には孔径 0.22 μm の Vacuum Driven Disposable Filtration System (Millipore) により濾過し、脱気した milliQ 水を用いた。カラムの平衡化には同様に濾過・脱気した 150 mM NaCl と 5% glycerol を含む 50 mM KPi buffer (pH 8.0) を用いた。カラムを平衡化 (流速 0.2 ml/min, 4 h) した後、タンパク質濃度 0.1 または 0.01 mg/ml の ReDAAO 溶液を流速 0.2 ml/min でカラムに供した。ReDAAO の分子質量は、標準タンパク質 catalase (232 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumin (75.0 kDa), chymotrypsinogen A (25.0 kDa) および ribonuclease A (13.7 kDa) (GE Healthcare) を用いて算出した。

4-Aminoantipyrine–horseradish peroxidase (4-AA/HRP) カップリング法

DAAO 反応によって生じる H_2O_2 を 4-aminoantipyrine (4-AA) と horseradish peroxidase (HRP) によるカップリング反応により検出することで活性を測定した。具体的には基質 D-アミノ酸、終濃度 20 μM FAD, 1.5 mM 4-AA, 2 mM phenol および 2.5 U/ml HRP を含む 50 mM KPi buffer (pH 8.0) を 37°C で 5 min 保温した後、*E. coli* 粗抽出液または精製酵素溶液を添加して反応を開始した。活性は反応により生成するキノンイミン色素を波長 505 nm ($\epsilon = 6,580 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) で UV-1800 または SpectraMax Paradigm を用いて継続的にモニタリングすることで算出した。なお、コントロールとして、基質を含まない反応液も同様に調製し、基質を含む反応液で得られた活性値からコントロールの活性値を引いた値を活性値とした。1 min 当たりに 1 μmol の基質を代謝する酵素量を 1 U と定義した。

2, 4-Dinitrophenylhydrazine (2, 4-DNPH) 法

基質 20 mM D-Val と 20 μM FAD を含む 50 mM KPi buffer (pH 8.0) 950 μl を各温度で 5 min 保温した後、50 μl の酵素溶液を添加して各温度で 1.5 min 反応させ、400 μl の 25% trichloroacetic acid を添加して反応を停止した。反応液を遠心 (3,500 rpm, 10 min) し、上清を 500 μl 回収した後、0.1% 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) を含む 2 M HCl 溶液 100 μl を添加し、37°C で 15 min 反応させた。反応後、3.75 M NaOH 溶液 400 μl を添加し、室温で 15 min 静置した後、波長 430 nm における吸光度を SpectraMax Paradigm を用いて測定した。DAAO 活性は、吸光度 430 nm における ketovaline hydrazone のモル吸光係数 ($\epsilon=15,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を用いて算出した。1 min 当たりに 1 μmol の D-Val を代謝する酵素量を 1 U とした。

基質特異性解析

20 mM D-アミノ酸 (D-Tyr は 1.5 mM) と、1 mM cephalosporin C (CPC) zinc salt (Sigma-Aldrich) を基質として用い、37°C で 4-AA/HRP カップリング法により DAAO 活性を測定し、相対活性を算出した。CPC に対する DAAO 活性の測定は、CPC を 2 mM となるように 500 mM NaCl (pH 2.5) に溶解したものを基質溶液として用いた。また、CPC に対する相対活性は、D-Val を 40 mM となるように 500 mM NaCl (pH 2.5) に溶解したものを基質溶液として用いて測定した DAAO 活性を 100% として算出した。

酵素反応速度論のパラメーター解析

0.1–100 mM D-Ala, D-Arg, D-Glu, D-Met および D-Val を基質として用い、55°C で 4-AA/HRP カップリング法により DAAO 活性を測定した。最大反応速度 (V_{max}) とミカエリス定数 (K_m) の算出には、データ解析ソフトウェア Sigma Plot 12.5 (Hulink) の酵素反応速度分析モジュールを用い、ミカエリス-メンテンの式を基にした非線形回

帰分析によるカーブフィッティングから算出した。分子活性 (k_{cat}) 値は、 V_{max} 値と His タグ融合 ReDAAO の推定分子量 42,438 から算出した。

三次元構造モデルの作製

ReDAAO の三次元構造モデルは I-TASSER On-line Server (zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) を用いて作製した。

スペクトル解析

20 μ M ReDAAO 溶液 (0.85 mg/ml) の波長 250 - 600 nm における吸収スペクトルを、ブラック石英セルと UV-1800 を用いて測定した。還元型 FAD を有する ReDAAO の吸収スペクトルは、同様の 20 μ M ReDAAO 溶液に D-Ile を終濃度 50 mM になるように添加し、40°C で 10 min 保温した後に、同様の波長範囲で測定した。なお、コントロールには 50 mM KPi buffer (pH 8.0) を用いた。

薄層クロマトグラフィー (TLC) 解析

15.5 mg/ml ReDAAO (0.366 mM) を 50 mM KPi buffer (pH 8.0) で 2 倍希釈 (7.75 mg/ml, 0.183 mM) し、サーマルサイクラー (LifeECO, Bioer Technology) を用いて遮光しながら 100°C で 10 min 保温した。保温後、遠心 (20,000 $\times g$, 4°C, 30 min) し、補酵素を含む上清を回収した。上清 1 μ l をシリカゲル薄層プレート (TLC employing a silica gel 60 F-254 plate 2 mm thickness, Merck) に滴下し、5% Na_2HPO_4 を展開溶媒として展開した。薄層プレート上のフラビンは、ルミノ・イメージアナライザー (Amersham Imager 600, GE Healthcare) を用いて、波長 312 nm において検出した。標準フラビンには 2.5% glycerol を含む 50 mM KPi buffer (pH 8.0) に溶解させた 1 μ l の 100 μ M FMN と FAD を用いた。

FAD 含有量測定

TLC と同様に熱変性させ回収した ReDAAO 溶液上清の 450 nm における吸光度を、超微量分光光度計 NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific) を用いて測定した。標準 FAD として、2.5% glycerol を含む 50 mM KPi buffer (pH 8.0) を用いて調製した 0.05–0.2 mM FAD 溶液を用いた。

アポ化

ReDAAO のアポ化は Casalin らの方法(172)に従い透析法により検討した。15.0 mg/ml ReDAAO 溶液 10 μ l をアポ化 buffer (2 M KBr, 250 mM KPi, 0.3 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, pH 8.0) に対して遮光しながら透くんを用いて 4°C で 5 day 透析した。透析後、NanoDrop 1000 spectrophotometer を用い、波長 273 と 455 nm における吸光度 (A_{273} と A_{455}) を測定し、透析前後の A_{273}/A_{455} を比較した。

至適 pH 解析

20 mM D-Val を基質として含む pH 4.0–10 の 50 mM GTA buffer を用い、55°C で 2,4-DNPH 法により DAAO 活性を測定し、相対活性を算出した。

pH 安定性解析

7.0 mg/ml ReDAAO を pH 4.0–10 の 50 mM GTA buffer と pH 10–11 の 50 mM CAPS buffer で 70 倍希釈し 0.1 mg/ml に調整した。調整した各 ReDAAO 溶液を LifeECO を用いて遮光しながら 45°C で 1 h 保温した。保温後、20 mM D-Val を基質として用い、37°C で 4-AA/HRP カップリング法により残存 DAAO 活性を測定し、相対活性を算出した。

至適温度解析

20 mM D-Val を基質として用い、30–70°C で 2,4-DNPH 法により DAAO 活性を測定し、相対活性を算出した。

耐熱性解析

0.1 または 0.01 mg/ml ReDAAO 溶液を LifeECO で遮光しながら 20–75°C で 1 h 保温した後、20 mM D-Val を基質として用い、37°C で 4-AA/HRP カップリング法により残存 DAAO 活性を測定し、相対活性を算出した。

耐熱性に及ぼすタンパク質濃度と FAD 添加の影響解析

15.0 mg/ml ReDAAO 溶液を 50 mM KPi buffer (pH 8.0) を用いて 0.01–0.1 mg/ml に希釈した。希釈した各 ReDAAO 溶液を LifeECO で遮光しながら 45°C で 1 h 保温した。保温後、各 ReDAAO 溶液を 50 mM KPi buffer (pH 8.0) を用いて 0.01 mg/ml になるように希釈し、20 mM D-Val を基質として用い、37°C で 4-AA/HRP カップリング法により残存 DAAO 活性を測定し、相対活性を算出した。また、終濃度 0.1 mM FAD を添加して調製した 0.01 mg/ml の ReDAAO 溶液も同様に保温して残存 DAAO 活性を測定し、相対活性を算出した。

DAAO と DDO 競合的阻害剤

10 mM もしくは 50 mM の DAAO 競合的阻害剤 (anthranilate, benzoate, crotonate) と DDO 競合的阻害剤 (*meso*-tartrate, malonate, D-malate) 存在下における DAAO 活性を 20 mM D-Val を基質として用い、55°C で 2,4-DNPH 法により測定し、相対活性を算出した。

第 3 章 ReDAAO の高安定性と新奇な広基質特異性に寄与する構造的要因の同定

1. 緒言

第 2 章では、高い安定性を有しかつ高活性で広基質特異性を有する DAAO を取得するため、発酵堆肥から D-アミノ酸を唯一の窒素源とした培地で良好に生育する好熱性真菌 YA 株を単離し、好熱性真菌 *R. emersonii* と同定した。さらに、YA 株から DAAO ホモログ遺伝子を単離した。 *E. coli* で発現させた YA 株の DAAO ホモログ遺伝子産物 (ReDAAO) は様々な中性及び塩基性 D-アミノ酸に対してオキシダーゼ活性を示したことから広基質特異性を有する DAAO であることが分かった。興味深いことに、ReDAAO は本来 DDO の基質である酸性の D-Glu やセファム系抗生物質の材料である CPC も対しても高い活性を示したことから、今まで報告されている DAAO にはない新奇な広基質特異性を有していた。その一方で、ReDAAO のアミノ酸配列は、第 1 章で見出された基質特異性の狭い TdDAAO のアミノ酸配列に対して高い配列同一性を有していた。ReDAAO と TdDAAO のアミノ酸配列とモデル構造の比較から、ReDAAO における一部のアミノ酸配列の欠失とそれに伴う ReDAAO と TvDAAO の基質結合部近傍の構造的な相違が観察され、両 DAAO 間の基質特異性の相違への関与が示唆された。また、ReDAAO の耐熱性は既知の DAAO のなかで好熱性細菌由来 DAAO に次いで 2 番目に高く、真核生物由来 DAAO のなかで最も高かった。さらに、ReDAAO は既知の DAAO とは異なり、二量体ではなく四量体を形成していたことから、四次構造の高度化がその高い耐熱性に寄与する可能性が考えられた。

第 3 章では、ReDAAO に見出された新奇な広基質特異性と高い耐熱性に寄与する構造的要因を明らかにするため、ReDAAO の結晶構造を決定するとともに、ReDAAO の基質特異性と耐熱性に寄与するアミノ酸残基を推定し他のアミノ酸残基に置換したバリエーションを作成し、その基質特異性と耐熱性への影響を解析した。

2. 結果

2.1. ReDAAO の X 線結晶構造解析

2.1.1. ReDAAO の結晶化と X 線回折強度データの測定

ReDAAO の結晶化に際し、市販のスクリーニングキットを用いたハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化条件のイニシャルスクリーニングを行った。その結果、異なる 96 種のリザーバー溶液条件の組成のうち、ammomium formate, ammonium tartrate, lithium chloride および sodium formate をそれぞれ含む 4 条件で一辺あたり 10–100 μm 程度の大きさの ReDAAO の結晶が 3–7 日間の静置後に観察された。また、より良好な結晶を得るために、塩濃度と PEG 濃度の最適化を検討した。

最適化の結果、240 mM sodium formate と 16–20% (w/v) PEG 1540 を含む 120 mM Tris-HCl (pH 8.5) をリザーバー溶液とし、リザーバー溶液と 2.0 mg/ml ReDAAO を 1:2 で混合したドロップを用いて、22°C で 7 日間静置することで六方晶の結晶が得られた (Table 3-1, Fig. 3-1)。一方、凍結保護剤として終濃度 20% (v/v) 2-methylpentane-2,4-diol, 15% (v/v) PEG 200 または 5% (v/v) glycerol をそれぞれ含む最適化リザーバーを用いた場合、良質な結晶は得られなかった。したがって、凍結保護処理は、最適化により得られた結晶を X 線照射前に終濃度 20% (v/v) PEG400 を含むリザーバー溶液に浸漬することで行った。

Table 3-1. 最適化により得られた ReDAAO 結晶化条件

Sample	2.0 mg/ml ReDAAO
Sample buffer	50 mM KPi (pH 8.0)
Reservoir	100 μl : 120 mM Tris-HCl pH 8.5, 240 mM sodium formate, 17.4% w/v PEG 1540
Drop	6 μl : 4 μl (protein)+2 μl (reservoir)
Temperature	22°C
Humidity	38%

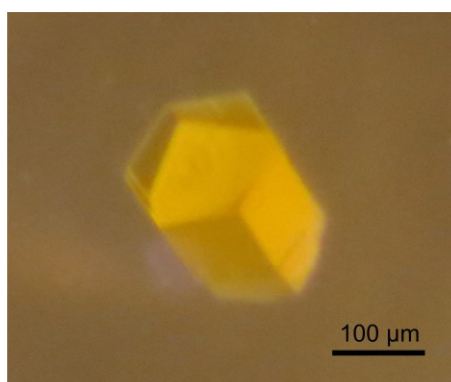


Fig. 3-1. X 線回折強度測定に用いた ReDAAO の結晶

リザーバーとして 17.4% (w/v) PEG 1540, 240 mM sodium formate および 120 mM Tris-HCl pH 8.5 を用いて、22°C でハンギングドロップ蒸気拡散法により ReDAAO を結晶化した。スケールバーは 100 μm を示す。

高エネルギー加速器研究機構（KEK, つくば）のフォトンファクトリーのビームライン BL-5A において、得られた ReDAAO 結晶に X 線を照射し回折強度データを取得し、プログラム *XDS*(198), *POINTLESS*(199, 200)および *SCALA*(199)を用いて 2.00 Å 分解能までの範囲でデータを処理した (Table 3-2). なお、X 線回折強度データの収集は、共同研究先の東邦大学理学部生物分子科学科の後藤研究室に依頼した。その結果、ReDAAO 結晶は $P6_1$ の空間群に属し、格子定数は $a = b = 79.13$ と $c = 366.67$ Å であることが明らかとなった。また、ReDAAO 結晶の非対称単位に含まれる分子の数を 4 分子と見積もると、Matthews 係数は 1.95、溶媒含有率は 36.9%と算出された。

Table 3-2. ReDAAO 結晶の X 線回折強度データの収集と処理

Data correction		Data correction	
Diffraction source	BL-5A, PF, KEK	Mosaicity (°)	0.18
Wavelength (Å)	1.0000	Resolution range (Å)	45.83–2.00 (2.11–2.00)
Temperature (K)	95	Total No. of reflections	885584
Detector	PILATUS 3S 6M	No. of unique reflections	87291
Crystal-to-detector distance (mm)	336.7	Completeness (%)	100 (100)
Rotation range per image (°)	0.2	Multiplicity	10.1 (10.0)
Total rotation range (°)	180	$\langle I/\sigma(I) \rangle$	13.6 (2.2)
Exposure time / image (s)	2.0	$R_{\text{i.m.}}$	0.105 (1.178)
Space group	$P6_1$	Overall B factor from Wilson plot (Å ²)	38.5
Unit cell parameter: a, b, c (Å)	79.13, 79.13, 366.67		
α, β, γ (°)	90, 90, 120		

()内は最外殻における値を示す。推定 $R_{\text{i.m.}}$ は $R_{\text{merge}} [N/(N-1)]^{1/2}$ で算出した。 N はデータの多重度を示す。

2.1.2. ReDAAO 結晶構造の構築と精密化

Protein Data Bank において最も高いアミノ酸配列同一性 (30.6%) を有する RgDAAO のサブユニット A (PDB entry: 1C0I) を初期モデルとし分子置換法により ReDAAO の初期位相を決定した。初期位相が決定した後、プログラム *REFMAC5*(201) を用いて立体構造を精密化し、プログラム *COOT*(202) を用いて手動でのモデル構築と電子密度を確認した。最終的に、 R_{cryst} と R_{free} 値がそれぞれ 20.6% と 24.6% の精度で 2.000 Å 分解能の ReDAAO の構造が得られた (Table 3-3)。構築した ReDAAO の立体構造において、サブユニット A, B, C および D には 341, 346, 347 および 342 のアミノ酸残基 (水素原子を除く計 10,390 原子)、FAD が 1 分子ずつ (水素原子を除く計 212 原子)、水分子が 91, 84, 93 および 99 個ずつ (水素原子を除く計 367 原子) 含まれていた。電子密度が無秩序になっているアミノ酸残基 (Gln101–Lys114 残基: 13 アミノ酸残基) は立体構造から除いた。構築した ReDAAO の立体構造のアミノ酸残基の 98.0% が Most favored 領域に存在し、残りの 2% が Allowed 領域に存在した。得られた構造データを PDB に登録した (PDB entry: 7CT4)。

Table 3-3. ReDAAO 結晶構造の決定と精密化

Data correction		Data correction	
Resolution range (Å)	50.00–2.000 (2.052–2.000)	R.m.s. deviations	
Completeness (%)	99.980 (99.753)	Bonds (Å)	0.0081
σ Cutoff	0	Angles (°)	1.3215
No. of reflections, working set	82916	Average <i>B</i> factors (Å ²)	
No. of reflections, test set	4229	Protein	43.052
Final R_{cryst}	0.206 (0.210)	Ligand	35.177
Final R_{free}	0.246 (0.223)	Water	43.215
Cruickshank DPI	0.0471	Ramachandran plot	
No. of non-H atoms		Most favored (%)	98.0
Protein	10390	Allowed (%)	2.0
Ligand	212		
Water	367		
Total	10969		

()内は最外殻における値を示す。

2.1.3. ReDAAO の全体構造

ReDAAO のサブユニット構造は、pkDAAO (PDB entry: 1VE9) と RgDAAO (PDB entry: 1C0I) との重ね合わせから、これら DAAO 同様に“flavin-binding domain” (Asn4–Ala34 残基, Thr151–Arg202 残基および Lys319–Leu356 残基)と“interface domain” (Arg63–Ile149 残基および Leu212–Arg311 残基) の2つのドメインに分けることができた (Fig. 3-2ab). Flavin-binding domain は5つの α -helix : α F1 (Val13–Leu22 残基), α F2 (Thr151–Lys164 残基), α F3 (Val177–Asn182 残基), α F4 (Gly198–Arg202 残基), α F5 (Ser341–Leu356 残基) と6つの β -strand : β F1 (Asn4–Leu9 残基), β F2 (Asn28–Ala34 残基), β F3 (Val168–Arg171 残基), β F4 (Leu192–Asn195 残基), β F5 (Lys319–Ile322 残基), β F6 (Val325–His329 残基) で構成されていた. Interface domain は2つの α -helix : α I1 (Arg63–Asn81 残基), α I3 (Pro271–Leu284 残基) と8つの β -strand : β I1 (Ile87–Arg97 残基), β I2 (Arg127–Glu128 残基), β I3 (Ile138–Ile149 残基), β I4 (Leu212–Val222 残基), β I5 (Met229–Ile232 残基), β I6 (Glu241–Thr247 残基), β I7 (Thr254–Thr259 残基), β I8 (Ile300–Arg311 残基) で構成されていた. プログラム *PDBFold* と *ESPrpt 3.0* による構造アライメントから、ReDAAO の両ドメインの二次構造の構成は、 α I2 に対応する α -helix が無いことを除き、RgDAAO と pkDAAO に類似した (Table 3-4).

ReDAAO のサブユニット分子内において、 β I5 に位置する Cys230 残基と α I3– β I8 間のループに位置する Cys285 残基が SS 結合を形成していることが確認できた (Fig. 3-2b, Table 3-5). また、ReDAAO の分子内相互作用を定量化したところ、疎水性相互作用、水素結合、塩橋および π - π 相互作用数はそれぞれ 281, 608, 19 および 11 本であった (Table 3-5).

ReDAAO の構造データを用いてプログラム *PDBEPIA* におけるアセンブリ解析を行ったところ、ReDAAO のサブユニット A-B は $1,215 \text{ \AA}^2$, A-C は 536 \AA^2 および A-D は 197 \AA^2 の接触面積 (いずれもサブユニット A における面積) を有することから、四量体を形成することが示され、dimer-of-dimers 型の四量体を形成することが明らかとなった (Fig. 3-2c). この結晶構造における ReDAAO の四量体形成は、第2章の ReDAAO のゲル濾過クロマトグラフィーによる解析結果と一致した. また、ReDAAO がサブユニット界面を形成する際に1サブユニットが獲得する溶媒和自由エネルギー (Δ^iG) は $-18.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ であった.

ReDAAO の二量体は、pkDAAO のような head-to-head 型ではなく、RgDAAO のような head-to-tail 型であったが、ReDAAO と RgDAAO の二量体形成に関わる領域が異なり、二量体を形成するサブユニットの相対的な配向も異なっていた. ReDAAO の構造データを用いてサブユニット間相互作用を定量化した (Table 3-6, Fig. 3-3). その結果、サブユニット A-B 間において、疎水性相互作用 (HI), 水素結合 (HB), 塩橋 (SB) および π - π 相互作用 ($\pi\pi$) がそれぞれ 10, 12, 2, 1 本ずつ見出された (Fig. 3-3a). サブユニット A-C 間においては、HI と HB が 9 と 4 本ずつ見出されたが (Fig. 3-3b), 他の相互作用は見出されなかった. サブユニット A-D 間においても、HI と HB が 1 本ずつ見出されたが (Fig. 3-3c), 他の相互作用は見出されなかった.

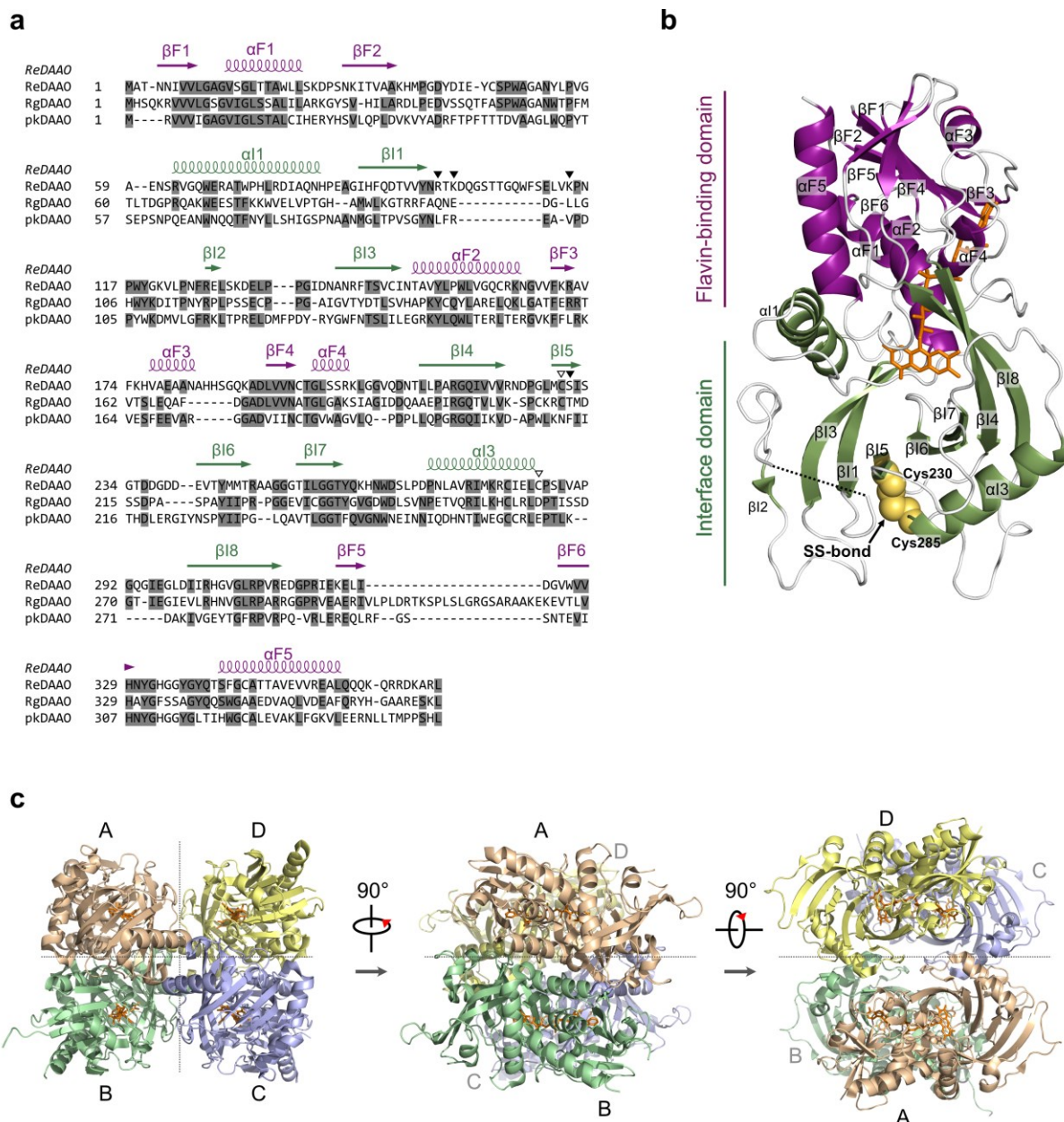


Fig. 3-2. ReDAAO 結晶構造

(a) ReDAAO の二次構造. ReDAAO の二次構造はプログラム PDBFold(<https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>) と ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>) を用いて, RgDAAO および pkDAAO との比較により決定し番号付けした. 弦巻線は α -helix を, 矢印は β -strand を示す. Flavin-binding domain と interface domain の α -helix と β -strand はそれぞれ αF と βF および αI と βI で示し, その順番を数字で示した. (∇) はサブユニット内 SS 結合に関わる Cys230 と Cys285 残基を示す. (\blacktriangledown) は D-Glu に対する活性への寄与が予想された Arg97, K99, K114 および Ser231 残基を示す. (b) ReDAAO のサブユニット構造. 配色: 紫色, flavin-binding domain; 緑, interface domain. 点線で結ばれた領域は電子密度の乱れにより構造が決定できなかったアミノ酸残基 (Gln101–Lys114) を示す. 小球の配色: 黄, Cys230 と Cys285 残基. 橙色のスティックモデルは FAD を示す. (c) ReDAAO の四次構造. 配色: 橙, subunit A; 緑, subunit B; 青, subunit C; 黄, subunit D.

Table 3-4. 各 DAAO の α -helix と β -strand の比較

DAAOs	N-terminus → C-terminus																					
	βF1	αF1	βF2	αI1	βI1	βI2	αI2	βI3	αF2	βF3	αF3	βF4	αF4	βI4	βI5	βI6	βI7	αI3	βI8	βF5	βF6	αF5
ReDAAO	S	H	S	H	S	S	-	S	H	S	H	S	H	S	S	S	S	H	S	S	S	H
RgDAAO	S	H	S	H	S	S	H	S	H	S	H	S	H	S	S	S	S	H	S	S	S	H
pkDAAO	S	H	S	H	S	S	H	S	H	S	H	S	H	S	S	S	S	H	S	S	S	H

紫塗りは flavin-binding domain を示し、緑塗りは interface domain を示す。略称：H, α -helix；S, β -strand. (-)は α -helix と β -strand が無いことを示す。用いた DAAO の PDB entry を以下に示す。ReDAAO, 7CT4；RgDAAO, 1C0I；pkDAAO, 1KIF。Table はプログラム *PDBFold* (<https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/cgi-bin/ssmserver>) と *ESPrpt 3.0* (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/ESPrpt/>) の構造アライメントを用いて作成した。

Table 3-5. ReDAAO サブユニット内相互作用

Interactions	ReDAAO (7CT4)
	The number of interactions
Hydrophobic interactions (HI)	281
Disulfide bonds (SS)	1
Hydrogen bonds (HB)	608
Salt-bridge (SB)	19
π - π interactions ($\pi\pi$)	11

Protein Interaction Calculator (<http://pic.mbu.iisc.ernet.in/>) を用いて ReDAAO のサブユニット内相互作用数を定量した。PDB entry は DAAO 名に続く () 内に示した。

Table 3-6. ReDAAO サブユニット間相互作用

Interactions	ReDAAO (7CT4)			
	Subunit-subunit			
	A-B (C-D)	A-C (B-D)	A-D (B-C)	A-B-C-D
	The number of interactions			
Hydrophobic interactions (HI)	10	9	1	40
Disulfide bonds (SS)	0	0	0	0
Hydrogen bonds (HB)	12	4	1	34
Salt-bridge (SB)	2	0	0	4
π - π interactions ($\pi\pi$)	1	0	0	2

Protein Interaction Calculator (<http://pic.mbu.iisc.ernet.in/>) を用いて ReDAAO のサブユニット間相互作用数を定量した。DAAO 名に続く () 内に PDB entry を示した。

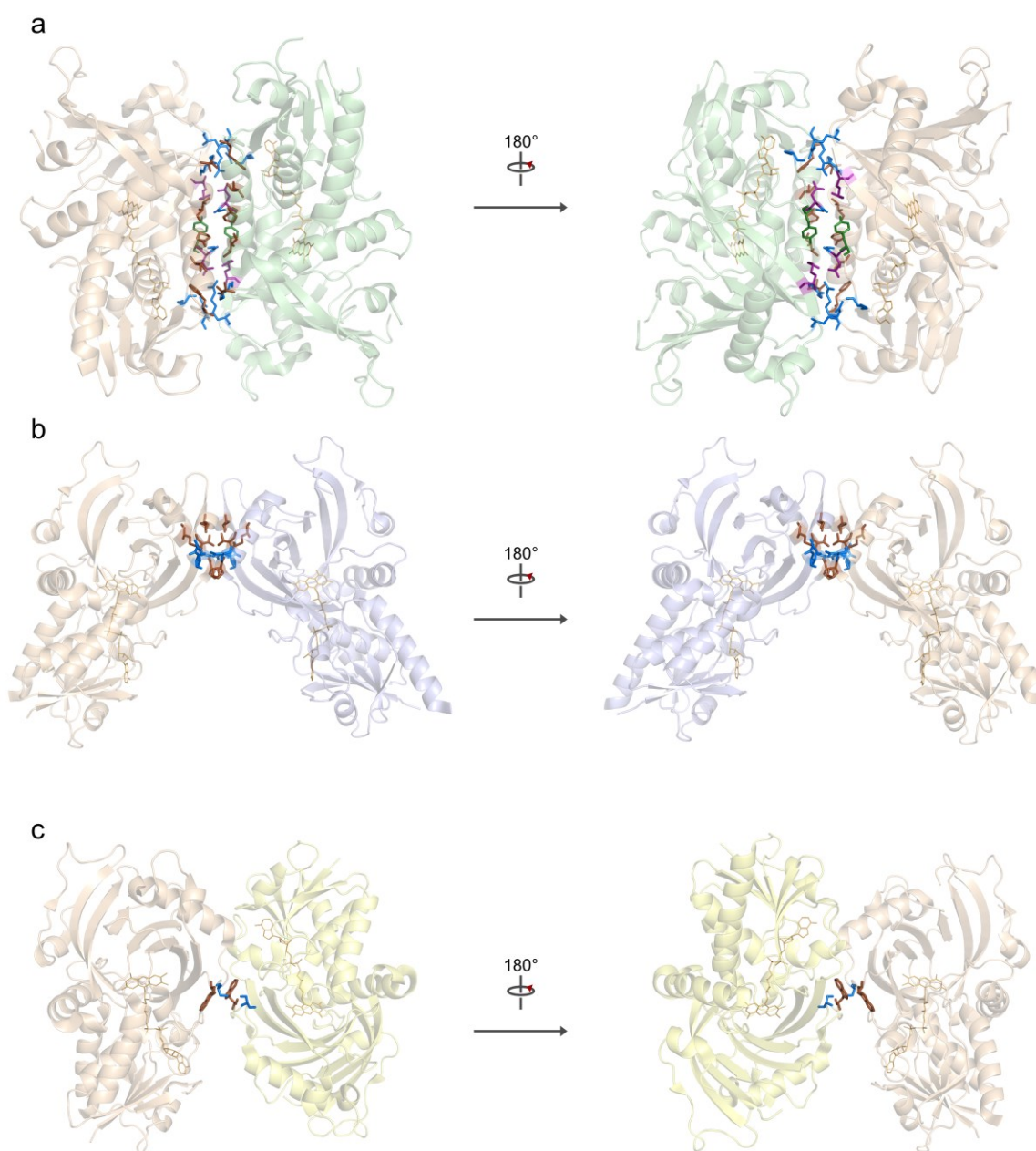


Fig.3-3. ReDAAO のサブユニット間相互作用

(a) サブユニット A-B, (b) サブユニット A-C および (c) サブユニット A-D 間の相互作用. スティックの配色: 茶, 疎水性相互作用を担う疎水性アミノ酸残基; 青, 水素結合を担うアミノ酸残基; マゼンタ, 塩橋を担う Asp と Arg 残基; 緑, π - π 相互作用を担う Tyr 残基; 橙, FAD. *PyMOL ver 2.4* を用いて作図した.

2.1.4. ReDAAO の活性部位構造

ReDAAO の活性部位を観察したところ、第2章の一次構造のアライメントとモデル構造から推測されたように、Asn53, Tyr244, Tyr260, Arg308, Gly335 および Gln339 残基が活性部位およびその近傍に位置し、基質 D-アミノ酸の α -カルボキシ基と α -アミノ基と相互作用すると考えられた (Fig. 3-4a)。しかし、ReDAAO における Tyr260 残基の側鎖は、RgDAAO と D-Ala の複合体構造における Tyr238 残基の側鎖の向きとは異なり、活性部位に対して外側に向いていた (Fig. 3-4ab)。

第2章のモデル構造で酸性の D-Glu への活性に寄与すると予想された Arg97 残基は、結晶構造においても活性部位の上部に位置していた (Fig. 3-4a)。さらに、D-Glu 側鎖と相互作用する可能性のある他の塩基性残基を探索したところ、RgDAAO には存在しない、ReDAAO に特異的に存在する Lys99 残基が Arg97 残基と同様に活性部位の上部に存在していた。また、構造が決定できていない Lys114 残基も ReDAAO にのみ特異的に活性部位上部に存在する可能性が考えられた。したがって、これら3つの塩基性アミノ酸残基が D-Glu への活性に寄与する可能性が考えられた。

RgDAAO の Met213 残基 (M213R バリエントは D-Asp に活性を示す) に対応する ReDAAO のアミノ酸残基は一次構造とモデル構造上ではそれぞれ Ile232 と Ser233 残基であったことを第2章で述べたが、結晶構造では Ser231 残基であった (Fig. 3-4ab)。したがって、Ser231 残基も D-Glu の側鎖カルボキシ基の認識に寄与する可能性が示唆された。

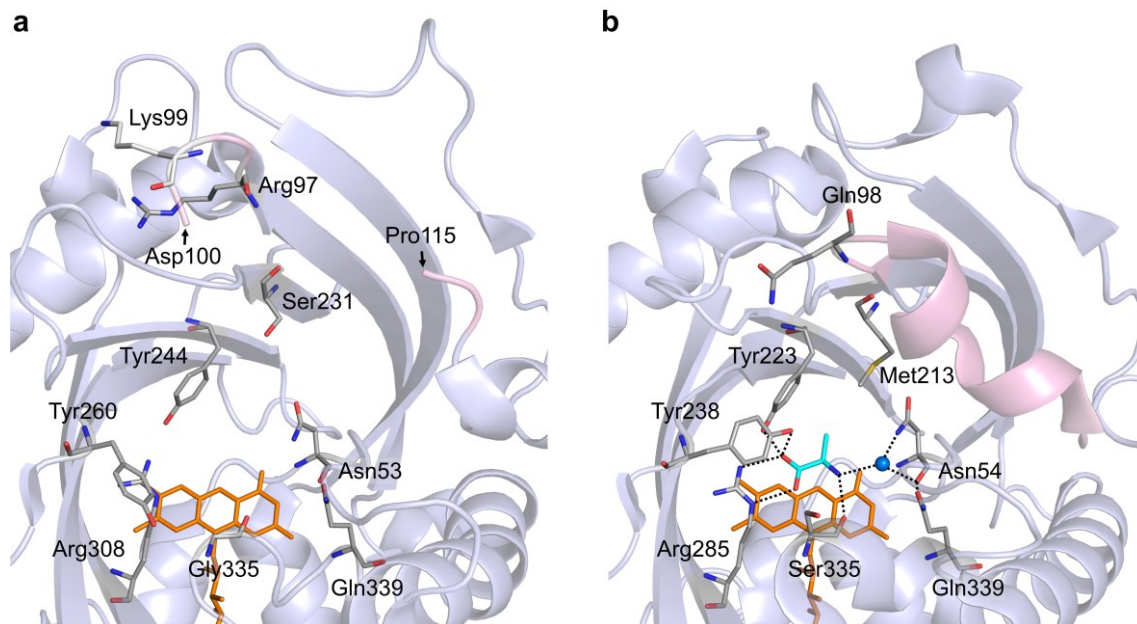


Fig. 3-4. ReDAAO と RgDAAO 結晶構造における活性部位の比較

(a) ReDAAO (PDB entry: 7CT4) と (b) RgDAAO と D-Ala の複合体結晶構造 (PDB entry: 1C0P) の活性部位を示した。スティックの配色：灰，炭素原子；シアン，炭素原子 (D-Ala)；青，窒素原子；赤，酸素原子；橙，FAD。RgDAAO における青の小球は水分子を示す。ReDAAO において電子密度の乱れにより構造決定できなかったアミノ酸残基 (Gln101–Lys114) が位置する loop と、これに重ね合う RgDAAO の α -helix を桃色で示した。RgDAAO における点線は水素結合を示す。PyMOL ver 2.4 (<https://pymol.org/2/>) を用いて作図した。

第2章において、高いアミノ酸配列同一性を有する ReDAAO と TdDAAO の基質特異性の広さの違いは、活性部位近傍の連続したアミノ酸残基 (TdDAAO の Tyr57–Gly61 残基; YVLQG, Fig. 3-5b) の有無と推測された。そこで、ReDAAO の結晶構造と TdDAAO のモデル構造を重ね合わせたところ、TdDAAO の YVLQG 配列は ReDAAO の活性部位近傍の Flavin-binding domain の β F6 と Interface domain の α I1 間のループに位置することが分かった (Fig. 3-5ab)。したがって、この連続したアミノ酸残基の有無が基質特異性に関与する可能性が示唆された。

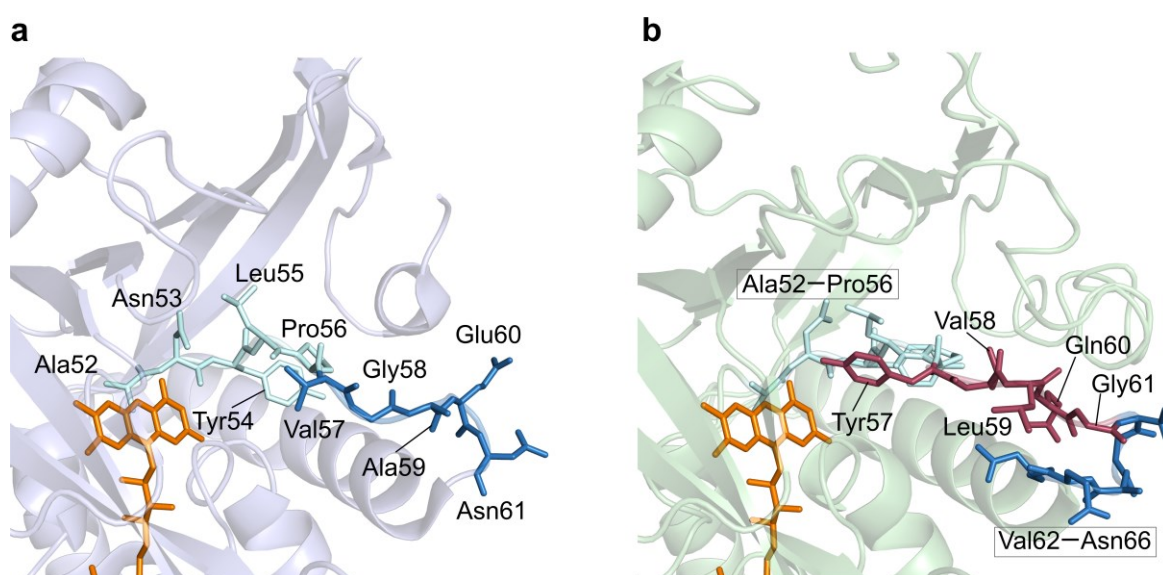


Fig. 3-5. ReDAAO 結晶構造と TdDAAO モデル構造の活性部位近傍の比較

(a) ReDAAO (PDB entry: 7CT4) 結晶構造と (b) TdDAAO モデルの活性部位近傍を示した。スティックの配色：シアン, ReDAAO と TdDAAO の共通の Ala-Pro 残基; 青, ReDAAO と TdDAAO の共通の Val-Asn 残基; 赤, TdDAAO に特異的な Tyr57, Val58, Leu59, Gln60 および Gly61 残基。TdDAAO モデル構造は I-TASSER On-line Server (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) を用いて構築した。PyMOL ver 2.4 (<https://pymol.org/2/>) を用いて作図した。

2.2. ReDAAO R97A, K99A, K114A および S231A バリエント

2.2.1. *E. coli* 粗抽出液における ReDAAO R97A, K99A, K114A および S231A バリエントの基質特異性解析

ReDAAO 結晶構造の活性部位において, Arg97, Lys99, Lys114 および Ser231 残基が D-Glu 側鎖と相互作用する可能性が示唆されたことから, これら残基を Ala 残基に置換したバリエント (R97A, K99A, K114A および S231A) を *E. coli* BL21(DE3) pLysS で発現させ, それぞれの *E. coli* 粗抽出液を用いて各バリエントの基質特異性を解析した (Fig. 3-6). その結果, R97A と S231A の D-Glu に対する相対活性 (それぞれ D-Met と D-Val に対する活性を 100%とした) は 10%と 5%であり, 野生型 (58%) と比較して著しく低下した. 一方, K99A と K114A の D-Glu に対する相対活性 (それぞれ D-Met に対する活性を 100%とした) は 39%と 60%であり, 野生型 (58%) と比較して少し低いか同等の相対活性を示した. したがって, Arg97 と Ser231 残基が D-Glu との相互作用に関与することが示唆された. そこで, 精製した R97A と S231A およびの基質特異性を解析することにした. また, 二重置換したバリエント (R97A/S231A) も作成し, 同様に解析することにした.

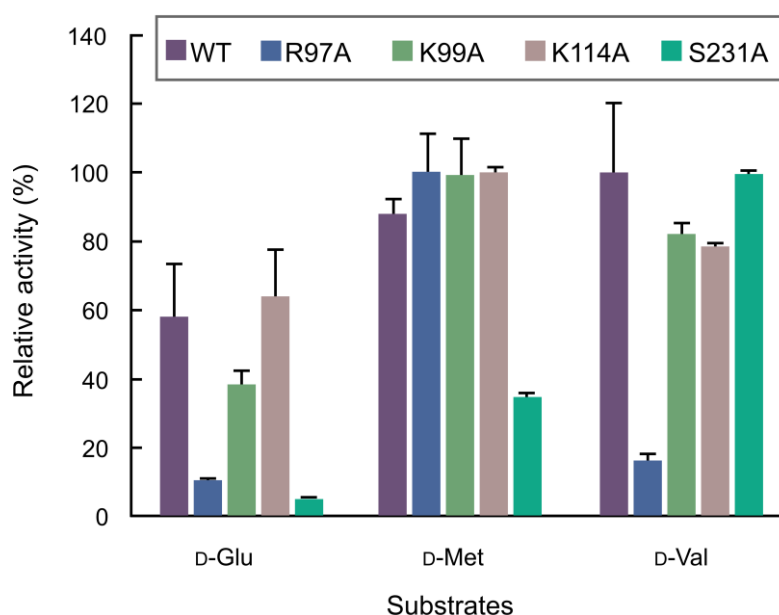


Fig. 3-6. 組換え *E. coli* 粗抽出液を用いた ReDAAO バリエント遺伝子発現産物の基質特異性

野生型 ReDAAO (WT) または各バリエントを発現させた *E. coli* 粗抽出液を用いて, 基質 20 mM D-アミノ酸に対する DAAO を 37°C, 20 μ M FAD 存在下で 4-AA/HRP カップリング法により測定した. 活性は 3 回測定し, 平均値を示した. エラーバーは標準偏差を示す.

2.2.2. ReDAAO R97A, S231A および R97A/S231A バリエントの精製

各遺伝子を発現させた *E. coli* 粗抽出液から R97A, S231A および R97A/S231A バリエントを His タグアフィニティーカラムを用いて精製した。精製した各バリエントを SDS-PAGE に供したところ、いずれも His タグ融合タンパク質としての分子質量 (42.4 kDa) に相当する位置に単一のバンド (>95%以上) が観察され、電気泳動的に単一に精製されたことが分かった (Fig. 3-7)。精製した R97A と R97/S231A は 37°C において 20 mM D-Met に対してそれぞれ 21.2 と 41.5 U/mg の比活性を示し、S231A は 37°C において 20 mM D-Phe に対して 23.4 U/mg の比活性を示した。37°C における野生型 ReDAAO の比活性は 79.2 U/mg (D-Val) であることから、Arg97 と Ser231 残基を Ala 残基に置換することで、ReDAAO の活性は低下することが分かった。

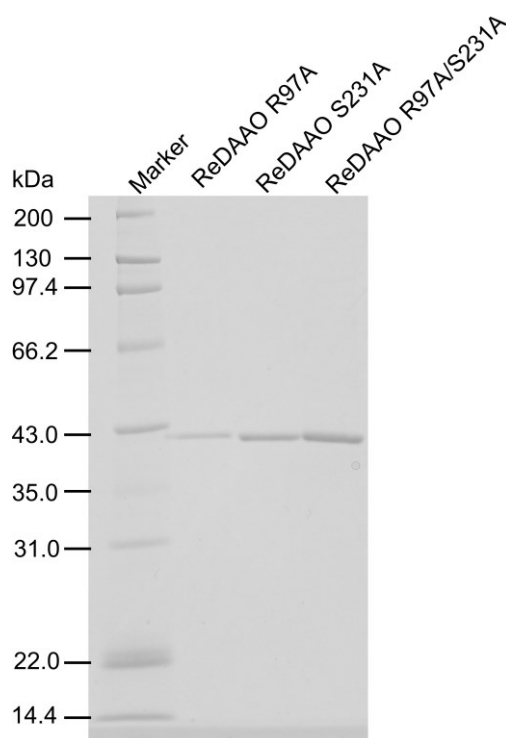


Fig. 3-7. 精製した ReDAAO R97A, S231A および R97A/S231A バリエントの SDS-PAGE 解析

Marker, 分子量マーカー ; ReDAAO R97A (1.5 μ g) ; ReDAAO S231A (1.5 μ g) ; ReDAAO R97A/S231A (1.5 μ g). 12.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いてタンパク質分離し、CBB-G250 を用いて染色した。

2.2.3. ReDAAO R97A, S231A および R97A/S231A バリエーションの基質特異性解析

精製した R97A, S231A および R97A/S231A バリエーションを用いて、基質特異性を解析した (Table 3-7). その結果, *E. coli* 粗抽出液の結果と同様に R97A は D-Met に対して最も高い活性 (21.2 U/mg, 37°C) を示した. また, D-Lue や D-Phe といった嵩高い疎水性 D-アミノ酸と D-Gln に対しても D-Met と同等な高い活性を示した. 一方, D-Glu に対する活性 (1.9 U/mg) は低かった.

S231A は D-Phe に対して最も高い活性 (23.4 U/mg, 37°C) を示した. また, D-Ala や D-Val といった構造的に小さな疎水性 D-アミノ酸と D-Gln に対して D-Phe と同等な高い活性を示した. 一方, D-Glu に対する活性 (2.3 U/mg) は低かった.

R97A/S231A は D-Met に対して最も高い活性 (41.5 U/mg) を示した. また, R97A と同様に, D-Leu や D-Phe に対しても比較的高い活性を示した. 一方, D-Glu に対する活性 (1.0 U/mg) は3つのバリエーションのなかで最も低く, 野生型 ReDAAO の 1/40 程度であった.

Table 3-7. ReDAAO R97A, S231A および R97A/S231A バリエントの基質特異性

Substrates	Relative activity \pm SD (%)			
	R97A	S231A	R97A/S231A	WT
D-Asp	0.1<	2.0 \pm 2.1	1.0 \pm 0.8	2.5 \pm 0.1
D-Glu	8.9 \pm 1.3	10.0 \pm 1.1	2.4 \pm 0.1	53.0 \pm 0.8
D-Arg	49.0 \pm 3.5	38.0 \pm 2.6	14.1 \pm 1.7	45.9 \pm 2.0
D-Lys	22.9 \pm 3.0	10.0 \pm 1.3	4.9 \pm 0.8	12.6 \pm 1.4
D-His	38.5 \pm 9.9	26.0 \pm 1.0	24.4 \pm 1.0	30.6 \pm 3.8
D-Asn	30.7 \pm 6.5	29.0 \pm 3.0	7.8 \pm 1.5	27.6 \pm 0.7
D-Gln	82.2 \pm 9.4	86.0 \pm 7.3	65.2 \pm 10.9	60.5 \pm 11.8
D-Phe	80.2 \pm 12.6	100	71.1 \pm 10.2	82.3 \pm 9.6
D-Leu	90.4 \pm 1.9	32.0 \pm 5.2	65.1 \pm 15.0	64.6 \pm 5.3
D-Met	100	30.0 \pm 1.0	100	74.2 \pm 2.3
D-Ala	38.2 \pm 1.9	87.0 \pm 3.0	43.0 \pm 4.9	70.0 \pm 15.9
D-Tyr	29.5 \pm 2.9	9.0 \pm 1.1	12.4 \pm 0.4	30.4 \pm 0.8
D-Val	14.3 \pm 1.4	84.0 \pm 3.3	17.1 \pm 1.1	100
D-Pro	0.2 \pm 0.1	3.0 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1	5.2 \pm 0.4
D-Ser	17.6 \pm 1.0	53.0 \pm 7.6	10.3 \pm 0.2	41.3 \pm 4.7
D-Thr	1.2 \pm 0.1	3.0 \pm 0.3	2.6 \pm 0.3	16.1 \pm 1.1
D-Trp	24.7 \pm 3.3	2.0 \pm 0.2	2.9 \pm 0.3	17.3 \pm 3.8
D-Ile	10.1 \pm 1.5	28.0 \pm 1.3	7.8 \pm 0.9	88.4 \pm 5.3

1.5 mM D-Tyr を除く，各 20 mM D-アミノ酸を基質として 37°C, pH 8.0, 4-AA/HRP カップリング法によりオキシダーゼ活性を測定した．R97A と R97A/S231A は D-Met に対する比活性（21.2 と 41.5 U/mg），S231A は D-Phe に対する比活性（23.4 U/mg）および WT は D-Val に対する比活性（79.2 U/mg）をそれぞれ 100%とした相対活性を示した．測定は 3 回行い，平均値を示した．SD は標準偏差を示す．

2.2.4. ReDAAO R97A, S231A と R97A/S231A バリエントの酵素反応速度論的パラメーター解析

各アミノ酸残基置換の D-Glu に対する活性への影響をより詳細に理解するため、R97A, S231A, R97A/S231A バリエントの酵素反応速度論的パラメーターを解析した (Table 3-8)。解析の結果、R97A の D-Glu に対する k_{cat} と K_m はそれぞれ野生型の約 1/16 と約 4.0 倍であり、 $k_{\text{cat}} K_m^{-1}$ は約 1/63 であった。一方、S231A の k_{cat} と K_m はそれぞれ野生型の約 1/7.2 と約 12 倍となり、 $k_{\text{cat}} K_m^{-1}$ は約 1/86 であった。また、R97A/S231A の k_{cat} と K_m はそれぞれ野生型の約 1/17 と約 14 倍となり、 $k_{\text{cat}} K_m^{-1}$ は約 1/260 であった。ReDAAO の結晶構造より Arg97 と Ser231 がともに D-Glu に対する分子活性能と基質結合能に関わると考えられたが、S231A 置換よりも R97A 置換により k_{cat} が大きく低下したことから、R97A 置換よりも S231A 置換により K_m が大きく低下したことから、また R97A/S231A と R97A の k_{cat} が同程度であり、R97A/S231A の K_m が S231A と同程度であったことから、ReDAAO の D-Glu に対する触媒活性において、Arg97 残基は主に D-Glu に対する分子活性能に、Ser231 残基は主に基質結合能に大きく寄与すると考えられた。

同様に、中性 D-アミノ酸である D-Met に対する各バリエントの酵素反応速度論的パラメーターを解析した (Table 3-8)。解析の結果、R97A の D-Met に対する k_{cat} と K_m はそれぞれ野生型の約 1/3.3 と約 4.5 倍であり、 $k_{\text{cat}} K_m^{-1}$ は約 1/15 であった。一方、S231A の k_{cat} と K_m はそれぞれ野生型の約 1/9.6 と約 4.5 倍であり、 $k_{\text{cat}} K_m^{-1}$ は約 1/43 であった。また、R97A/S231A の k_{cat} と K_m はそれぞれ野生型の約 1/1.7 と約 2 倍であり、 $k_{\text{cat}} K_m^{-1}$ は約 1/3.5 であった。以上の結果より、Arg97 と Ser231 残基の Ala 置換の D-Met に対する酵素反応速度論的パラメーターに及ぼす影響は D-Glu に対するものよりも小さいことから、これらアミノ酸残基は D-Glu に対する触媒能により重要であると考えられた。特に、D-Met に対する K_m 値の変化は D-Glu に対するものよりも著しく小さかったことから、これらアミノ酸残基が D-Glu の基質結合に関与する可能性が考えられた。

Table 3-8. R97A, S231A および R97A/S231A バリアントの酵素反応速度論的パラメーター

DAAO	D-Glu					
	$k_{\text{cat}} \pm \text{SD}$ (s^{-1})	Variant/WT	$K_{\text{m}} \pm \text{SD}$ (mM)	Variant/WT	$k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Variant/WT
R97A	2.5 ± 0.1	1/16	19.8 ± 0.8	4.0	126	1/63
S231A	5.5 ± 0.2	1/7.2	59.2 ± 4.5	12	93.0	1/86
R97A/S231A	2.3 ± 0.1	1/17	71.0 ± 5.0	14	31.0	1/260
ReDAAO WT	39.8 ± 0.4		5.0 ± 0.2		7,960	
DAAO	D-Met					
	$k_{\text{cat}} \pm \text{SD}$ (s^{-1})	Variant/WT	$K_{\text{m}} \pm \text{SD}$ (mM)	Variant/WT	$k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Variant/WT
R97A	14.4 ± 0.3	1/3.3	0.36 ± 0.03	4.5	40,000	1/15
S231A	4.9 ± 1.0	1/9.6	0.36 ± 0.03	4.5	13,600	1/43
R97A/S231A	27.3 ± 0.5	1/1.7	0.16 ± 0.02	2.0	170,000	1/3.5
ReDAAO WT	47.0 ± 1.9		0.08 ± 0.02		588,000	

D-Glu は 0.5–100 mM と D-Met は 0.01–10 mM を用いて、37°C で 4-AA/HRP または AUR/HRP カップリング法により DAAO 活性を測定した。測定は 3 回行い、その平均値を示した。SD は標準偏差を示す。

2.2.5. ReDAAO R97A/S231A に対する DDO および DAAO 競合的阻害剤の影響解析

Arg97 と Ser231 残基が ReDAAO における DDO としての性質（酸性 D-アミノ酸に対する活性）を担う可能性をさらに明らかにするため、R97A/S231A に対する DDO 特異的な競合的阻害剤 5-aminonicotinic acid (5-AN) と DAAO 特異的な競合的阻害剤 benzoate (BEZ) の阻害定数 K_i を D-Glu または D-Met を基質とした条件下で Dixon-plot 法により解析した (Table 3-9)。解析の結果、基質として D-Glu を用いた場合、R97A/S231A に対する 5-AN の K_i は野生型よりも 2.9 倍高かった。したがって、R97A/S231A は野生型よりも DDO 競合的阻害剤に感受性が低いと考えられた。また、R97A/S231A に対する BEZ の K_i は野生型よりも 3.8 倍低かったことから、バリエントは野生型よりも DAAO 競合的阻害剤に感受性が高いと考えられた。一方、D-Met を基質として用いた場合、R97A/S231A に対する 5-AN の K_i は野生型とほぼ同じ値であったことから、バリエントと野生型の DDO 阻害剤に対する感受性は同等と考えられた。また、R97A/S231A に対する BEZ の K_i は野生型よりも 1.5 倍高かったことから、バリエントは野生型よりも BEZ に感受性が高いことが分かった。以上の結果より、R97A/S231A は野生型よりもより DAAO に似た基質競合的阻害剤感受性を有していたことから、Arg97 と Ser231 残基は ReDAAO の DDO としての基質特異性（酸性 D-アミノ酸に対する活性）に寄与することが支持された。

Table 3-9. DDO および DAAO 競合的阻害剤の ReDAAO R97A/S231A バリエントに対する阻害定数

Inhibitor	R97A/S231A		WT	
	D-Glu	D-Met	D-Glu	D-Met
	$K_i \pm$ SD (mM)		$K_i \pm$ SD (mM)	
DDO inhibitor				
5-Aminonicotinic acid	1.4 ± 0.1	3.3 ± 0.5	0.48± 0.04	3.8 ± 0.6
DAAO inhibitor				
Benzoate	1.7 ± 0.2	2.7 ± 0.3	6.4 ± 0.3	4.1 ± 0.6

野生型 ReDAAO (WT) においては 2.5, 5.0 および 10 mM の D-Glu または 0.04, 0.08 および 0.16 mM の D-Met, R97A/S231A においては 35.5, 71.0, 142 mM の D-Glu または 0.08, 0.16 および 0.32 mM の D-Met を基質とし、1–5 mM 5-aminonicotinic acid または 1–10 mM benzoate を阻害剤として用いて、37°C で 4-AA/HRP または AUR/HRP カップリング法により DAAO 活性を測定した。それぞれの Dixon-plot は Sigmaplot 12.5 を用いて作成し、 K_i を算出した。測定は 3 回行い、平均値を示した。SD は標準偏差を示す。

2.3. ReDAAO_{ins} と TdDAAO_{del}

2.3.1. *E. coli*粗抽出液における ReDAAO_{ins} と TdDAAO_{del} の基質特異性解析

2章で新奇な広基質特異性を有する ReDAAO と狭い基質特異性を有する TdDAAO の間に活性部位近傍の連続した5つのアミノ酸残基 (YVLQG 配列) の有無の違いが観察され, YVLQG 配列の基質特異性への寄与が推測された. そこで, ReDAAO の Pro56 と Val57 残基の間に YVLQG を挿入した ReDAAO バリエント (ReDAAO_{ins}) と TdDAAO の Tyr57–Gly61 残基を欠失させた TdDAAO バリエント (TdDAAO_{del}) 作成して *E. coli* で発現させ, それぞれの *E. coli* 粗抽出液を用いて各バリエントの基質特異性を解析した (Fig.3-8). その結果, ReDAAO_{ins} を発現させた *E. coli* 粗抽出液は基質として用いた4種のD-アミノ酸のなかで D-Met に対して最も高い活性を示したが, 他の3種のD-アミノ酸に対する相対活性は野生型 ReDAAO と比較して著しく低く, その基質特異性の傾向は野生型の TdDAAO に近かった. 一方, TdDAAO_{del} を発現させた *E. coli* 粗抽出液は野生型 TdDAAO と同様に D-Met に対して最も高い活性を示したが, 他の3種のD-アミノ酸に対する相対活性は野生型 TdDAAO とは異なり著しく高く, その基質特異性の傾向は野生型 ReDAAO に近かった. したがって, 基質特異性が広い ReDAAO に, 基質特異性の狭い TdDAAO に特異的に観察された YVLQG 配列を挿入することで, その基質特異性が TdDAAO のように狭くなり, 逆に基質特異性が狭い TdDAAO から YVLQG 配列を除くことで, TdDAAO の基質特異性が ReDAAO のように広くなる結果となった.

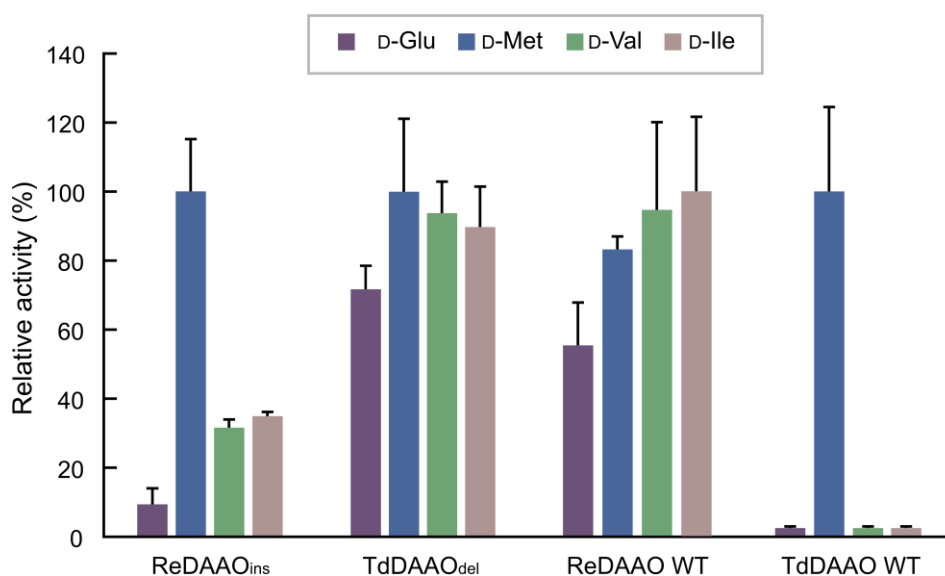


Fig. 3-8. 組換え *E. coli* 粗抽出液を用いた ReDAAO_{ins} と TdDAAO_{del} 遺伝子発現産物の基質特異性

野生型 ReDAAO (ReDAAO WT) と TdDAAO (TdDAAO WT) または各バリエントを発現させた *E. coli* 粗抽出液を用いて, 基質 20 mM D-アミノ酸に対する DAAO を 37°C, 20 μM FAD 存在下で 4-AA/HRP カップリング法により測定した. 活性は3回測定し, 平均値を示した. エラーバーは標準偏差を示す.

2.3.2. ReDAAO_{ins} と TdDAAO_{del} の精製

各バリエント遺伝子を発現させた *E. coli* 粗抽出液から ReDAAO_{ins} と TdDAAO_{del} を His タグアフィニティーカラムを用いて精製した。精製した各バリエントを SDS-PAGE に供したところ、いずれも His タグ融合タンパク質としての分子質量（それぞれ 43.0 kDa と 41.6 kDa）に相当する位置に単一のタンパク質バンド (>95%以上) が観察され、電気泳動的に単一に精製されたことが分かった (Fig. 3-9)。精製した ReDAAO_{ins} は 37°C において 20 mM D-Met に対して 28.4 U/mg の比活性を示し、TdDAAO_{del} は 20 mM D-Ala に対して 87.8 U/mg の比活性を示した。37°C における野生型 ReDAAO と TdDAAO の比活性はそれぞれ 79.2 U/mg (D-Val) と 50.8 U/mg (D-Met) であることから、ReDAAO の活性は YVLQG 配列の挿入により減少し、TdDAAO の活性は YVLQG 配列の欠失により増加することが分かった。

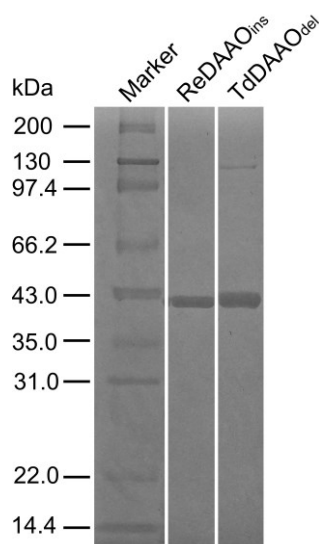


Fig. 3-9. 精製した ReDAAO_{ins} と TdDAAO_{del} の SDS-PAGE 解析

Marker, 分子量マーカー；ReDAAO_{ins} (2.0 μg)；TdDAAO_{del} (2.0 μg). 12.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いてタンパク質分離し、CBB-G250 を用いて染色した。

2.3.3. ReDAAO_{ins}とTdDAAO_{del}の基質特異性解析

精製した ReDAAO_{ins} と TdDAAO_{del} を用いて、基質特異性を解析した (Table 3-10)。その結果、*E. coli* 粗抽出液の結果と同様に、ReDAAO_{ins} は D-Met に対して最も高い活性 (28.4 U/mg) を示し、野生型 TdDAAO が高い活性を示した D-Leu, D-Tyr, D-Phe や D-Trp といった嵩高い疎水性 D-アミノ酸と D-Gln に対しても高い相対活性を示した。一方、野生型 ReDAAO が比較的高い活性を示した疎水性の D-Val, D-Ile, D-allo-Ile や D-Ala, 酸性の D-Glu, 塩基性の D-Arg や中性の D-Ser と D-allo-Thr に対する相対活性は大きく低下した。

TdDAAO_{del} は D-Ala に対して最も高い活性 (87.8 U/mg) を示し、野生型 ReDAAO が高い活性を示した D-Phe, D-Met, D-Val, D-Ile に対しても高い相対活性を示すようになった。また、野生型 TdDAAO が高い活性を示さなかった中性 D-アミノ酸の D-Glu, D-Ser および D-allo-Thr に対しても高い相対活性を示した。さらに、野生型 TdDAAO がほとんど活性を示さなかった D-Thr や D-allo-Ile にも 10–20%の相対活性を示すようになった。

以上の結果より、粗抽出液を用いた基質特異性解析と同様に、精製酵素を用いた解析においても、ReDAAO に TdDAAO 特異的な YVLQG 配列を挿入することで ReDAAO の基質特異性が TdDAAO のように狭くなり、逆に基質特異性が狭い TdDAAO から YVLQG 配列を除くことで TdDAAO の基質特異性が ReDAAO のように広がったといえる。このことから、ReDAAO の広い基質特異性は TdDAAO に存在する YVLQG 配列が無いことに起因することが明らかとなった。

Table 3-10. ReDAAO_{ins} と TdDAAO_{del} の基質特異性

Substrates	ReDAAO _{ins}	ReDAAO	TdDAAO _{del}	TdDAAO
	Relative activity \pm SD (%)			
D-Asp	1.4 \pm 0.1	2.5 \pm 0.1	2.0 \pm 1.7	0.3 \pm 0.1
D-Glu	6.0 \pm 0.2	53.0 \pm 0.8	62.3 \pm 5.6	0.4 \pm 0.1
D-Arg	14.1 \pm 1.1	45.9 \pm 2	24.2 \pm 2.5	12.2 \pm 0.6
D-Lys	10.3 \pm 0.6	12.6 \pm 1.4	17.8 \pm 1.4	7.9 \pm 0.4
D-His	31.5 \pm 4.1	30.6 \pm 3.8	29.6 \pm 2.4	34.4 \pm 3.5
D-Asn	46.6 \pm 2.7	27.6 \pm 0.7	47.2 \pm 4.5	22.0 \pm 1.4
D-Gln	81.5 \pm 11.3	60.5 \pm 11.8	82.9 \pm 12.4	68.4 \pm 7.5
D-Phe	77.4 \pm 5.4	82.3 \pm 9.6	84.1 \pm 13.3	88.5 \pm 12.8
D-Leu	79.2 \pm 7.2	64.6 \pm 5.3	79.2 \pm 9.7	96.2 \pm 4.1
D-Met	100	74.2 \pm 2.3	91.9 \pm 12.9	100
D-Ala	36.9 \pm 1.2	70.0 \pm 15.9	100	17.2 \pm 1.5
D-Tyr	64.5 \pm 9.1	30.4 \pm 0.8	41.2 \pm 3.6	89.0 \pm 13.1
D-Val	3.1 \pm 0.2	100 \pm 6.5	60.7 \pm 10.6	<0.1
D-Pro	2.3 \pm 0.1	5.2 \pm 0.4	4.4 \pm 0.3	<0.1
D-Ser	28.7 \pm 0.2	41.3 \pm 4.7	50.7 \pm 7.9	6.8 \pm 0.5
D-Thr	0.6 \pm 0.1	16.1 \pm 1.1	14.0 \pm 1.2	<0.1
D- <i>allo</i> -Thr	12.9 \pm 0.2	53.2 \pm 2.2	60.8 \pm 0.6	5.4 \pm 0.3
D-Trp	51.0 \pm 1.8	17.3 \pm 3.8	14.0 \pm 1.7	61.4 \pm 3.3
D-Ile	3.5 \pm 0.2	88.4 \pm 5.3	62.8 \pm 12.3	0.6 \pm 0.3
D- <i>allo</i> -Ile	1.9 \pm 0.2	44.6 \pm 2.5	22.5 \pm 0.5	<0.1

1.5 mM D-Tyr を除く、各 20 mM D-アミノ酸を基質として 37°C, pH 8.0, 4-AA/HRP カップリング法によりオキシダーゼ活性を測定した。ReDAAO_{ins} と TdDAAO WT は D-Met に対する比活性 (28.4 と 50.8 U/mg) をそれぞれ 100% とし、TdDAAO_{del} は D-Ala に対する比活性 (87.8 U/mg) を 100% とし、ReDAAO WT は D-Val に対する比活性 (79.2 U/mg) を 100% とした相対活性を示した。測定は 3 回行い、平均値を示した。SD は標準偏差を示す。

2.3.4. ReDAAO_{ins}とTdDAAO_{del}の酵素反応速度論的パラメーター解析

ReDAAO と TdDAAO における YVLQG 配列の挿入と欠失の基質特異性に対する影響をより詳細に理解するため、野生型 ReDAAO の良基質かつ野生型 TdDAAO の貧基質である酸性の D-Glu, 塩基性の D-Arg および疎水性の D-Val と D-Ala, そして両 DAAO の良基質である疎水性の D-Met と D-Phe の 6 種の D-アミノ酸に対する ReDAAO_{ins} と TdDAAO_{del} の酵素反応速度論的パラメーターを解析した (Table 3-11). その結果, ReDAAO_{ins} の D-Glu, D-Met, D-Val, D-Ala, D-Phe および D-Arg に対するそれぞれの k_{cat} は野生型 ReDAAO の約 1/2.4 から 1/19 であり, 特に D-Glu に対する k_{cat} の低下 (1/19) が顕著であった. また, D-Phe を除くこれら D-アミノ酸に対する K_m は野生型 ReDAAO の約 1.3 から 12 倍であり, 特に D-Met に対する K_m の増加が顕著であった. 一方, D-Phe に対する K_m は低下 (1/1.5) した. 結果として, これら D-アミノ酸に対する $k_{cat} K_m^{-1}$ は野生型 ReDAAO の約 1/2 から 1/110 に低下し, 特に D-Val に対する低下 (1/110) が顕著であった.

他方, TdDAAO_{del} の D-Glu, D-Met, D-Val, D-Ala, D-Phe および D-Arg に対する k_{cat} は野生型 TdDAAO の約 1.5 から 1,000 倍であり, 特に D-Glu と D-Val に対する k_{cat} の増加 (それぞれ 1,000 倍と 980 倍) が顕著であった. また, D-Val と D-Phe を除くこれら D-アミノ酸に対する K_m は野生型 TdDAAO の約 1/1.2 から 1/10 であった. 一方, D-Val に対する K_m には変化はなく, D-Phe に対する K_m は野生型 TdDAAO の 4 倍であった. 結果として, これら D-アミノ酸に対する $k_{cat} K_m^{-1}$ は野生型 TdDAAO の約 3.7 から 1,800 倍となり, 特に D-Glu と D-Val に対する増加 (それぞれ 1,800 倍と 980 倍) が顕著であった. 一方, D-Phe に対する $k_{cat} K_m^{-1}$ は野生型 TdDAAO の約 1/2.3 であった.

以上の結果より, YVLQG 配列の存在は特に D-Glu と D-Val に対する k_{cat} に非常に大きな影響を与え, D-Met や D-Ala などに対しては K_m に比較的大きな影響を与えたことから, YVLQG 配列の存在は代謝回転数と基質親和性の両方に影響を与えると考えられた. また, その影響の程度は各 D-アミノ酸で異なると考えられた.

Table 3-11. ReDAAO_{ins} と TdDAAO_{del} の酵素反応速度論的パラメーター

D-Glu	$k_{\text{cat}} \pm \text{SD} (\text{s}^{-1})$	Variant/WT	$K_{\text{m}} \pm \text{SD} (\text{mM})$	Variant/WT	$k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1} (\text{s}^{-1} \text{M}^{-1})$	Variant/WT
ReDAAO _{ins}	2.1 ± 0.1	1/19	10.6 ± 0.8	2.1	198	1/40
ReDAO WT	39.8 ± 0.4		5.0 ± 0.2		7,960	
TdDAAO _{del}	49.8 ± 1.0	1,000	5.0 ± 0.3	1/1.9	9,960	1,800
TdDAO WT	0.05 ± 0.01		9.3 ± 0.8		5.4	
D-Met	$k_{\text{cat}} \pm \text{SD} (\text{s}^{-1})$	Variant/WT	$K_{\text{m}} \pm \text{SD} (\text{mM})$	Variant/WT	$k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1} (\text{s}^{-1} \text{M}^{-1})$	Variant/WT
ReDAAO _{ins}	20.0 ± 0.5	1/2.4	0.94 ± 0.1	12	1,270	1/28
ReDAO WT	47.0 ± 1.0		0.08 ± 0.02		35,200	
TdDAAO _{del}	52.0 ± 1.0	1.5	0.34 ± 0.03	1/4.1	9,270	6.0
TdDAO WT	35.7 ± 0.8		1.4 ± 0.1		1,550	
D-Val	$k_{\text{cat}} \pm \text{SD} (\text{s}^{-1})$	Variant/WT	$K_{\text{m}} \pm \text{SD} (\text{mM})$	Variant/WT	$k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1} (\text{s}^{-1} \text{M}^{-1})$	Variant/WT
ReDAAO _{ins}	0.7 ± 0.01	1/86	1.6 ± 0.1	1.3	438	1/110
ReDAO WT	60.2 ± 1.6		1.2 ± 0.1		50,200	
TdDAAO _{del}	39.3 ± 0.4	980	2.4 ± 0.2	1.0	16,400	980
TdDAO WT	0.04 ± 0.01		2.4 ± 0.2		16.7	
D-Ala	$k_{\text{cat}} \pm \text{SD} (\text{s}^{-1})$	Variant/WT	$K_{\text{m}} \pm \text{SD} (\text{mM})$	Variant/WT	$k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1} (\text{s}^{-1} \text{M}^{-1})$	Variant/WT
ReDAAO _{ins}	15.8 ± 0.2	1/2.9	16.9 ± 1.0	5.1	935	1/15
ReDAO WT	45.3 ± 0.1		3.3 ± 0.1		13,700	
TdDAAO _{del}	72.0 ± 3.6	6.4	2.8 ± 0.4	1/10	25,700	66
TdDAO WT	11.2 ± 0.4		28.7 ± 3.3		390	
D-Phe	$k_{\text{cat}} \pm \text{SD} (\text{s}^{-1})$	Variant/WT	$K_{\text{m}} \pm \text{SD} (\text{mM})$	Variant/WT	$k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1} (\text{s}^{-1} \text{M}^{-1})$	Variant/WT
ReDAAO _{ins}	16.1 ± 0.3	1/3.1	0.33 ± 0.02	1/1.5	48,800	1/2.1
ReDAO WT	49.5 ± 0.5		0.49 ± 0.06		101,000	
TdDAAO _{del}	51.5 ± 0.6	1.7	0.88 ± 0.04	4.0	58,500	1/2.4
TdDAO WT	30.5 ± 0.4		0.22 ± 0.02		139,000	
D-Arg	$k_{\text{cat}} \pm \text{SD} (\text{s}^{-1})$	Variant/WT	$K_{\text{m}} \pm \text{SD} (\text{mM})$	Variant/WT	$k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1} (\text{s}^{-1} \text{M}^{-1})$	Variant/WT
ReDAAO _{ins}	7.6 ± 0.4	1/6.4	33.1 ± 3.7	2.6	230	1/17
ReDAO WT	48.7 ± 1.4		12.7 ± 1.3		3,830	
TdDAAO _{del}	34.0 ± 1.1	3.1	25.2 ± 2.2	1/1.2	1,350	3.7
TdDAO WT	10.8 ± 0.2		29.8 ± 1.5		362	

D-Glu は 0.5–100 mM, D-Met は 0.01–20 mM, D-Val は 0.1–50 mM, D-Ala は 0.1–100 mM, D-Phe は 0.1–20 mM および D-Arg は 0.1–150 mM を用いて, 37°C で 4-AA/HRP または AUR/HRP カップリング法によりオキシダーゼ活性を測定した. 測定は 3 回行い, その平均値を示した. SD は標準偏差を示す.

2.4. ReDAAO C230S バリエントの耐熱性解析

2.4.1. *E. coli*における ReDAAO C230S バリエントの発現と精製

ReDAAO の耐熱性における Cys230–Cys285 残基間の分子内 SS 結合の寄与を明らかにするため、Cys230 残基を Ser 残基に置換したバリエント (C230S) を作成し、*E. coli* BL21(DE3) pLysS で発現させ、His タグアフィニティーカラムを用いて精製した。精製した ReDAAO C230S を SDS-PAGE に供したところ、His タグ融合タンパク質としての分子質量 (43.0 kDa) に相当する位置に単一のタンパク質バンド (>95%以上) が観察され、電気泳動的に単一に精製されたことが分かった (Fig. 3-10)。精製した ReDAAO C230S は 37°C において 20 mM D-Val に対して 63.0 U/mg の比活性を示した。37°C における野生型 ReDAAO の比活性は 79.2 U/mg (D-Val) であることから、Cys230 残基の Ser 残基への置換は ReDAAO の活性へ大きな影響を与えないことが分かった。

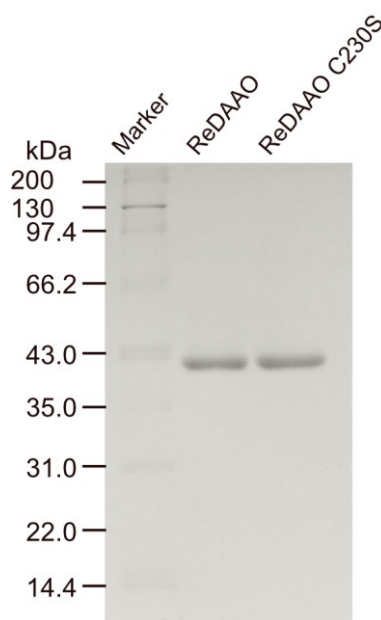


Fig. 3-10. 精製した ReDAAO と C230S バリエントの SDS-PAGE 解析

Marker, 分子量マーカー; ReDAAO (1.5 µg); ReDAAO C230S (1.5 µg). 12.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いてタンパク質分離し、CBB-G250 を用いて染色した。

2.4.2. ReDAAO C230S バリエーションの耐熱性測定

精製した ReDAAO C230S を用いて、30–70°C で 60 min 保温した後の残存活性を測定し、 T_{50}^{60} （初期活性の 50%が失われる 60 min の保温温度）を解析した（Fig. 3-11a）。その結果、タンパク質濃度 0.04 mg/ml における C230S は野生型と同様に 45°C までは安定であったが、50°C 付近から徐々に失活し始め、56°C で完全に失活した。C230S の T_{50}^{60} は 52.3°C であり、同様の条件で測定された野生型の T_{50}^{60} は 60°C であったことから、C230S の T_{50}^{60} は野生型のものよりも約 8°C 低かった。したがって、SS 結合を失った C230S の耐熱性は野生型よりもかなり低いことが明らかとなった。

次に、ReDAAO C230S のタンパク質濃度による耐熱性への影響を明らかにするため、タンパク質濃度 4 または 0.4 mg/ml において 56°C で保温した際の初期活性の半減期 ($t_{1/2}$) を解析した（Fig. 3-11b）。その結果、4 mg/ml における $t_{1/2}$ は 57.8 min であったが、0.4 mg/ml へタンパク質濃度を低下させると、 $t_{1/2}$ は 17.0 min と著しく短くなった。したがって、タンパク質濃度の減少により C230S の耐熱性は有意に低下することが明らかとなった。一方、野生型の 64°C における 4 と 0.4 mg/ml での $t_{1/2}$ はそれぞれ 21.6 と 18.6 min と、第2章における結果と同様に、タンパク質濃度の低下による耐熱性の低下はほんのわずかであった。

次に、ReDAAO C230S の FAD 添加による耐熱性への影響を明らかにするため、タンパク質濃度 0.4 mg/ml において 10 μ M FAD を添加し、56°C で保温した際の $t_{1/2}$ を解析した（Fig. 3-11b）。その結果、FAD 存在下での $t_{1/2}$ は 16.3 min であり、FAD 非存在下での $t_{1/2}$ （17.0 min）とほぼ同じであった。また、野生型 ReDAAO においても同様に FAD 添加影響を解析したところ、FAD 存在下での 0.4 mg/ml における $t_{1/2}$ は 18.9 min であり、FAD 非存在下での $t_{1/2}$ （18.6 min）とほぼ同じであり、第2章における結果と一致した。したがって、ReDAAO C230S の耐熱性は、野生型と同様に、FAD 添加によりほとんど向上しないことが分かった。

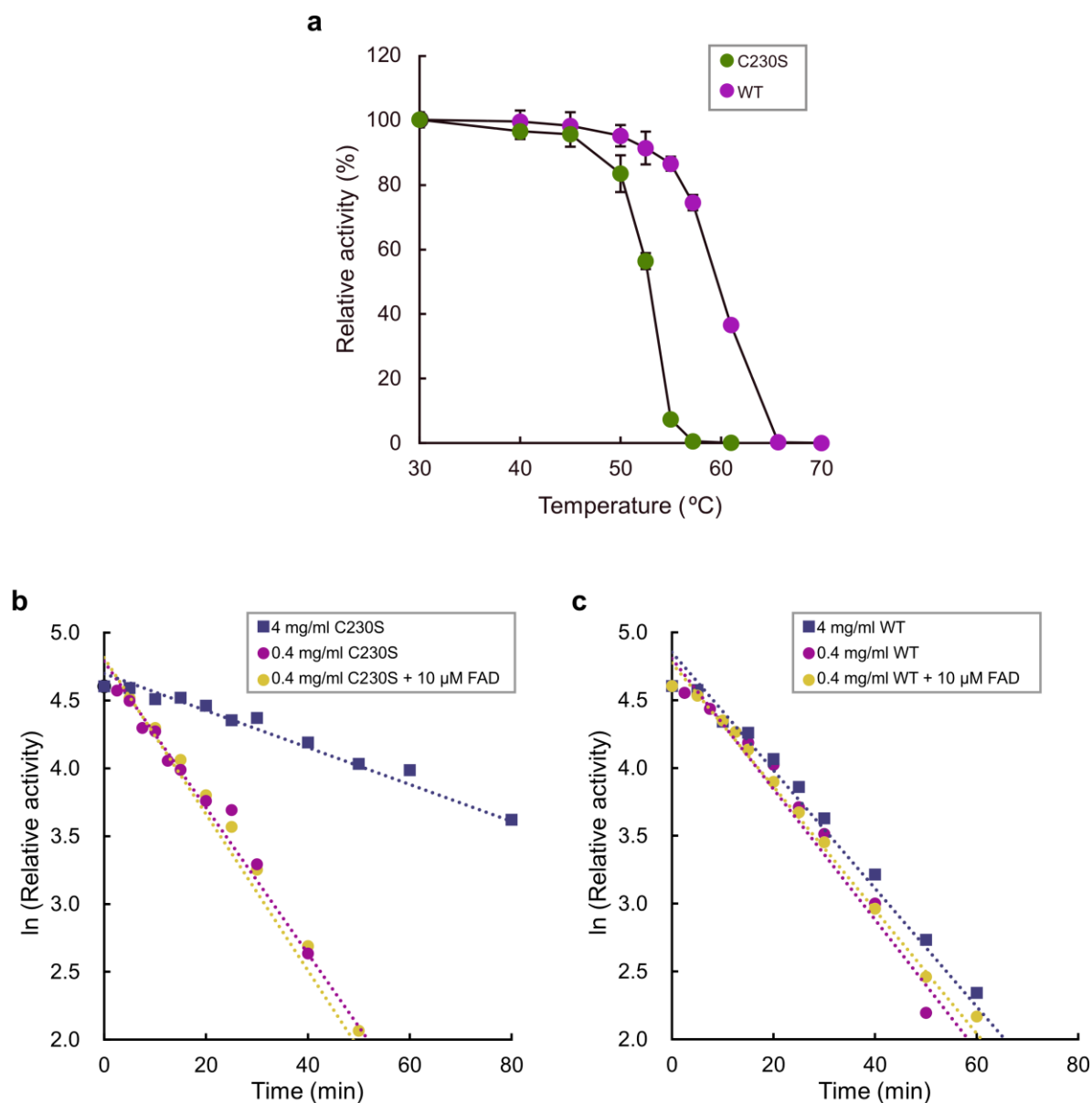


Fig. 3-11. ReDAAO C230S バリエントの耐熱性解析

(a) 温度が安定性に与える影響. 30–70°C で ReDAAO C230S と野生型 (WT) (それぞれタンパク質濃度 0.4 mg/ml) を 1 h 保温した後, 20 mM D-Val を基質として用いて, 20 μ M FAD 存在下で 4-AA/HRP 法により 37°C で残存活性を測定した. 30°C での保温後の残存活性を 100% とした相対活性で示した. 活性は 3 回測定し, その平均値を示した. エラーバーは標準偏差を示す. (b) ReDAAO C230S と (c) WT の失活変化. C230S と WT をそれぞれ 56°C と 64°C で 0–80 min 保温し, 経時的な残存 DAAO 活性を 20 mM D-Val を基質として用いて, 20 μ M FAD 存在下で 4-AA/HRP 法により 37°C で測定した. 各 DAAO における 0 min の活性値を 100 とした相対活性を示す. 活性は 3 回測定し, その平均値を示した. エラーバーは標準偏差を示す.

2.4.3. ReDAAO C230S バリエーションの四次構造解析

ReDAAO C230S バリエーションの四次構造をゲル濾過クロマトグラフィーにより解析した (Fig. 3-12a)。その結果、天然状態の C230S は野生型と同様に溶出体積 13 ml において単一のピークを示したことから、野生型と同様に四量体を形成していることが分かった。

次に、C230S の 56°C (60 min の保温で完全失活する温度) での変性過程における四次構造変化を解析した (Fig. 3-12a)。その結果、C230S の四量体に対応する溶出体積 13 ml におけるピークは保温時間とともに低下していったが、60 min までの低下分に対応する新たなピークは出現しなかった。このことから、ピーク減少分のタンパク質は不溶性の凝集体となり、ゲル濾過クロマトグラフィーに供する前のフィルター濾過により除去されたと考えられた。野生型 ReDAAO も 64°C で同様に解析したところ、C230S と同様に、60 min までのピーク減少分に対応するタンパク質の新たなピークの出現は観察されなかった (Fig. 3-12b)。これらの結果から、C230S と野生型の変性過程において、安定な二量体および単量体は存在せず、熱変性によって短時間で不溶性凝集体へ変化すると考えられた。一方、C230S の四次構造の大部分が喪失する 56°C で 60 min の保温後においても、野生型 ReDAAO のピークは未変性状態とほとんど同じ高さであった。したがって、SS 結合を喪失した C230S は野生型よりも低い温度で四次構造が喪失し、不溶性凝集体へ移行しやすいと考えられた。

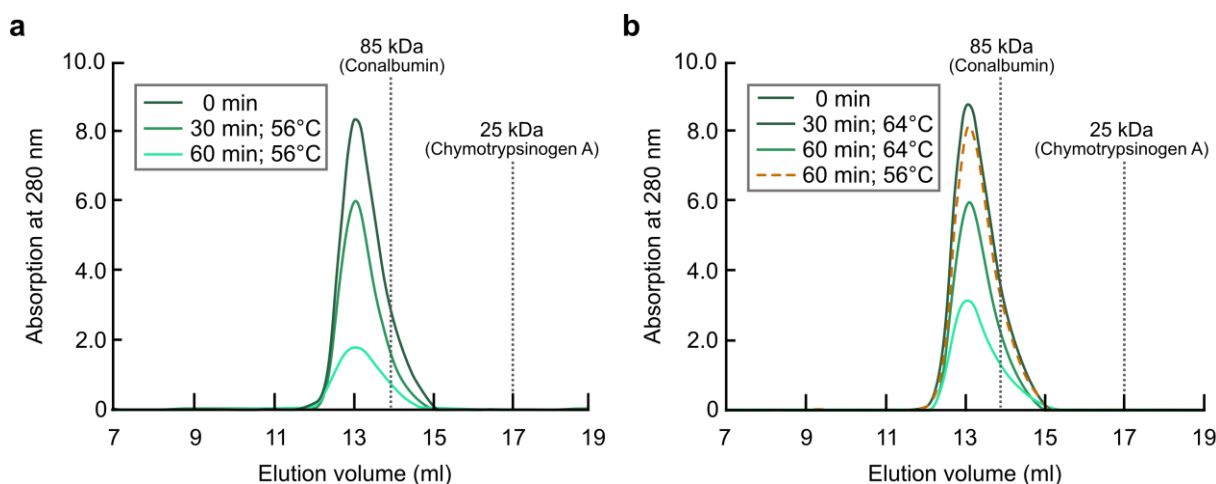


Fig. 3-12. ReDAAO C230S バリエーションと野生型の熱変性過程の四次構造解析

(a) C230S バリエーションと (b) 野生型 ReDAAO の熱変性過程のゲル濾過クロマトグラフィー解析。タンパク質濃度 0.4 mg/ml の C230S バリエーションと野生型 ReDAAO をそれぞれ 64°C と 56°C で 30 と 60 min 保温し、フィルターろ過により不溶性凝集体を取り除いた後、4°C でゲル濾過クロマトグラフィーに供した。標準タンパク質として chymotrypsinogen A (25 kDa) と conalbumin (85 kDa) をゲル濾過クロマトグラフィーに供した際のそれぞれの溶出体積に対応する位置を点線で示した。

3. 考察

ReDAAO の三次構造

リガンドが結合していない ReDAAO の β I1- β I2 間の Gln101-Lys114 残基の 13 アミノ酸残基は電子密度の乱れによって構造を決定することが出来なかった (Fig. 3-4). リガンドが結合していないタンパク質の結晶構造解析において、構造的な揺らぎが大きく、構造を決定できない領域は一般的に“disorder region”と呼ばれる(203). この disorder region は、リガンドの結合に関与しリガンドが結合した場合には固定され、構造が決定できる場合が多い。したがって、リガンドが結合していない ReDAAO 結晶構造の Gln101-Lys114 残基における電子密度の乱れが disorder region に起因するならば、 β I1- β I2 は基質の結合に関与すると考えられる。今後、基質や基質アナログとの複合体の結晶構造が明らかにすることで、 β I1- β I2 と基質結合の関係性が明らかにできると期待される。

ReDAAO の結晶構造において、RgDAAO の Tyr260 残基の側鎖は活性部位の外側に向いていた (Fig. 3-12, Fig. 3-13c). 一方、RgDAAO の D-Ala または CF₃-D-Ala との複合体 (PDB entry: 1C0P または 1C0L) では、ReDAAO の Tyr260 残基に対応する Tyr238 残基は活性部位内部に向いており、基質の α -カルボキシ基と水素結合を形成している (Fig. 3-13a). RgDAAO において、基質と結合した構造は“closed form”と呼ばれている。一方、阻害剤の anthranilate が結合した構造 (PDB entry: 1C0I) は生成物を放出するための構造を表しているとされ“opened form”と呼ばれ、Tyr238 残基の側鎖は、ReDAAO の Tyr260 残基と同様に、活性部位の外側に向いている (Fig. 3-13b) (204). したがって、本研究で得られた基質を含まない ReDAAO の結晶構造は“opened form”であると考えられる。ReDAAO においても、基質 D-アミノ酸が結合した状態では、RgDAAO の Tyr238 残基と同じように、Tyr260 残基の側鎖は活性部位に内部に向く可能性が考えられる。

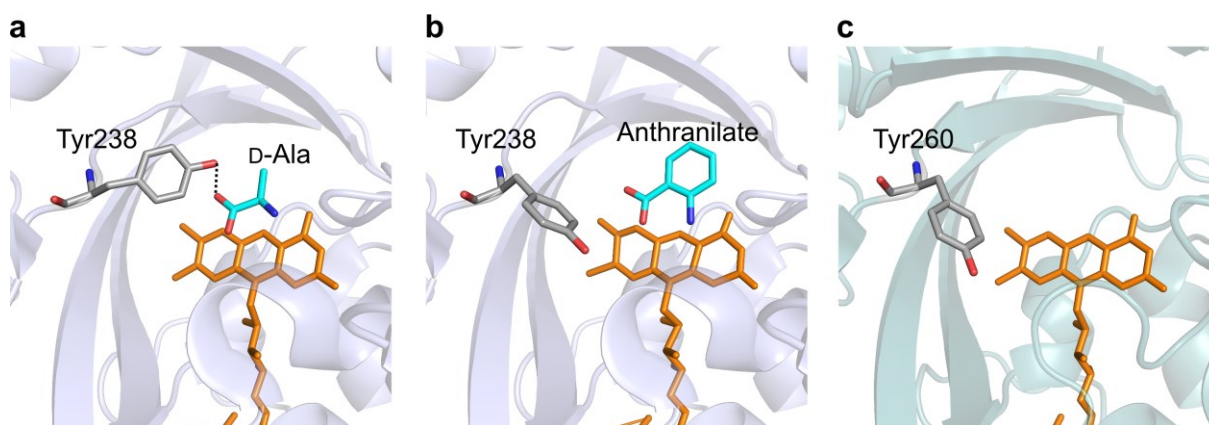


Fig. 3-13. RgDAAO の“closed form”と“opened form”における Tyr238 残基の側鎖の配向

(a) RgDAAO の closed form (PDB entry: 1C0P) と (b) opened form (PDB entry: 1C0I) および (c) ReDAAO (PDB entry: 7CT4) の活性部位. 原子の配色: 炭素原子, 灰 (アミノ酸残基) とシアン (基質 D-Ala と阻害剤 anthranilate); 窒素原子, 青; 酸素原子, 赤; 硫黄原子, 黄. FAD は橙で示した. 点線は水素結合を示す. PyMOL ver 2.4 を用いて作図した.

一般的に、タンパク質の構造安定性には、オリゴマー化、疎水性相互作用、水素結合、塩橋、SS結合などの様々な因子が関与することが知られている(116-119)。高い耐熱性を有する ReDAAO と耐熱性の低い RgDAAO と pkDAAO のサブユニット構造内部における種々の相互作用数を比較したところ、ReDAAO にのみ存在する Cys230–Cys285 残基間の分子内 SS 結合を除き、大きな差は見出されなかった (Table 3-4, Table 3-12)。したがって、Cys230–Cys285 残基間の分子内 SS 結合が ReDAAO の高い耐熱性の要因の一つと考えられた。ReDAAO が局在すると考えられるペルオキシソーム内の酸化還元状態については議論されている状況ではあるが、真菌 *C. boidinii* や動物 (CHO) 細胞ではペルオキシソーム内部は細胞質よりも還元状態である可能性が報告されている (205)。したがって、ReDAAO はペルオキシソーム内で SS 結合を形成していない可能性が考えられる。しかし、酵素近傍では反応に伴い生成される過酸化水素により局所的な酸化状態が発生することで、SS 結合を形成できる可能性は考えられる。

Table 3-12. RgDAAO と pkDAAO のサブユニット内相互作用数

Interactions	ReDAAO	RgDAAO	pkDAAO
	The number of interactions/subunit		
Hydrophobic interactions (HI)	281	281	292
Disulfide bonds (SS)	1	0	0
Hydrogen bonds (HB)	608	668	609
Salt-bridge (SB)	19	21	19
π - π interactions ($\pi\pi$)	11	13	19

Protein Interaction Calculator (<http://pic.mbu.iisc.ernet.in/>) を用いて各 DAAO のサブユニット内相互作用数を定量した。各 DAAO の PDB entry を以下に示す：ReDAAO, 7CT4；RgDAAO, 1C0I；pkDAAO, 1VE9。

ReDAAO の四次構造

X 線結晶構造解析により, ReDAAO は二量体である pkDAAO や RgDAAO とは異なり, head-to-tail 型の二量体が会合した dimer-of-dimers 様式の四量体を形成することが明らかとなった (Fig. 3-14b). Head-to-head 型の二量体を形成する pkDAAO は α I3- β I8 間の 7 アミノ酸残基からなるループが対面する形で二量体を形成する (Fig. 3-14d). ReDAAO や RgDAAO の α I3- β I8 間のループは pkDAAO よりも 8 アミノ酸残基長い 15 アミノ酸残基からなり, pkDAAO と同様の head-to-head 型の二量体を形成しようとする α I3- β I8 間のループ間で立体障害が生じる可能性があるため, ReDAAO と RgDAAO は head-to-head 様式で会合できないと考えられた. また, ReDAAO は, RgDAAO と同様に, head-to-tail 様式で会合するが, RgDAAO の二量体化に重要な役割を果たす 21 アミノ酸残基 (Pro302-Glu322 残基) からなる β F5- β F6 間のループ (二量体化ループ) が存在しない. RgDAAO の二量体化ループを欠失させたバリエーションのサブユニット間相互作用面積は野生型の半分となるため, バリエーションは二量体を形成できないと報告されている (206). したがって, 二量体化ループを有さない ReDAAO は RgDAAO とは異なる様式で会合していると考えられた (Fig. 3-14a).

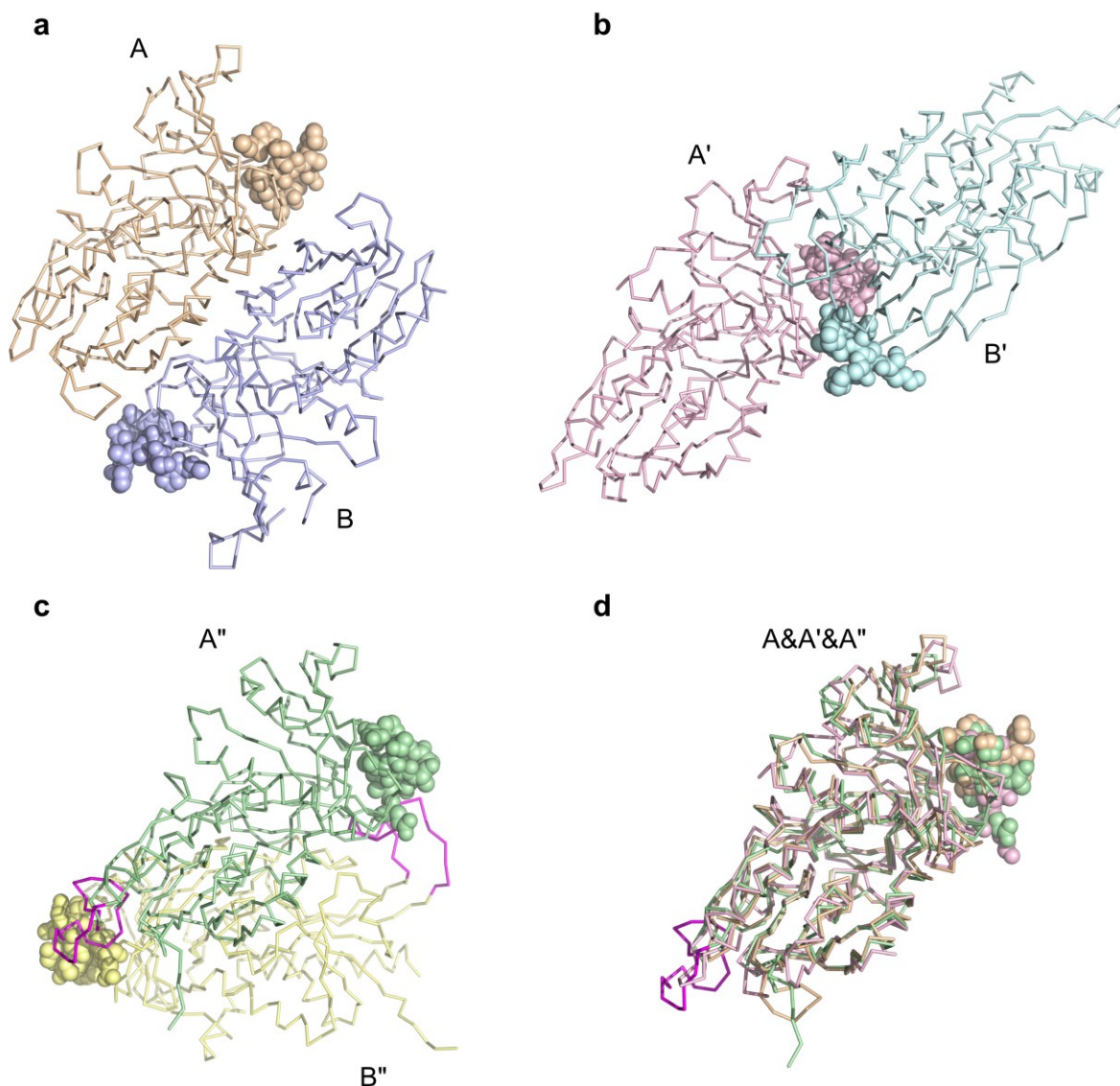


Fig. 3-14. ReDAAO, pkDAAO および RgDAAO の二量体形成様式

(a) ReDAAO の head-to-tail 型二量体. (b) pkDAAO の head-to-head 型二量体. (c) ReDAAO の head-to-tail 型二量体. (d) ReDAAO (PDB entry: 7CT4), pkDAAO (PDB entry: 2DU8) および RgDAAO (PDB entry: 1C0P) のサブユニット A の重ね合わせ. pkDAAO の head-to-head 型の二量体化に寄与する α I3- β I8 間のループとこれに対応する ReDAAO と RgDAAO のループを小球モデルで示した. バックボーンモデルの配色: 黄土色, ReDAAO のサブユニット A (A); 青, ReDAAO のサブユニット B (B); ピンク, pkDAAO のサブユニット A (A'); シアン, pkDAAO のサブユニット B (B'); 緑, RgDAAO のサブユニット A (A''); 黄, RgDAAO のサブユニット B (B''); マゼンタ, RgDAAO の β F5- β F6 間の二量体化ループ. 各 DAAO の構造の描画と重ね合わせには *PyMOL ver. 2.4* (<https://pymol.org/2/>) を用いた.

いくつかの酸化還元酵素や異性化酵素などにおいて、サブユニット間の相互作用がタンパク質の耐熱性に寄与することが報告されている(207). ReDAAO (サブユニット A-B または C-D), RgDAAO および pkDAAO における二量体サブユニット間の種々の相互作用数を比較したところ, ReDAAO の二量体間の相互作用数は他の DAAO と同等か少なかった (Table 3-13). 一方, ReDAAO 四量体におけるサブユニット間の種々の相互作用数は, サブユニット相互作用面積が増加するため, 二量体の RgDAAO と pkDAAO よりも多くなった (Table 3-13). 好熱性古細菌や好熱性細菌由来の酵素は常温性生物由来の酵素と比較して, より高次の多量体を形成することで相対的により多くのサブユニット間相互作用を形成し, 耐熱性を獲得すると考えられている(195, 208). したがって, ReDAAO においても同様に高い耐熱性は四量体の形成に起因すると考えられた.

Table 3-13. ReDAAO と既知 DAAO とのサブユニット間相互作用数の比較

Interactions	ReDAAO		RgDAAO	pkDAAO
	A-B	A-B-C-D	A-B	A-B
The number of interactions/subunit-subunit				
Hydrophobic interactions (HI)	10	40	13	11
Disulfide bonds (SS)	0	0	0	0
Hydrogen bonds (HB)	12	34	14	18
Salt-bridge (SB)	2	4	2	3
π - π interactions ($\pi\pi$)	1	2	0	1

Protein Interaction Calculator (<http://pic.mbu.iisc.ernet.in/>) を用いて各 DAAO のサブユニット内相互作用数を定量した. 各 DAAO の PDB entry を以下に示す: ReDAAO, 7CT4; RgDAAO, 1C0I; pkDAAO, 1VE9.

ReDAAO における Arg97 と Ser231 残基の D-Glu 活性への寄与

一般的に DAAO は中性および塩基性 D-アミノ酸を基質とし, DDO の基質である酸性 D-アミノ酸は基質としない(38, 209). しかし興味深いことに, ReDAAO は DAAO の基質である中性と塩基性 D-アミノ酸に加え DDO の基質である D-Glu にも高い活性を示した (Table 2-2). 既知の真菌や動物由来 DDO の結晶構造や部位特異的変異導入実験から, 活性部位上部に存在する Arg 残基が酸性 D-アミノ酸側鎖のカルボキシ基と相互作用することで, DDO の酸性 D-アミノ酸に対する活性に寄与することが示されている(52, 88). ReDAAO 結晶構造における活性部位上部には, いくつかの塩基性アミノ酸残基 (Arg97, Lys99 および Lys114 [disorder] 残基) が確認されたが, 変異導入解析から, これら塩基性アミノ酸残基のうち Arg97 残基の置換においてのみ D-Glu に対する顕著な活性低下が観察された (Fig. 3-6, Table 3-7). このことから, DDO と同様, 活性部位上部に存在する Arg 残基が酸性 D-アミノ酸に対する活性に重要と考えられた. 特に, R97 は D-Glu に対す

る k_{cat} に大きく寄与することが示された。現在、DAAO の反応に伴う基質 D-アミノ酸による FAD の還元は、基質 α -H の FAD N(5) への直接的なヒドリド転移によって考えられており、効率的な反応には、基質結合親和性以外に、基質 α -H と FAD N(5) の適切な位置関係が大切であると考えられている(80)。この基質の基質結合部位における適切な配置は、基質結合部位におけるアミノ酸残基と基質 α -カルボキシ基、 α -アミノ基および側鎖との相互作用で成り立つことから、Arg97 残基は D-Glu 側鎖と相互作用することで、反応に適切な位置に基質を配置する役割を担っている可能性が考えられる。また、Arg97 残基のグアニジノ側鎖は基質結合部位から幾分離れていること、前述の disorder region と予想されたループに位置すること、Arg97 残基に対応する ChDDO の Arg243 残基は基質の結合に伴い大きく動くことが結晶構造解析により明らかにされていることから、Arg97 残基は D-Glu の結合に伴って動くことで、D-Glu を基質結合部位内部に引き入れることで分子活性に寄与する可能性も考えられる。

加えて、ReDAAO の活性部位上部に Ser231 残基が存在し、変異導入解析から Ser231 残基も D-Glu 側鎖と相互作用することで活性に寄与すると考えられた (Fig. 3-6, Table 3-7)。特に、Ser231 残基は D-Glu に対する基質結合能に大きく寄与することが示された。現在までに、DAAO と DDO において、酸性 D-アミノ酸の側鎖と Ser 残基が相互作用する例は報告されていないが、細菌 *Helicobacter pylori* 由来 glutamate racemase の Ser8 残基 (Fig. 3-15a) と細菌 *Clostridium symbiosum* 由来 glutamate dehydrogenase の Ser380 残基 (Fig. 3-15b) がそれぞれ基質 D-Glu と L-Glu の γ -カルボキシ基と水素結合を形成することが結晶構造解析から明らかにされている(210, 211)。したがって、既知の DAAO の活性部位上部に Arg や Ser 残基を導入することで、その基質特異性を改変・拡張できる可能性が期待できる。

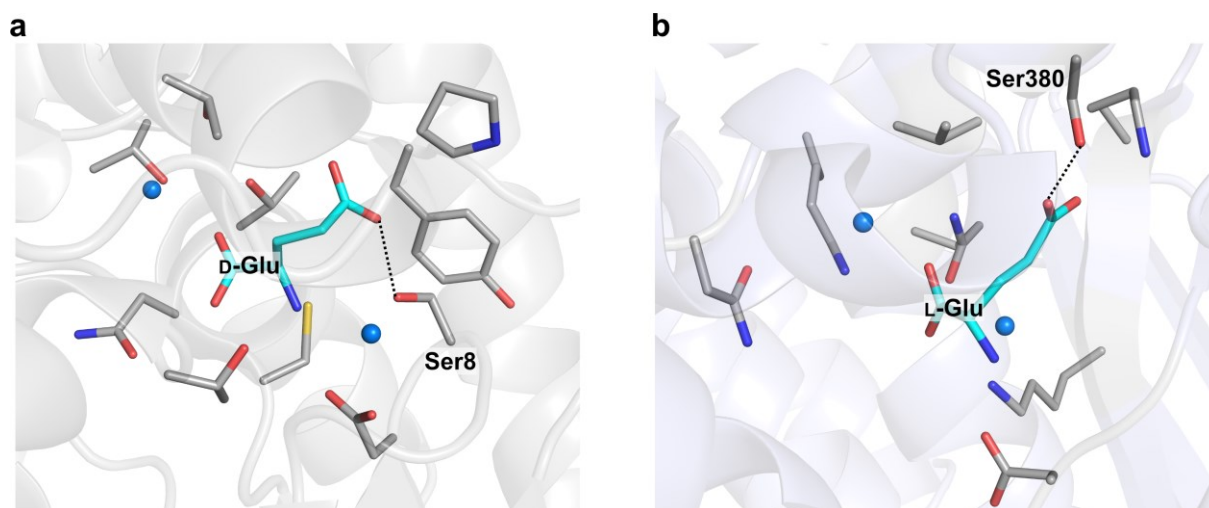


Fig. 3-15. *H. pylori* glutamate racemase と *C. symbiosum* glutamate dehydrogenase の活性部位における Ser 残基の D-Glu と L-Glu との相互作用

(a) *Helicobacter pylori* 由来 glutamate racemase (PDB entry: 2JFX) と (b) *Clostridium symbiosum* 由来 glutamate

dehydrogenase (PDB entry: 1BGV) の基質結合部位。原子の配色：炭素原子，灰（アミノ酸残基）とシアン（基質 D-Glu と L-Glu）；窒素原子，青；酸素原子，赤；硫黄原子，黄。青の小球は水分子を示す。点線は水素結合を示す。PyMOL ver 2.4 を用いて作図した。

YVLQG 配列が基質特異性に与える影響

ReDAAO の広基質特異性は TdDAAO に見出された YVLQG 配列が無いことに起因すると考えられた (Table 3-10)。他の DAAO における YVLQG 配列の有無と対応するアミノ酸配列を確認したところ (Fig. 3-16)，広基質特異性を有する RgDAAO と TvDAAO において YVLQG 配列は存在せず，対応する位置にはそれぞれ Phe61–Leu64 残基と Phe53 残基の存在が観察された。また，中程度の広さの基質特異性を有する pkDAAO と hDAAO においても YVLQG 配列は存在せず，それぞれ Tyr55–Glu58 残基と Tyr55–Asp58 残基が存在した。さらに，狭い基質特異性を有する RxDAAO においても YVLQG 配列は存在せず，Tyr54–Tyr57 残基が存在した。よって，YVLQG 配列の有無が基質特異性の広さに寄与することは全ての DAAO に当てはまるのではなく，好熱性真菌 DAAO に特異的と考えられた。

```

TdDAAO  MEN-TNIVVLGAGVIGLTTALLSRDPKKKITV-VAKHMPGDYDI-EYASPWAGANYLPYVLQGVGAENNKVGKFEKATWPLRDLAENC 87
ReDAAO  MAT-NNIVVLGAGVSGLTAWLLSKDPSNKITV-AAKHMPGDYDI-EYCSPWAGANYLPVG-----AENSRVQWNERATWPLRDIAQNH 82
RgDAAO  MHSQKRVVVLGSGVIGLSSALLARKG-YSVHI-LARDLPEDVSSQTFASPWAGANWTFMTL---TDGPRQAKNEESTFKKWVEIVPT- 84
TvDAAO  MA---KIVVIGAGVAGLTALQLLRKG-HEVTI-VSEFTPGDLSI-GYTSPWAGANWLTFT-----YDGGKLADYDAVSYPILRELARSS 78
pkDAAO  M----RVVIGAGVIGLSTALCIHERY-HSVLQPLDVKVYADRFTPTTTDVAAGLWQRYTSE---PSNPQEANNNQQTFFNYLLSHIGSP 82
hDAAO  M----RVVIGAGVIGLSTALCIHERY-HSVLQPLHIKVYADRFTPLTTDVAAGLWQPYLSD---PNNPQEADWSQQTFFDYLLSHVHSP 82
RxDAAO  MRDCGSAVVVCGVIGLSAALLVLRERG-FGVRV-VAREPPER-----TTSAVAAAVVWYPYRAY---P-EDRVLRLNGARTYEVFRGLAAD- 78

```

Fig. 3-16. DAAO における YVLQG 配列の有無

青塗りは TdDAAO の YVLQG 配列に対応するアミノ酸配列を示す。T-Coffee Server (<http://tcocoffee.org.cat/>) を用いてアライメントを行った。用いた DAAO の protein ID または accession No. を以下に示す：TdDAAO, Td001973；ReDAAO, A0A499UB99；RgDAAO, P80324；TvDAAO, Q99042；pkDAAO, P00371；hDAAO, P14920；RxDAAO, BAP18969。

ReDAAO_{ins} と TdDAAO_{del} の酵素反応速度論的パラメーターの解析において，YVLQG 配列の存在は D-Glu と D-Val に対する k_{cat} を著しく低下させたことから (Table 3-11)，恐らく YVLQG 配列は，基質結合部位への基質の適切な配置を立体障害により邪魔することで，活性を低下させる可能性が考えられる。興味深いことに，D-Glu にほとんど活性を示さない TdDAAO においても，ReDAAO の D-Glu に対する活性に重要な Arg97 と Ser231 残基に対応する位置に Arg102 と Ser236 残基が存在した (Fig. 3-17b)。TdDAAO から YVLQG 配列を欠失させると D-Glu に対する K_m の変化はあまり大きくないが， k_{cat} が大幅に増加したことから，YVLQG 配列が基質（特に D-Glu と D-Val）の適切な配置に影響を与えていることが分かる (Table 3-11)。このことから，本来 TdDAAO も D-Glu に対する高い触媒能を有するが，あえて YVLQG 配列を挿入することで，D-Glu に対する

活性を低下させていると考えられる。これは、第1章で述べたように、同じ宿主 *T. dupontii* に存在する TdDDO が D-Glu に対して非常に高い触媒活性を有していることから、DAAO があえて D-Glu に対応する必要がないことが要因と考えられる。一方、YVLQG 配列が存在すると、無い場合と比較して、D-Tyr や D-Trp などの芳香環を有する D-アミノ酸に対する相対活性が高く（YVLQG 有り: 51–89%, 無し: 14–41%; Table 3-10), また D-Phe に対する K_m 値が 1.5–4 倍ほど低かったことから (Table 3-10), 恐らく芳香環を有する阻害剤が結合した pkDAAO や hDAAO の Tyr224 のように(67), YVLQG 配列における Tyr 残基の芳香環と基質側鎖の芳香環の π - π 相互作用がこれら D-アミノ酸の結合に有利に働いていると考えられる。したがって、YVLQG 配列は、芳香環を有する D-アミノ酸に対して効率的に反応するために存在する可能性が考えられる。

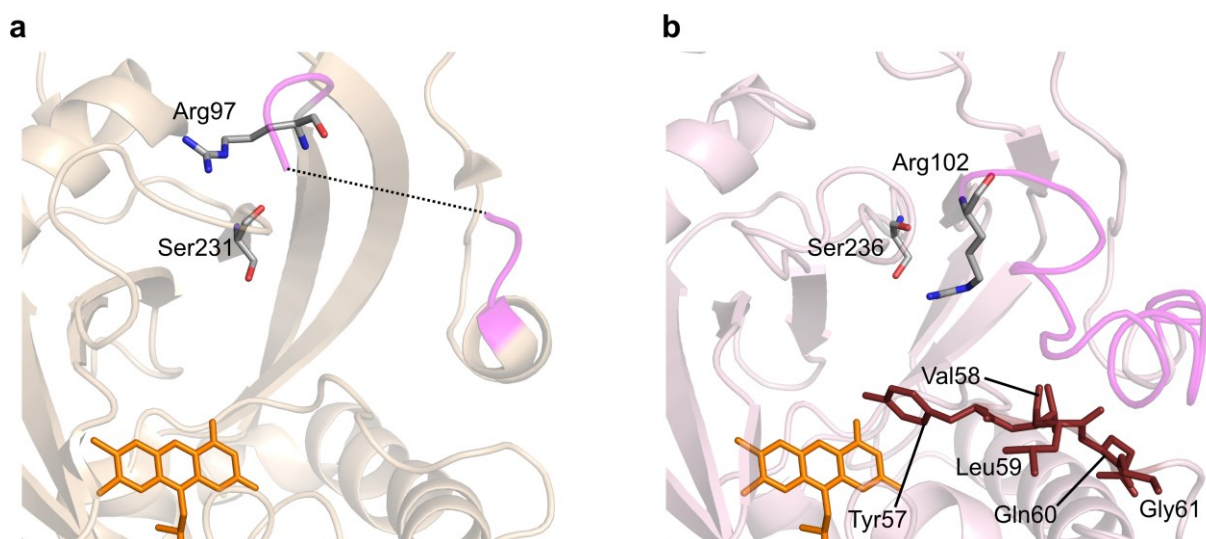


Fig. 3-17. ReDAAO と TdDAAO の D-Glu への作用に寄与する Ser と Arg 残基

(a) ReDAAO (PDB entry: 7CT4) と (b) TdDAAO モデル構造の活性部位。原子の配色：炭素原子, 灰; 酸素原子, 赤; 窒素原子, 青。FAD は橙で示し, TdDAAO の YVLQG 配列は茶で示した。ReDAAO の disorder region と TdDAAO のこれに対応する領域をマゼンタで示した。点線は構造の決定できなかった Gln101–Lys114 残基を示す。TdDAAO モデル構造は I-TASSER On-line Server (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) を用いて構築した。PyMOL ver 2.4 (<https://pymol.org/2/>) を用いて作図した。

ReDAAO 分子内 SS 結合の耐熱性への寄与

ReDAAO に特異的な分子内 SS 結合 (Cys230–Cys285 残基) を欠失させたバリエーション (ReDAAO C230S) の T_{50}^{60} は野生型よりも約 8°C 低かったことから、SS 結合が ReDAAO の耐熱性に寄与することが明らかとなった (Fig. 3-11a). この SS 結合はサブユニット内で形成されていることから、サブユニットの耐熱性の増加が四量体の耐熱性の増加を引き起こしたと考えた。しかし、ゲル濾過クロマトグラフィーによる熱変性過程の構造解析において、野生型 ReDAAO および C230S ともに単量体の存在が観察されず、四量体から直ちに変性・凝集すると考えられたこと (Fig. 3-12ab), C230S では、野生型と異なり、タンパク質濃度の減少に伴う耐熱性の低下が観察されたことから (Fig. 3-11bc), SS 結合は四量体におけるサブユニット間相互作用を安定化することで耐熱性に寄与すると考えられる。そこで、ReDAAO の分子内 SS 結合がサブユニット間相互作用の安定化にどのように寄与するか推測するため、SS 結合近傍のサブユニット間相互作用部位を観察したところ (Fig. 3-18ab), サブユニット A-B 間 (Sub A-B) において、Cys230 (A) 近傍のループに Arg223 (A) が存在し、その側鎖は Sub B の Lys35 (B) 主鎖のカルボニル基と水素結合を形成していた。さらに、Lys35 (B) のカルボニル基は同じ Sub B の Arg171 (B) 側鎖と、Arg171 残基 (B) 側鎖はさらに Asp40 (B) の側鎖と塩橋を形成していた (Fig. 3-18a)。また、Cys285 (A) 近傍の β -strand (β I8) には Arg302 (A) が存在し Asp40 (B) と塩橋を形成している可能性が示唆された。したがって、Cys230–Cys285 残基間の SS 結合は、Sub A-B 間の相互作用に関わる Arg223 と Arg302 残基を固定することで、間接的にサブユニット間相互作用を安定化していると考えられた。一方、Sub A-C 間では、Cys285 (A) が存在する α -helix (α I3) には、Sub B と疎水性相互作用している Pro271 (A), Val275 (A) と Met278 (A) や、Sub B の Asp299 (B) および Ile300 (B) の主鎖カルボニル基と水素結合を形成している Asn272 (A) が存在した (Fig. 3-18b)。したがって、Sub A-C 間では、SS 結合は α I3 を固定することで、間接的に Sub A-C 間の相互作用を安定化していると考えられた。一方、Sub A-D 間の相互作用部位は Cys230 残基や Cys285 残基から遠いため、SS 結合による相互作用の安定化はないと考えられた。以上の観察結果より、Cys230–Cys285 残基間の分子内 SS 結合は、サブユニット A-B および A-C 間の相互作用を安定化させることで、ReDAAO の耐熱性に寄与する可能性があると考えられた。現在のところ、ReDAAO の分子内 SS 結合はサブユニット構造自身も安定化する可能性があるが、単量体のみを取り出すことができないため、サブユニット構造の耐熱性にどの程度寄与しているのかは現在のところ不明である。

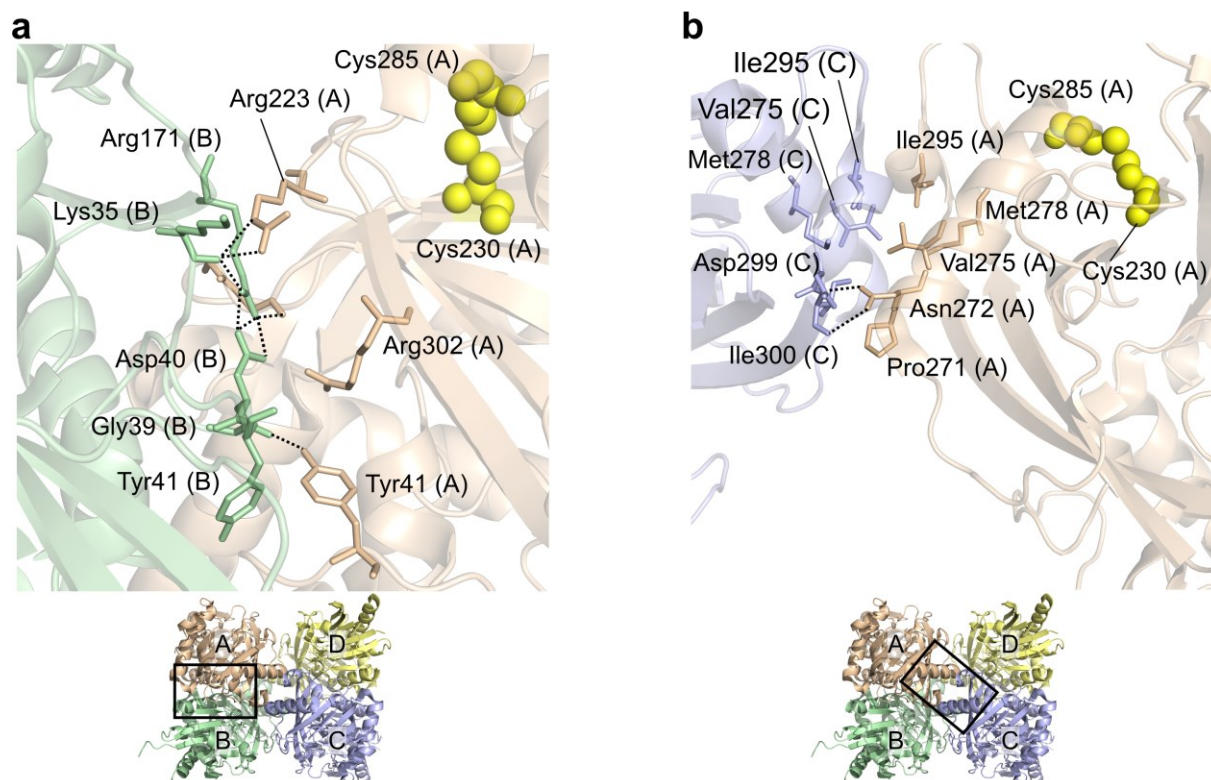


Fig. 3-18. ReDAAO 四量体における SS 結合近傍のサブユニット間相互作用

(a) サブユニット A-B 間と (b) サブユニット A-C 間の相互作用部位。配色：サブユニット A，橙；緑，サブユニット B；青，サブユニット C。黄の小球は Cys230 と Cys285 残基を示す。点線は水素結合を示す。PyMOL ver 2.4 を用いて作図した。

ReDAAO において SS 結合を形成している Cys 残基が他の好熱性真菌 DAAO に保存されているか確認したところ (Fig. 3-19), TdDAAO と好熱性真菌 *Thermomyces lanuginosus* DAAO (TlDAAO) のアミノ酸配列の対応する位置に Cys 残基が見出された。したがって, TdDAAO と TlDAAO の耐熱性においても SS 結合が寄与する可能性が示唆された。一方, ReDAAO や TdDAAO 遺伝子の宿主である *R. emersonii* や *T. dupontii* とは異なる科に属する好熱性真菌 *Thermoascus aurantiacus* の DAAO (TaDAAO) と常温性真菌 *Aspergillus nanangensis* の DAAO (AmDAAO) においては, ReDAAO の Cys285 残基に対応する位置に Cys 残基は存在したが, Cys230 残基に対応する位置には Cys 残基は観察されなかった (Fig. 3-19)。また, *R. emersonii* や *T. dupontii* とは異なる綱に属する好熱性真菌 *Corynascus thermophilus* と *Sporotrichum thermophile* DAAO (CtDAAO と StDAAO) においては, ReDAAO の Cys230 と Cys285 残基に対応する位置に Cys 残基は存在しなかった。以上のことから, ReDAAO で観察された SS 結合は全ての好熱性真菌 DAAO に共通するものではなく, *Trichocomaceae* 科に属する好熱性真菌 DAAO に特異的と考えられた。

ReDAAO		MAT-NNIVVLGAGVSGLTATWLLSKDPSNKITVAAKHMPGDYDIEYCS	49
TdDAAO	77%	MEN-TNIVVLGAGVIGLTATALLSRDPKKKITVVAKHMPGDYDIEYAS	49
TlDAAO	79%	MEN-TNIVVLGAGVIGLTATALLSRDPKKKITVVAKHMPGDYDIEYAS	49
TaDAAO	77%	MST-NNIVVLGAGVSGLTATYLLSKNASNKITVAAKHMPGDYDIEYCS	49
AmDAAO	77%	MATKNNIVVLGAGVSGLTATYLLSKDPSNCITVVSXKHMPGDYDIEYCS	50
CtDAAO	60%	MPT---IVVLGAGVSGLTACALLAKQKDNATVVAKHMPGDYDIEYTS	47
StDAAO	60%	MPT---IVVLGAGVSGLTACALLAKQKNTVTVVAKHMPGDYDIEYTS	47
ReDAAO		AGANYLPV-----GAENSRVGQWERATWPHLRDIAQNHPEAGIHFD	94
TdDAAO		AGANYLPYVLQGVGAENNVGKFEKATWPWLRDLAENCPEAGIHFLPT	99
TlDAAO		AGANYLPV-----GAENNVGKFEKATWPWLRDLAQCNEAGIHFLPT	94
TaDAAO		AGANYLPT-----GAGSSFHGOAERTWPALAEELAKNHPEAGIHFKT	94
AmDAAO		AGANYLPV-----GKSGSSHERWERTWPALRELTEKHDPAGIHFD	95
CtDAAO		AGANVLPM-----NLEK--DSRWEERTWPELRRLAAEVPEAGLHFQT	90
StDAAO		AGANVLPM-----NLEK--DSRWEERTWPEMRRLAAEVPEAGLHFQT	90
ReDAAO		YNRTKQGSTTGQW-FSELVKPNPWYGVLPNFRELSKDELPPGIDNANR	143
TdDAAO		YNRIKDRESTTGQW-FSELLRPDPWYKDVVPDFQQLPKSELAPGIDNG	148
TlDAAO		YNRIKDRESTTGQW-FSELLKPDWYKDVVPDFRQLPKSELAPGIDNAN	143
TaDAAO		YNRKIDRLSATGQW-FAELLRKDPWYKDVVPDFREVPSDQLDPGIDNS	143
AmDAAO		YNRKQDQGSATGQW-FSELVQKEPWYKNVVPGETNVPDDQLAPGIDNA	144
CtDAAO		LRRRVVVEGRKSALADGLFQLSPWYKDVMDYRELAASELPAGMHSGAE	140
StDAAO		LRRKVDVEAGLKSALADGLFQLSPWYREVMDNFRELPALEPPGMHSGAE	140
ReDAAO		FTSVCINTAVYLPWLVGQCRKNGVVFKAVERKHVAEAAAHHSQGKADLV	193
TdDAAO		FTSVCINTAIYLPWLVGQCRKNGVVFKAIFSHVNDAAAHHSQGKADIV	198
TlDAAO		FTSVCINTAIYLPWLVGQCRKNGVVFKAIFENHVNDAAFAHHSQGKADIV	193
TaDAAO		FTSVCINTAVYLPWLVSQCRKNGVVFKAVERKHVADAANAHHSQKADLV	193
AmDAAO		FTSVCINTAVYLPWLIGQCRKTGVVFKAVERNHIAEAAAHHTGQKADLV	194
CtDAAO		FTSVCINTAVYLPWLVGQCARHGVVFERRAVLRHVAEAGMSHTGRRADV	190
StDAAO		FTSVCINTAIYLPWLVGQCARHGVVFERRAVLKHISEAARMSETGRRADV	190
ReDAAO		VNCTGLSSRKLGQVQDNTLLPARGQIVVVRNDP-GLMCSISGTDGDDDEV	242
TdDAAO		VNCTGLSSRKLGQVLDLTLTPARGQIVLVRNDP-GVMCSISGSDGDDDEV	247
TlDAAO		VNCTGLSSRKLGQVLDLTLTPARGQIVVVRNDP-GVMCSISGSDGDDDEV	242
TaDAAO		VNCTGLSSKRLGGVMDALHPARGQIVVVRNET-DTMYTISGTDGDEDI	242
AmDAAO		VNCTGLSSKRLGGVCDKLYPARGQIVVVRNDP-GAMVSIISGTDGDDDEV	243
CtDAAO		VNASGLLACRLGGVMDGRVQPARQIVVVRNGAGGVMPATSGCDDGDDDEV	240
StDAAO		VNASGLLACRLGGVMDAKVQPARQIVLVRNEAAGVMPPTSGCDDGDDDEV	240
ReDAAO		TYMMTRAAGGGTILGGTYQKHNWDPLPDPNLAVRIMKRCIELCPSLVAPG	292
TdDAAO		TYIMTRAAGGGTILGGTYQKNNWDPNPDPNLAVRIMKRCVELCPSLVKG	297
TlDAAO		TYIMTRAAGGGTILGGTYQKNNWDPNPDPNLAVRIMKRCVELCPSLVDKG	292
TaDAAO		AYTMTRAAGGGTILGGSYQKDNWDPLPDPNLATRIMKRCIKLCPSLVKEG	292
AmDAAO		TYMMTRAAGGGTVLGGSYQKNQWDPLPDPNLAVRIMKRAIELCPQLVKKG	293
CtDAAO		VYVMQACGGGTILGGTYQKGNWDATPDANTALRIMKRAVETHPELT-GG	289
StDAAO		VYVMQAHGGGTILGGTYQKGNWEANPDPNVAVRIMKRAVETHPELT-GG	289
ReDAAO		QGIEGLDIIRHGVLRLPVRREDGPRIEKEIDGVVVHNYHGFGYGYQTSF	342
TdDAAO		QGIEGLSIIRHGVLRLPLRRDGPVEAEKIDQWVVHNYHGFGYGYQASY	347
TlDAAO		QGIEGLSIIRHGVLRLPLRRDGPVEAEKIDQWVVHNYHGFGYGYQASY	342
TaDAAO		QGIEGLDVIIRHGVLRLPLREGGPRVEKEKIDGVVVHNYHGFGFGYQASY	342
AmDAAO		QGIEGLSIIRHGVLRLPLREGGPRVEAEKIEGVNVHNYHGFGFGYQASY	343
CtDAAO		RGIEALDVIIRHGVLRLPWREGGVRIEKEKIDGTWVVHNYHGAGWGYQGSY	339
StDAAO		KGIEALDIIRHGVLRLPWREGGVRIEKEKIDGTWVVHNYHGAGWGYQGSY	339
ReDAAO		GCATTAVEVVRALQQQKQRRDKARL	368
TdDAAO		GSAAVAEVEEQALQK-----KTAKL	368
TlDAAO		GSAAVAEVEEQALQK-----KTAKL	363
TaDAAO		GCAGAAVKLVEEALRE-----KARL	362
AmDAAO		GCSQDAVALVNSALKRK----DQAKL	365
CtDAAO		GCAERVVELVDEIVGRAK---PESKL	362
StDAAO		GCAERVVELVDEIVGRTK---CESKL	362

Fig. 3-19. ReDAAO と他の好熱性真菌 DAAO のアミノ酸配列アライメント

(●)は真菌 DAAO に特異的な Asn 残基を示す。(○)は ReDAAO の Cys230 または Cys285 残基に対応するアミノ酸残基を示す。各 DAAO 名の後の数値は Needleman-Wunsch による global alignment を用いて算出した ReDAAO に対するアミノ酸配列同一性 (%) を示す。T-Coffee Server (<http://tcoffee.crg.cat/>) を用いてアライメントを行った。用いた DAAO の protein ID または accession No. を以下に示す：TlDAAO, Thela2p4_000679；TaDAAO, Theau2p4_008779；AmDAAO, KAF9894672；CtDAAO, Corth2p4_008662；StDAAO, Spoth2p4_009618。

4. 材料と方法

材料

試薬は特記しない場合、Nacalai tesque, Merk, Takarabio, Toyobo または Fujifilm Wako から購入した。D-Ile と D-Tyr はペプチド研究所から購入し、D-Asp は田辺製薬から寄贈されたものを用いた。オリゴヌクレオチドは、Eurofins Genomics から購入した。

供試菌、プラスミドおよび培地

DNA 組換えの宿主として *E. coli* DH5 α を、遺伝子発現の宿主として、*E. coli* BL21(DE3) pLysS を用いた。*E. coli* の培養には、LB (lysogeny broth) 液体培地 (5 g/l yeast extract, 10 g/l tryptone, 5 g/l NaCl, pH 7.0) を用いた。LB 寒天培地には精製寒天粉末を終濃度 15 g/l となるように添加した。抗生物質を添加する場合、終濃度が 100 μ g/ml となるように ampicillin を添加し培地名に“A”を付記し、また、終濃度が 34 μ g/ml となるように chloramphenicol を添加し培地名に“C”を付記した。

結晶化に用いた精製 ReDAAO の調製

2 章と同様の方法で精製 ReDAAO を調製した。

結晶化

ハンギングドロップ蒸気拡散法により ReDAAO を結晶化した。リザーバー組成の条件を決定するためのイニシャルスクリーニングとして、市販のスクリーニングキット HR2-110 Crystal Screen と HR2-126 PEG/Ion Screen (HAMPTON RESEARCH, USA) を用いて、タンパク質濃度 2.0 mg/ml ReDAAO (buffer: 50 mM KPi pH 8.0) 溶液とリザーバー溶液を 1:1 または 2:1 で混合したドロップを 100 μ l のリザーバー溶液に対して 22°C で平衡化し結晶を作成した。最終的に、4 μ l の 2.0 mg/ml ReDAAO (buffer: 50 mM KPi pH 8.0) 溶液と 2 μ l のリザーバー溶液 (120 mM Tris-HCl pH 8.5, 240 mM sodium formate および 17.4%(w/v) PEG 1540) からなる 6 μ l のドロップを 100 μ l のリザーバー溶液に対して 22°C で平衡化させ結晶を得た (Table 3-1)。X 線照射前に ReDAAO 結晶を凍結保護溶液 (20%(w/v) PEG 400 を含むリザーバー溶液) に浸漬し、瞬間冷却した。

X 線回折強度データの測定と処理

ReDAAO の X 線回折強度データは、茨城県つくば市の高エネルギー加速器研究機構 (KEK) の放射光施設 (PF) のビームライン BL-5A において、検出機器 PILATUS3S 6M, 0.200 mm 幅の入射 X 線の波長 1.00000 Å, カメラ長 336.706 mm, 振動写真 1 枚当たりの振動角 0.5°, 収集角度 180°, 測定温度 95.00 K, および 1 枚当たりの露光時間 1 秒で測定した。回折強度データの処理にはプログラム XDS(198), CCP4 (<http://www.ccp4.ac.uk>) 内のプログラム POINTLESS(199, 200)と SCALA(199)を用いた (Table 3-2)。 $\langle I/\sigma(I) \rangle$ が最外殻で 2 以上かつ完全性が全体と最外殻で 90%以上あることを確認し、分解能の範囲を決定した。

構造の精密化

CCP4 内のプログラム *MOLREP*(212)を用いた分子置換法により, RgDAAO (PDB entry 1C0I(47)) を鋳型として ReDAAO の位相を決定した. 構造の精密化には CCP4 内の *REFMAC5*(201)の Rigid body refinement と Restrained refinement を用いた. 手動でのモデル構築と電子密度の確認にはプログラム *COOT*(202)において F_o-F_c map または $2 F_o-F_c$ map を用いた (Table 3-3). R_{cryst} と R_{free} がそれぞれ 31.1%と 36.7%になった時点で水分子の収集を開始した (1 回目: R_{cryst} と R_{free} がそれぞれ 24.3%と 30.7%). 決定された構造の描画には *CCP4MG ver 2.10.11*(213)または *PyMOL ver 2.4* (<https://pymol.org/2/>) を用いた.

ReDAAO と TdDAAO バリエント遺伝子発現ベクターの構築

ReDAAO の Pro56 と Val57 の間に Tyr-Val-Leu-Gln-Gly 残基を挿入したバリエント (*ReDAAO_{ins}*) と TdDAAO の Tyr57-Gly61 を欠失させたバリエント (*TdDAAO_{del}*) 遺伝子発現ベクターは Toyobo 社のインバース PCR 法 (https://lifescience.toyobo.co.jp/embodiment/detail.php?embodiment_id=102) を参考にして構築した. 具体的には, 野生型 *ReDAAO* または *TdDAAO* 遺伝子発現ベクターを鋳型とし, 各バリエント対応するプライマーペア (Table 3-14) と, Tks Gflex DNA Polymerase を用いて, 94°C で 1 min の後, 98°C で 10 s・68°C で 3.5 min を 1 サイクルとして 20 サイクル反応した. 反応液を DpnI 処理とリン酸化した後, *E. coli* DH5 α を形質転換した. 抽出したプラスミドの塩基配列を解析し, 遺伝子発現ベクター (pET15b-*ReDAAO_{ins}* または pET15b-*TdDAAO_{del}*) とした.

ReDAAO の Arg97, Lys99, Lys114 および Ser231 残基をそれぞれ Ala 残基に, Cys230 を Ser 残基に置換したバリエント (*R97A*, *K99A*, *K114A*, *S231A* および *C230S*) 遺伝子発現ベクターは Agilent 社の Quickchange 法 (<https://www.chem-agilent.com/contents.php?id=300131>) を参考にして構築した. 具体的には, 野生型 *ReDAAO* 遺伝子発現ベクターを鋳型とし, 各バリエントに対応するプライマーペア (Table 3-14) と, KOD FX Neo を用いて, 94°C で 1 min の後, 98°C で 10 s・72°C で 3.5 min を 1 サイクルとして 5 サイクル, 98°C で 10 s・70°C で 3.5 min を 1 サイクルとして 5 サイクル, 98°C で 10 s・68°C で 3.5 min を 1 サイクルとして 10 サイクル反応した. 反応液を DpnI 処理した後, *E. coli* DH5 α を形質転換した. 抽出したプラスミドの塩基配列を解析し, 遺伝子発現ベクター (pET15b-*ReDAAO* *R97A*, pET15b-*ReDAAO* *K99A*, pET15b-*ReDAAO* *K114A*, pET15b-*ReDAAO* *C230S*, pET15b-*ReDAAO* *S231A*) とした. また, ReDAAO の Arg97 と Ser231 残基の Ala 残基への置換を重複させたバリエント遺伝子は発現ベクター (pET15b-*ReDAAO* *R97A/S231A*) は, pET15b-*ReDAAO* *R97A* を鋳型とし, ReDAAOS231A-F_R プライマーペアを用いて, 上記と同様の方法で作成した.

Table 3-14. *ReDAAO* と *TdDAAO* バリエント遺伝子発現ベクターの構築に用いたプライマー

Variants	Primer names	Sequences (5'→3')
TdDAAO _{del}	TdDAAO _{del} -F	GTGGGCGCAGAAAAACAATAAAGTGG
	TdDAAO _{del} -R	CGGCAGATAGTTGGCACCCGCCCCAC
ReDAAO _{ins}	ReDAAO _{ins} -F	tatgtgctgcagggcGTGGGTGCGGAGAACAGCCGTGTTG
	ReDAAO _{ins} -R	CGGCAGGTAGTTCGCACCCGCCCCAC
ReDAAO R97A	ReDAAOR97A-F	GACACCGTGGTTTACAACGCGACCAAGGATCAGGGCAGC
	ReDAAOR97A-R	GCTGCCCTGATCCTTGGT <u>TCGCG</u> TGTAAACCACGGTGTC
ReDAAO K99A	ReDAAOK99A-F	GGTTTACAACCGTACC <u>GCGG</u> ATCAGGGCAGCACC
	ReDAAOK99A-R	GGTGCTGCCCTGATC <u>CGCGG</u> TACGGTTGTAAACC
ReDAAO K114A	ReDAAOK114A-F	GTTCAGCGAACTGGTGGCGCCGAACCCGTGGTAT
	ReDAAOK114A-R	ATACCACGGGTTCGGG <u>CGCC</u> ACCAGTTCGCTGAAC
ReDAAO C230S	ReDAAOC230S-F	CGTAACGATCCGGGCCTGATGAGCAGCATTAGCGGCAC
	ReDAAOC230S-R	GTGCCGCTAATGCTGCTCATCAGGCCCCGGATCGTTACG
ReDAAO S231A	ReDAAOS231A-F	CGATCCGGGCGCTGATGTGCGCGATTAGCGGCACCGACGATG
	ReDAAOS231A-R	CATCGTCGGTGCCGCTAAT <u>CGCGC</u> ACATCAGGCCCCGGATCG

挿入または置換に該当するコドンは小文字または下線で示した。

E. coli の形質転換

pET15b-ReDAAO_{ins}, pET15b-TdDAAO_{del}, pET15b-ReDAAO R97A, pET15b-ReDAAO K99A, pET15b-ReDAAO K114A, pET15b-ReDAAO C230S または pET15b-ReDAAO S231A を含む DNA 溶液 1 µl を 20 µl の *E. coli* BL21 (DE3) pLysS に添加して、氷上で 30 min 静置した。その後、42°C で 45 s 保温して、氷上で 2 min 静置した後、SOC 培地を 500 µl 添加して、37°C で 1 h 振盪培養し、LBAC 寒天培地に 50 µl 添塗し 37°C で一晚培養した。

LB 培地における *ReDAAO* と *TdDAAO* バリエント遺伝子発現条件の検討

pET15b-ReDAAO_{ins}, pET15b-TdDAAO_{del}, pET15b-ReDAAO R97A, pET15b-ReDAAO K99A, pET15b-ReDAAO K114A, pET15b-ReDAAO C230S または pET15b-ReDAAO S231A を導入した *E. coli* BL21 (DE3) pLysS を 10 ml の LBACG 液体培地で前培養 (30°C, 169 rpm, 16 h) した。次に、前培養液 50 µl を 10 ml の LBAC 液体培地を入れた試験管に接種し、振盪培養 (37°C, 200 rpm) した。OD₆₀₀ が 0.3 に達した時に isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 1 mM となるように培養液に添加し、5 h 培養した。培養液の OD₆₀₀ を 1 h ごとに分光光度計 UV-1800 (SHIMADSU) を用いて測定した。培養液を遠心 (4°C, 3,000×g, 15 min) して菌体を回収し、使用するまで -30°C で保存した。

E. coli 粗抽出液の調製

保存していた菌体を 5 倍量の 20 ml の平衡化 buffer (50 mM KH₂PO₄, 300 mM NaCl, 5% glycerol, pH 8.0) で懸濁した後、ソニケーター Ultrasonic Disruptor Ud-201 (Tomy) を用いて超音波破碎 (output 3, duty cycle 50 : 破碎 30 s, 氷上 30 s, 15 サイクル) した。破碎後、遠心 (4°C, 20,000×g, 20 min) して得られた上清を Minisart Single use filter φ 0.2 µm (Sartorius) を用いてフィルターろ過し、粗抽出液とした。

金属アフィニティークロマトグラフィーによる精製

粗抽出液に 10 mM となるように imidazole を添加し、平衡化 buffer で平衡化した His TALON Superflow Cartridge (Clontech) に全量供した。その後、洗浄 buffer (30 mM imidazole, 50 mM KH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0) 25 ml でカラムを洗浄し、溶出 buffer (150 mM imidazole, 50 mM KH₂PO₄, 300 mM NaCl, 5% glycerol, pH 8.0) 10 ml でカラムに結合したタンパク質を溶出した。

Imidazole 溶出画分の濃縮

溶出画分を遠心式ろ過ユニット Amicon Ultra Centrifugal Filters Ultracel 10 K, Regenerated Cellulose 10,000 MWCO (Merk) により濃縮した。

濃縮 imidazole 溶出画分の透析

濃縮した imidazole 溶出画分を微量透析器 透くん (NIPPON Genetics) を用いて透析 buffer (50 mM KPi, 5% glycerol, pH 8.0) 500 ml に対して 3 h 透析した後、透析 buffer を交換し、再度 12 h 透析した。透析後のタンパク質溶液を遠心 (4°C, 20,000×g, 30 min) して変性タンパク質を除去し精製酵素とした。

タンパク質濃度測定

タンパク質濃度は、Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad) を用いて添付のプロトコルに従い Bradford 法により測定した。標準タンパク質と酵素試料の吸光度を 2 点ずつ、マイクロプレートリーダー SpectraMax Paradigm (Molecular Devices) を用いて測定し、検量線は 0–0.5 mg/ml BSA を用いて作成した。

SDS-PAGE 解析

SDS-PAGE 解析は、ラビタス・ミニスラブ電気泳動装置 (Atto), 12.5% e-PAGEL (Atto) を用いて、Laemmli 法により行った。マーカーとして Fluorescent Protein Molecular Weight Marker for SDS-PAGE (EZBiolab) を用いた。泳動後のタンパク質を CBB G-250 を用いて染色し、デジタルカメラ COOLPIX P7800 (Nikon) で撮影した。

四次構造解析

ReDAAO C230S バリエーションの四次構造は AKTApurify plus (GE Healthcare) に接続したカラム Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより解析した。カラム洗浄には孔径 0.22 μm の Vacuum Driven Disposable Filtration System (Millipore) により濾過し、脱気した milliQ 水を用いた。カラムの平衡化には同様に濾過・脱気した 150 mM NaCl と 5% glycerol を含む 50 mM KPi buffer (pH 8.0) を用いた。カラムを平衡化 (流速 0.2 ml/min, 4 h) した後、0.4 mg/ml の ReDAAO C230S バリエーション溶液を流速 0.2 ml/min でカラムに供した。

4-Aminoantipyrine-horseradish peroxidase (4-AA/HRP) カップリング法

DAAO 反応によって生じる H₂O₂ を 4-aminoantipyrine (4-AA) と horseradish peroxidase (HRP) によるカップリング反応により検出することで活性を測定した。具体的には基質 D-アミノ酸、終濃度 20 μM FAD, 1.5 mM 4-AA, 1.5 mM TOOS および 2.5 U/ml HRP を含む 50 mM KPi buffer (pH 8.0) を 37°C で 5 min 保温した後、*E. coli* 粗抽出液または精製酵素溶液を添加して反応を開始した。活性は反応により生成するキノンイミン色素を波長 555 nm ($\epsilon = 39.2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) で UV-1800 または SpectraMax Paradigm を用いて継続的にモニタリングすることで算出した。なお、

コントロールとして、基質を含まない反応液も同様に調製し、基質を含む反応液で得られた活性値からコントロールの活性値を引いた値を活性値とした。1 min 当たりに 1 μ mol の基質を代謝する酵素量を 1 U と定義した。

Amplex UltraRed–horseradish peroxidase (AUR/HRP) カップリング法

DAAO 反応によって生じる H_2O_2 を Amplex UltraRed (AUR, Invitrogen) と horseradish peroxidase (HRP) によるカップリング反応により検出することで活性を測定した。具体的には基質 D-アミノ酸 (または H_2O_2)、終濃度 20 μ M FAD, 25 μ M AUR および 50 mU/ml HRP を含む 50 mM KPi buffer (pH 8.0) を 37°C で 5 min 保温した後、精製酵素溶液を添加して反応を開始した。反応により生成する resorufin の蛍光強度を励起 (530 nm) / 蛍光 (590 nm) で SpectraMax Paradigm を用いて継続的にモニタリングし、標準 H_2O_2 による検量線を参照することで基質 D-アミノ酸に対する DAAO 活性を算出した。なお、コントロールとして、基質を含まない反応液も同様に調製し、基質を含む反応液で得られた活性値からコントロールの活性値を引いた値を活性値とした。1 min 当たりに 1 μ mol の基質を代謝する酵素量を 1 U と定義した。

基質特異性解析

20 mM D-アミノ酸 (D-Tyr は 1.5 mM) を基質として用い、37°C で 4-AA/HRP カップリング法により DAAO 活性を測定し、相対活性を算出した。

酵素反応速度論的パラメーター解析

0.5–100 mM D-Glu, 0.01–20 mM D-Met, 0.1–50 mM D-Val, 0.1–100 mM D-Ala, 0.1–20 mM D-Phe はおよび 0.1–150 mM D-Arg を基質として用いて、37°C で 4-AA/HRP または AUR/HRP カップリング法により DAAO 活性を測定した。最大反応速度 (V_{\max}) とミカエリス定数 (K_m) の算出には、データ解析ソフトウェア Sigma Plot 12.5 (Hulink) の酵素反応速度分析モジュールを用い、ミカエリス-メンテンの式を基にした非線形回帰分析によるカーブフィッティングから算出した。 V_{\max} 値と分子活性 (k_{cat}) 値は His タグ融合 ReDAAO_{ins}, TdDAAO_{del}, ReDAAO R97A, ReDAAO S231A および ReDAAO R97A/S231A バリエーションの推定分子量 43,017, 41,569, 42,371, 42,440 および 42,355 から算出した。

DAAO および DDO 競合的阻害剤解析

ReDAAO においては 2.5, 5.0 および 10 mM D-Glu または 0.04, 0.08 および 0.16 mM の D-Met, R97A/S231A バリエーションにおいては 35.5, 71.0, 142 mM の D-Glu または 0.08, 0.16 および 0.32 mM の D-Met を基質とし、1–5 mM 5-aminonicotinic acid または 1–10 mM benzoate を阻害剤として用いて、37°C で 4-AA/HRP または AUR/HRP カップリング法により DAAO 活性を測定した。 K_i (mM) の算出には Sigma Plot 12.5 の酵素反応速度分析モジュールによる Dixon-plot 法を用いた。

耐熱性解析

タンパク質濃度 0.4 mg/ml の ReDAAO と C230S バリエーション溶液を LifeECO で遮光しながら 30–80°C で 60 min 保温した後、20 mM D-Val を基質として用い、37°C で 4-AA/HRP カップリング法により残存 DAAO 活性を測定し、相対活性を算出した。

熱失活測定

タンパク質濃度 0.4 または 4.0 mg/ml ReDAAO と C230S バリアント溶液を、10 μ M FAD 非存在または存在下でそれぞれ 56°C と 64°C で 80 min 保温した後、20 mM D-Val を基質として用い、37°C で 4-AA/HRP カップリング法により残存 DAAO 活性を測定し、 $t_{1/2}$ を算出した。

総括

D-アミノ酸オキシダーゼ (DAAO) は中性および塩基性 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る。一方、酸性 D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応はフラビン酵素である D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO) により同様の機構で触媒される。両酵素の高い立体選択性から、DAAO と DDO は D-アミノ酸の検出・定量、D-アミノ酸ラセミ体混合物の光学分割、 α -ケト酸の生産、天然および非天然 L-アミノ酸の生産などに有用である。加えて、DAAO はセファム系抗生物質原料である 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) の合成に利用され、さらにガンなどの疾患の治療への応用も期待されている。

これまでに、DAAO は一部の細菌とヒトを含む多様な真核生物種に、DDO は真核生物に見出されており、その生理機能や酵素学的特性が報告されてきた。なかでも、真菌由来の DAAO や DDO は高い活性を有しており、加えて真菌由来の DAAO は広い基質特異性を有することから、より応用的に有用とされている。しかし、真菌由来のこれら酵素は常温性真菌由来であり安定性が低いことから、その応用的利用の拡大が制限されている。これまでに、タンパク質工学的手法による DAAO の安定化の試みがなされているが、満足のいく結果は得られていない。このような状況において、当研究室では好熱性細菌に DAAO 求め、既知の DAAO のなかで最も高い耐熱性を有する DAAO を好熱性細菌に見出した。しかし、好熱性細菌由来の DAAO の活性は真菌由来の DAAO よりも著しく低く、基質特異性も狭かったことから、応用的な利用が制限されると考えた。一方、DDO は好熱性の古細菌や細菌を含む原核生物に見出されておらず、高い安定性を有する DDO は取得されていない。

そこで本研究では、「真菌由来の DAAO と DDO は高活性である」「好熱性微生物由来の酵素は高い安定性を有する」というこれまでの知見を踏まえ、未だ DAAO と DDO が報告されていない好熱性真菌から高活性・広基質特異性・高安定性を有する DAAO と高活性・高安定性を有する DDO を取得し、その機能と構造を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、応用的利用に有用な高活性・高安定性・広基質特異性を有する DAAO と高活性・高安定性を有する DDO の取得を目的とした。そこで、これまでに多くの耐熱性酵素が単離されている好熱性真菌 *Thermomyces dupontii* NRRL 2155 株のゲノム配列において DAAO と DDO ホモログ遺伝子を探索し、DAAO および DDO をコードすると推測された Talth1p4_001973 と Talth1p4_002474 を見出した。*E. coli* で発現させ精製した Talth1p4_001973 と Talth1p4_002474 の発現産物は、それぞれ中性および酸性 D-アミノ酸に対して高いオキシダーゼ活性を示したことから、DAAO (TdDAAO) と DDO (TdDDO) をコードすることが明らかとなった。しかし、TdDAAO は高い触媒活性を有するものの、その基質特異性は広基質特異性を有する RgDAAO よりも狭かったことから、目的とする広基質特異性を有する DAAO ではなかった。一方、TdDDO は、酸性 D-アミノ酸のなかでも、D-Glu に対して高い触媒活性を示し、その基質特異性定数は既知の DDO のな

かで最も優れていたことから、D-Glu の検出・定量に有用と考えられた。また、TdDDO は既知 DDO のなかで最も高い耐熱性を有していた。TdDDO は単量体であったことから、その高い耐熱性はタンパク質構造の高い剛性に起因すると考えられた。以上の酵素学的特性から、TdDDO は高活性かつ高い安定性を有する応用的に有用な DDO であることが分かった。

TdDDO の一次構造や三次元構造モデルの解析から、DDO や DAAO の基質結合部に保存されている、基質の α -カルボキシ基と水素結合を形成する Tyr 残基が TdDDO に存在せず、代わりに Phe 残基 (Phe248) の存在が確認された。そこで、基質親和性の向上を狙い、Phe248 を Tyr 残基に置換したバリエーション (TdDDO F248Y) を作製した。TdDDO F248Y は野生型と同様に酸性 D-アミノ酸に対して活性を示し、分子活性は低下するものの、目的どおりに基質親和性の向上が達成できた。TdDDO F248Y の D-Glu に対する K_m は既知 DDO のものよりも 1 桁低かったことから、既知の DDO よりも D-Glu を高感度で検出できると期待された。

第 2 章では、第 1 章で取得できなかった高活性・高安定性・広基質特異性を有する DAAO の取得を目的とした。発酵堆肥から 3 株の好熱性真菌 (YA 株, PB 株および PE 株) を単離した。この 3 株は広基質特異性 DAAO が良基質とする D-アミノ酸を含む培地で生育したが、特に YA 株と名付けた株が良好に生育した。分子系統解析から、YA 株は好熱性真菌 *R. emersonii* に、PB 株と PE 株はともに好熱性真菌 *T. dupontii* に属すると考えられた。*R. emersonii* の基準株である CBS 393.64^T 株のゲノム配列に見出した DAAO ホモログ遺伝子の塩基配列をもとに、YA 株の DAAO ホモログ (ReDAAO) 遺伝子を取得したところ、その塩基配列は 1 塩基を除き、CBS 393.64^T 株由来のものと同一であった。*E. coli* で発現させた ReDAAO は、抗生物質原料の生産に重要な cephalosporin C や様々な D-アミノ酸に対して活性を示し、既知の真菌由来の DAAO と同等の高い活性を示した。また、興味深いことに、ReDAAO は本来 DDO の基質である D-Glu に対しても高い活性を示した。ReDAAO の至適 pH と pH 安定性は既知の DAAO と同様であったが、ReDAAO の耐熱性は好熱性細菌由来の DAAO の耐熱性に匹敵した。以上の酵素学的特性から、ReDAAO は高活性・高安定性・新奇な広基質特異性を有する目的とした応用的に有用な DAAO であることが分かった。

ReDAAO の三次元構造モデルから、活性部位上部に位置する Arg97 と Ser233 が D-Glu に対する高い活性に寄与すると推測された。また、狭い基質特異性を有する TdDAAO のアミノ酸配列と三次元構造モデルの比較から、TdDAAO の活性部位近傍に存在する YVLQG 配列が ReDAAO には存在しないことが、ReDAAO の新奇な基質特異性に寄与すると推測された。また、ReDAAO の高次なオリゴマー形成がその高い耐熱性に寄与すると推測された。

第 3 章では、第 2 章で明らかにした ReDAAO の新奇な広基質特異性と高い耐熱性に寄与する構造的要因の同定を目的とした。ハンギングドロップ蒸気拡散法により基質リガンドを含まない ReDAAO を結晶化し、X 線結晶構造解析により 2.00Å 分解能の ReDAAO 構造を構築した。ReDAAO は dimer-of-dimers 型の四量体を形成することが分かった。

ReDAAO の新奇な広基質特異性に寄与する構造的要因を推測するため、ReDAAO 結晶構造の基質結合部位を観察したところ、モデル構造から D-Glu への高い活性に寄与すると推測された Arg97 と Ser231 が推測どおりに基質結合部位上部に観察された。ReDAAO の Arg97 と Ser231 それぞれを Ala 残基に置換したバリエーションは中性および塩基性 D-アミノ酸に対して高い活性を示したが、D-Glu に対してほとんど活性を示さなくなったことから、これらアミノ酸残基が ReDAAO の D-Glu に対する活性に寄与することが分かった。D-Glu に対する酵素反応速度論的パラメーターから、Arg97 と Ser231 はそれぞれ主に分子活性能と基質結合能に寄与すると考えられた。一方、ReDAAO の結晶構造から、TdDAAO に存在する YVLQG 配列はその活性部位近傍に位置すると推測された。ReDAAO に YVLQG 配列を挿入した ReDAAO_{ins} の基質特異性は野生型よりも狭くなり、TdDAAO から YVLQG 配列を欠失させた TdDAAO_{del} の基質特異性は野生型よりも広がったことから、ReDAAO の広基質特異性は YVLQG 配列が無いことに起因することが明らかとなった。種々の D-アミノ酸に対する酵素反応速度論的パラメーターから、YVLQG 配列の存在は主に分子活性を低下させた（特に D-Glu と D-Val に対して）ことから、基質結合時に立体障害を引き起こす可能性が考えられた。以上の結果より、ReDAAO の新奇な広基質特異性には活性部位上部の Arg97 と Ser231 と TdDAAO の基質結合部位近傍に位置する YVLQG 配列が寄与することが明らかとなった。

興味深いことに、ReDAAO には、他の DAAO と DDO には見られない、分子内 SS 結合が観察された。Cys230 残基を Ser 残基に置換したバリエーション（C230S）の耐熱性は大きく低下したことから、分子内 SS 結合が ReDAAO の耐熱性に寄与することが分かった。また、野生型の耐熱性はタンパク質濃度の低下の影響をあまり受けないが、C230S は著しく低下した。SS 結合の近傍にはサブユニット間相互作用に寄与するいくつかのアミノ酸残基が存在したことから、分子内 SS 結合は ReDAAO のサブユニット間相互作用を安定化することでその高い耐熱性に寄与すると考えられた。

以上、本研究により、好熱性真菌 *T. dupontii* NRRL 2155 株に好熱性真菌としては初めて DDO を見出し、応用的利用に有用な高活性かつ高安定性を有する TdDDO を取得することができた。また、タンパク質工学的手法により基質親和性が大きく向上した TdDDO バリエーションを作製することに成功した。今後、酸性 D-アミノ酸の検出や定量などの応用的利用におけるこれら好熱性真菌由来 DDO の適用が期待される。さらに、広基質特異性 DAAO のみが良好に作用する D-アミノ酸を利用して取得した好熱性真菌 *R. emersonii* YA 株から応用的利用に有用な高活性、新奇な広基質特異性および高安定性を有する ReDAAO を取得し、構造学と生化学的な解析から新奇な広基質特異性と高安定性に寄与する構造的要因を明らかにした。今後、D-アミノ酸の検出・定量や抗生物質原料生産などの DAAO の広範な応用的利用への ReDAAO の適用が期待される。また、ReDAAO において明らかとなった基質特異性と安定性に寄与する構造メカニズムを既知の有用な DAAO や DDO へ適用させた機能改変・改良が期待される。

謝辞

本学位論文は、長岡技術科学大学大学院 工学研究科 生物機能工学専攻と生物統合工学専攻での5年間の研究成果をまとめたものであり、多くの方々のご支援によって完成に至りました。

本研究を遂行する上で、環境生物化学研究室という場を与えていただき、多大なるご支援をいただきました高橋祥司教授と解良芳夫教授に心より感謝いたします。高橋祥司教授には、基礎的な実験操作から学術論文の書き方、また、仕事をする上で必要な物事の考え方など、多くのことをご指導いただき、深く感謝の意を表します。

本論文の副査を務めていただきました、長岡技術科学大学 環境微生物工学研究室 笠井大輔准教授、発酵科学研究室 小笠原渉教授そして微生物代謝工学研究室 政井英司教授に深く感謝の意を表します。政井英司教授には本論文の副査だけでなく、筆者の博士後期課程への入試において、分子生理工学研究室 滝本浩一教授とともに研究へのご助言をいただき、心より感謝いたします。

第1章において、TdDDOの諸特性解析の基盤を築いていただきました、長岡技術科学大学 環境生物化学研究室 大杉航平氏に深く感謝の意を表します。

第3章において、ReDAAOのX線結晶構造解析を行うにあたり、筆者を特別研究学生として迎え入れていただき、ご指導いただきました東邦大学 理学部 生物分子科学科 後藤勝准教授に心より感謝いたします。後藤勝准教授とともに、船橋利佳子氏、岡崎紗代子氏および平戸祐喜博士にもX線結晶構造解析をサポートしていただき、深く感謝の意を表します。精製ReDAAOの調製、反応速度論解析および耐熱性解析をサポートしていただきました長岡技術科学大学 環境生物化学研究室 松永陽平氏、古市剛大氏および鈴木秀之氏に心より感謝いたします。

日夜研究に付き合っていていただき、プライベートでも筆者と親しくしていただいた長岡技術科学大学 環境生物化学研究室 今西大生氏、梶谷賢吾氏および森永将哉氏に感謝の意を表します。

最後に、筆者を何不自由なくここまで育て、見守り続けてくれた祖父母、叔父叔母そして両親と妹に深く感謝の意を表します。

公表論文

Shouji Takahashi, Kohei Osugi, **Yuya Shimekake**, Akira Shinbo, Katsumasa Abe, Yoshio Kera. 2019. Characterization and improvement of substrate-binding affinity of D-aspartate oxidase of the thermophilic fungus *Thermomyces dupontii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103: 4053–4064. doi:10.1007/s00253-019-09787-y.

Yuya Shimekake, Takehiro Furuichi, Katsumasa Abe, Yoshio Kera, Shouji Takahashi. 2019. A novel thermostable D-amino acid oxidase of the thermophilic fungus *Rasamsonia emersonii* strain YA. *Scientific Reports* 9, 11948. doi: 10.1038/s41598-019-48480-y.

Yuya Shimekake, Yuki Hirato, Rikako Funabashi, Sayoko Okazaki, Masaru Goto, Takehiro Furuichi, Hideyuki Suzuki, Yoshio Kera, Shouji Takahashi. 2020. X-ray structure analysis of a unique D-amino-acid oxidase from the thermophilic fungus *Rasamsonia emersonii* strain YA. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications* 76(11): 517–523. doi: 10.1107/s2053230x200133.

引用文献

1. A. D. Radkov, L. A. Moe, Bacterial synthesis of D-amino acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 5363-5374 (2014).
2. A. Aliashkevich, L. Alvarez, F. Cava, New Insights into the Mechanisms and Biological Roles of D-Amino Acids in Complex Eco-Systems. *Frontiers in Microbiology* 9, 683 (2018).
3. H. Lam et al., D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science* 325, 1552-1555 (2009).
4. G. Genchi, An overview on D-amino acids. *Amino acids*, (2017).
5. F. Cava, H. Lam, M. A. de Pedro, M. K. Waldor, Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cell Mol Life Sci* 68, 817-831 (2011).
6. I. Kolodkin-Gal et al., D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* 328, 627-629 (2010).
7. L. Alvarez, A. Aliashkevich, M. A. de Pedro, F. Cava, Bacterial secretion of D-arginine controls environmental microbial biodiversity. *The ISME J* 12, 438-450 (2018).
8. K. Imai et al., Distribution of free D-amino acids in tissues and body fluids of vertebrates. *Enantiomer* 2, 143-145 (1997).
9. A. Sawa, S. H. Snyder, Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease. *Science* 296, 692-695 (2002).
10. N. G. Srinivasan, J. J. Corrigan, A. Meister, D-Serine in the blood of the silkworm *Bombyx mori* and other lepidoptera. *J biol chem* 237, 3844-3845 (1962).
11. N. Ota, T. Shi, J. V. Sweedler, D-Aspartate acts as a signaling molecule in nervous and neuroendocrine systems. *Amino acids* 43, 1873-1886 (2012).
12. Hashimoto, Oka, Nishikawa, Anatomical distribution and postnatal changes in endogenous free D-aspartate and D-serine in rat brain and periphery. *Eur J Neurosci* 7, 1657-1663 (1995).
13. K. Sakai et al., D-aspartic acid localization during postnatal development of rat adrenal gland. *Biochem Biophys Res Commun.* 235, 433-436 (1997).
14. A. D'Aniello et al., Involvement of D-aspartic acid in the synthesis of testosterone in rat testes. *Life sciences* 59, 97-104 (1996).
15. F. Errico, F. Napolitano, R. Nistico, D. Centonze, A. Usiello, D-aspartate: an atypical amino acid with neuromodulatory activity in mammals. *Rev Neurosci* 20, 429-440 (2009).
16. F. Errico, J. P. Mothet, A. Usiello, D-Aspartate: An endogenous NMDA receptor agonist enriched in the developing brain with potential involvement in schizophrenia. *J Pharm Biomed Anal* 116, 7-17 (2015).
17. P. M. Kim et al., Aspartate racemase, generating neuronal D-aspartate, regulates adult neurogenesis. *PNAS* 107, 3175-3179 (2010).
18. A. Tanaka-Hayashi et al., Is D-aspartate produced by glutamic-oxaloacetic transaminase-1 like 1 (Got111): a putative aspartate racemase? *Amino acids* 47, 79-86 (2015).
19. K. Abe, S. Takahashi, Y. Muroki, Y. Kera, R.-h. Yamada, Cloning and Expression of the Pyridoxal 5'-Phosphate-Dependent Aspartate Racemase Gene from the Bivalve Mollusk *Scapharca broughtonii* and Characterization of the Recombinant Enzyme. *J Biochem* 139, 235-244 (2006).
20. K. Shibata et al., Nucleotides modulate the activity of aspartate racemase of *Scapharca broughtonii*. *Comp Biochem Physiol B* 134, 713-719 (2003).

21. H. Ohide, Y. Miyoshi, R. Maruyama, K. Hamase, R. Konno, D-Amino acid metabolism in mammals: biosynthesis, degradation and analytical aspects of the metabolic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879, 3162-3168 (2011).
22. M. Yamanaka, Y. Miyoshi, H. Ohide, K. Hamase, R. Konno, D-Amino acids in the brain and mutant rodents lacking D-amino-acid oxidase activity. *Amino acids* 43, 1811-1821 (2012).
23. S. Takahashi, K. Abe, K. Shibata, Y. Kera, *The handbook of microbial metabolism of amino acids*. S. Takahashi, Ed., *Functions and metabolism of D-amino acids in microorganisms*. (2017).
24. M. Kataoka et al., Isolation and characterization of D-threonine aldolase, a pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme from *Arthrobacter* sp. DK-38. *Eur J Biochem* 248, 385-393 (1997).
25. U. C. Kabisch et al., Identification of D-proline reductase from *Clostridium sticklandii* as a selenoenzyme and indications for a catalytically active pyruvoyl group derived from a cysteine residue by cleavage of a proprotein. *J Biol Chem* 274, 8445-8454 (1999).
26. M. Tanigawa et al., D-Amino acid dehydrogenase from *Helicobacter pylori* NCTC 11637. *Amino acids* 38, 247-255 (2010).
27. M. Yamada, K. Kurahashi, Adenosine triphosphate and pyrophosphate dependent phenylalanine racemase of *Bacillus brevis* Nagano. *J Biochem* 63, 59-69 (1968).
28. K. Soda, T. Yorifuji, K. Ogata, Occurrence of arginine racemase in bacterial extract. *Biochim Biophys Acta* 146, 606-608 (1967).
29. K. Soda, T. Osumi, Crystalline amino acid racemase with low substrate specificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35, 363-368 (1969).
30. L. Liu et al., Crystallization and preliminary X-ray analysis of aspartate racemase from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Acta Crystallogr D* 57, 1674-1676 (2001).
31. S. Takahashi, D-Aspartate oxidase: distribution, functions, properties, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 2883-2895 (2020).
32. G. Y. Yow, T. Uo, T. Yoshimura, N. Esaki, D-amino acid N-acetyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*: a close homologue of histone acetyltransferase Hpa2p acting exclusively on free D-amino acids. *Arch Microbiol* 182, 396-403 (2004).
33. E. M. Kubicek-Pranz, M. Rohr, D-amino acid oxidase from the yeast *Trigonopsis variabilis*. *J Appl Biochem* 7, 104-113 (1985).
34. T. Ito, K. Koga, H. Hemmi, T. Yoshimura, Role of zinc ion for catalytic activity in D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J* 279, 612-624 (2012).
35. T. Uo, T. Yoshimura, N. Tanaka, K. Takegawa, N. Esaki, Functional characterization of alanine racemase from *Schizosaccharomyces pombe*: a eucaryotic counterpart to bacterial alanine racemase. *J. Bacteriol.* 183, 2226-2233 (2001).
36. M. Goto et al., Crystal structure of a homolog of mammalian serine racemase from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 284, 25944-25952 (2009).
37. A. Mattevi et al., Crystal structure of D-amino acid oxidase: a case of active site mirror-image convergent evolution with flavocytochrome b2. *PNAS* 93, 7496 (1996).

38. V. I. Tishkov, S. V. Khoronenkova, D-Amino acid oxidase: structure, catalytic mechanism, and practical application. *Biochemistry (Mosc)* 70, 40-54 (2005).
39. M. S. Pilone, D-Amino acid oxidase: new findings. *Cell Mol Life Sci* 57, 1732-1747 (2000).
40. T. Kawazoe, H. K. Park, S. Iwana, H. Tsuge, K. Fukui, Human D-amino acid oxidase: an update and review. *Chem Rec* 7, 305-315 (2007).
41. M. Gabler, M. Hensel, L. Fischer, Detection and substrate selectivity of new microbial D-amino acid oxidases. *Enzyme Microb Technol* 27, 605-611 (2000).
42. H. A. Krebs, Metabolism of amino-acids: Deamination of amino-acids. *Biochem J* 29, 1620-1644 (1935).
43. B. Geueke, A. Weckbecker, W. Hummel, Overproduction and characterization of a recombinant D-amino acid oxidase from *Arthrobacter protophormiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 1240-1247 (2007).
44. Y. Saito, S. Takahashi, M. Kobayashi, K. Abe, Y. Kera, D-Amino acid oxidase of *Streptomyces coelicolor* and the effect of D-amino acids on the bacterium. *Ann Microbiol* 64, 1167-1177 (2013).
45. S. Takahashi et al., A Highly Stable D-Amino Acid Oxidase of the Thermophilic Bacterium *Rubrobacter xylanophilus*. *Appl Environ Microbiol* 80, 7219-7229 (2014).
46. H. C. Hsieh et al., Stabilization of D-amino acid oxidase from *Rhodospiridium toruloides* by immobilization onto magnetic nanoparticles. *Biotechnol Lett* 31, 557-563 (2009).
47. S. Umhau et al., The X-ray structure of D-amino acid oxidase at very high resolution identifies the chemical mechanism of flavin-dependent substrate dehydrogenation. *PNAS* 97, 12463-12468 (2000).
48. L. Pollegioni, L. Caldinelli, G. Molla, S. Sacchi, M. S. Pilone, Catalytic properties of D-amino acid oxidase in cephalosporin C bioconversion: a comparison between proteins from different sources. *Biotechnol Prog* 20, 467-473 (2004).
49. T. Tosa, R. Sano, I. Chibata, Immobilized D-Amino Acid Oxidase Preparation, Some Enzymatic Properties, and Potential Uses. *Agric Biol Chem* 38, 1529-1534 (1974).
50. C. Setoyama et al., Engineering the Substrate Specificity of Porcine Kidney D-Amino Acid Oxidase by Mutagenesis of the "Active-Site Lid". *J biochem* 139, 873-879 (2006).
51. J. L. Still, Studies on the cyclophorase system. VII. D-Aspartic oxidase. *J. Biol. Chem.* 179, 831-837 (1949).
52. G. Molla, A. Chaves-Sanjuan, A. Savinelli, M. Nardini, L. Pollegioni, Structure and kinetic properties of human D-aspartate oxidase, the enzyme-controlling D-aspartate levels in brain. *The FASEB Journal* 34, 1182-1197 (2020).
53. M. Katane et al., Comparative Characterization of Three D-Aspartate Oxidases and One D-Amino Acid Oxidase from *Caenorhabditis elegans*. *Chem. Biodivers* 7, 1424-1434 (2010).
54. M. Katane, T. Furuchi, M. Sekine, H. Homma, Molecular cloning of a cDNA encoding mouse D-aspartate oxidase and functional characterization of its recombinant proteins by site-directed mutagenesis. *Amino acids* 32, 69-78 (2007).
55. M. Senda et al., Crystallization and preliminary crystallographic analysis of D-aspartate oxidase from porcine kidney. *Acta Crystallogr F* 68, 644-646 (2012).
56. S. Takahashi et al., Possible role of a histidine residue in the substrate specificity of yeast D-aspartate oxidase. *J Biochem* 159, 371-378 (2016).

57. S. Takahashi et al., An active-site mutation enhances the catalytic activity of the yeast *Cryptococcus humicola* D-aspartate oxidase. *J Mol Catal B Enzym* 61, 235-240 (2009).
58. S. Takahashi et al., Cloning and Expression in Escherichia coli of the D-Aspartate Oxidase Gene from the Yeast *Cryptococcus humicola* and Characterization of the Recombinant Enzyme. *J biochem* 135, 533-540 (2004).
59. R.-h. Yamada et al., Microbial oxidases of acidic D-amino acids. *J Mol Catal B Enzym* 12, 93-104 (2001).
60. S. Fukunaga et al., Purification and properties of D-glutamate oxidase from *Candida boidinii* 2201. *J Ferment Bioeng* 85, 579-583 (1998).
61. L. Pollegioni, D. Porrini, G. Molla, M. S. Pilone, Redox potentials and their pH dependence of D-amino-acid oxidase of *Rhodotorula gracilis* and *Trigonopsis variabilis*. *Eur J Biochem* 267, 6624-6632 (2000).
62. I. Chumakov et al., Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *PNAS* 99, 13675 (2002).
63. J. Schumacher et al., Examination of G72 and D-amino-acid oxidase as genetic risk factors for schizophrenia and bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 9, 203-207 (2004).
64. H. K. Park et al., Potential role for astroglial D-amino acid oxidase in extracellular D-serine metabolism and cytotoxicity. *J Biochem* 139, 295-304 (2006).
65. J. Sasabe et al., Interplay between microbial D-amino acids and host D-amino acid oxidase modifies murine mucosal defence and gut microbiota. *Nat Microbiol* 1, 16125 (2016).
66. H. Soma et al., D-Amino acid oxidase and presence of D-proline in *Xenopus laevis*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 166, 165-171 (2013).
67. S. Sacchi, L. Caldinelli, P. Cappelletti, L. Pollegioni, G. Molla, Structure-function relationships in human D-amino acid oxidase. *Amino acids* 43, 1833-1850 (2012).
68. S. Takahashi, T. Kakuichi, K. Fujii, Y. Kera, R. H. Yamada, Physiological role of D-aspartate oxidase in the assimilation and detoxification of D-aspartate in the yeast *Cryptococcus humicola*. *Yeast* 22, 1203-1212 (2005).
69. A. Hashimoto, T. Oka, T. Nishikawa, Anatomical distribution and postnatal changes in endogenous free D-aspartate and D-serine in rat brain and periphery. *Eur J Neurosci* 7, 1657-1663 (1995).
70. A. Hashimoto, T. Nishikawa, T. Oka, T. Hayashi, K. Takahashi, Widespread distribution of free D-aspartate in rat periphery. *FEBS Lett* 331, 4-8 (1993).
71. C. A. Weatherly et al., D-Amino Acid Levels in Perfused Mouse Brain Tissue and Blood: A Comparative Study. *ACS Chem Neurosci* 8, 1251-1261 (2017).
72. A. S. Huang et al., D-Aspartate Regulates Melanocortin Formation and Function: Behavioral Alterations in D-Aspartate Oxidase-Deficient Mice. *J Neurosci* 26, 2814-2819 (2006).
73. T. Nuzzo et al., Decreased free D-aspartate levels are linked to enhanced D-aspartate oxidase activity in the dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenia patients. *NPJ Schizophr* 3, 16-16 (2017).
74. F. Errico, F. Napolitano, R. Nisticò, A. Usiello, New insights on the role of free D-aspartate in the mammalian brain. *Amino acids* 43, 1861-1871 (2012).
75. P. Krashia et al., Persistent elevation of D-Aspartate enhances NMDA receptor-mediated responses in mouse substantia nigra pars compacta dopamine neurons. *Neuropharmacology* 103, 69-78 (2016).

76. D. Punzo et al., Age-Related Changes in D-Aspartate Oxidase Promoter Methylation Control Extracellular D-Aspartate Levels and Prevent Precocious Cell Death during Brain Aging. *J Neurosci* 36, 3064-3078 (2016).
77. Y. Saitoh et al., Spatiotemporal localization of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidases during development in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* 32, 1967-1983 (2012).
78. Y. Saitoh et al., Secreted D-aspartate oxidase functions in *C. elegans* reproduction and development. *FEBS J* 286, 124-138 (2019).
79. R. K. Wierenga, P. Terpstra, W. G. Hol, Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol* 187, 101-107 (1986).
80. L. Pollegioni, S. Sacchi, G. Murtas, Human D-Amino Acid Oxidase: Structure, Function, and Regulation. *Front Mol Biosci* 5, 107 (2018).
81. F. Todone et al., Active Site Plasticity in D-Amino Acid Oxidase: A Crystallographic Analysis. *Biochemistry* 36, 5853-5860 (1997).
82. C. Setoyama, R. Miura, Structural and Functional Characterization of the Human Brain D-Aspartate Oxidase1. *J biochem* 121, 798-803 (1997).
83. A. Boselli et al., Investigating the role of active site residues of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase on its substrate specificity. *Biochimie* 89, 360-368 (2007).
84. C. M. Harris, G. Molla, M. S. Pilone, L. Pollegioni, Studies on the reaction mechanism of *Rhodotorula gracilis* D-amino-acid oxidase. Role of the highly conserved Tyr-223 on substrate binding and catalysis. *J Biol Chem* 274, 36233-36240 (1999).
85. G. Molla et al., Role of arginine 285 in the active site of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. A site-directed mutagenesis study. *J Biol Chem* 275, 24715-24721 (2000).
86. A. Boselli, S. Sacchi, V. Job, M. S. Pilone, L. Pollegioni, Role of tyrosine 238 in the active site of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. A site-directed mutagenesis study. *Eur J Biochem* 269, 4762-4771 (2002).
87. L. Pollegioni et al., Yeast D-amino acid oxidase: structural basis of its catalytic properties. *J Mol Biol* 324, 535-546 (2002).
88. M. Katane et al., Role of the active site residues arginine-216 and arginine-237 in the substrate specificity of mammalian D-aspartate oxidase. *Amino acids* 40, 467-476 (2011).
89. A. Caligiuri et al., Multistep enzyme catalysed deracemisation of 2-naphthyl alanine. *Biocatal Biotransformation* 24, 409-413 (2006).
90. A. Yamamoto, H. Tanaka, T. Ishida, K. Horiike, Functional and Structural Characterization of D-Aspartate Oxidase from Porcine Kidney: Non-Michaelis Kinetics due to Substrate Activation. *J biochem* 141, 363-376 (2007).
91. A. Negri, G. Tedeschi, F. Ceciliani, S. Ronchi, Purification of beef kidney D-aspartate oxidase overexpressed in *Escherichia coli* and characterization of its redox potentials and oxidative activity towards agonists and antagonists of excitatory amino acid receptors. *Biochim Biophys Acta* 1431, 212-222 (1999).
92. S. V. Khoronenkova, V. I. Tishkov, D-amino acid oxidase: physiological role and applications. *Biochemistry (Mosc)* 73, 1511-1518 (2008).
93. L. Pollegioni et al., Properties and applications of microbial D-amino acid oxidases: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 78, 1-16 (2008).

94. R. N. Patel, Enzymatic synthesis of chiral intermediates for Omapatrilat, an antihypertensive drug. *Biomol Eng* 17, 167-182 (2001).
95. J. Weon Huh, K. Yokoigawa, N. Esaki, K. Soda, Total Conversion of Racemic Pipecolic Acid into the L-Enantiomer by a Combination of Enantiospecific Oxidation with D-Amino Acid Oxidase and Reduction with Sodium Borohydride. *Biosci Biotechnol Biochem* 56, 2081-2082 (1992).
96. P. Brodelius, K. Nilsson, K. Mosbach, Production of α -keto acids Part I. Immobilized cells of *Escherichia coli* containing D-amino acid oxidase. *Appl Biochem Biotechnol* 6, 293-307 (1981).
97. M. Garcia-Garcia, I. Martinez-Martinez, A. Sanchez-Ferrer, F. Garcia-Carmona, Production of the apoptotic cellular mediator 4-Methylthio-2-oxobutyric acid by using an enzymatic stirred tank reactor with in situ product removal. *Biotechnol Prog* 24, 187-191 (2008).
98. Y. Miyoshi, T. Oyama, Y. Itoh, K. Hamase, Enantioselective Two-Dimensional High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Amino Acids; Analysis and Physiological Significance of D-Amino Acids in Mammals. *CHROMATOGRAPHY* 35, 49-57 (2014).
99. R. Pätzold, H. Brückner, Gas chromatographic determination and mechanism of formation of D-amino acids occurring in fermented and roasted cocoa beans, cocoa powder, chocolate and cocoa shell. *Amino acids* 31, 63-72 (2006).
100. Y. Huang, M. Shi, S. Zhao, Quantification of D-Asp and D-Glu in rat brain and human cerebrospinal fluid by microchip electrophoresis. *J Sep Sci* 32, 3001-3006 (2009).
101. A. D'Aniello, A. Guiditta, Identification of D-aspartic acid in the brain of *Octopus vulgaris*. *Lam J Neurochem* 29, 1053-1057 (1977).
102. M. Wakayama et al., Spectrophotometric assay of D-aspartate and D-glutamate using D-aspartate oxidase with malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase. *Anal Biochem* 250, 252-253 (1997).
103. Y. Mutaguchi et al., Visible wavelength spectrophotometric assays of L-aspartate and D-aspartate using hyperthermophilic enzyme systems. *Anal Biochem* 409, 1-6 (2011).
104. S. Kato et al., Enzymatic assay for D-aspartic acid using D-aspartate oxidase and oxaloacetate decarboxylase. *Biosci Biotechnol Biochem* 76, 2150-2152 (2012).
105. G. Molla, L. Piubelli, F. Volontè, M. S. Pilone, in *Unnatural Amino Acids: Methods and Protocols*, L. Pollegioni, S. Servi, Eds. (Humana Press, Totowa, NJ, 2012), pp. 273-289.
106. P. Pernot et al., Characterization of a Yeast D-Amino Acid Oxidase Microbiosensor for D-Serine Detection in the Central Nervous System. *Anal Chem* 80, 1589-1597 (2008).
107. M. Moreno-Guzmán et al., Bi-enzymatic biosensor for on-site, fast and reliable electrochemical detection of relevant D-amino acids in bacterial samples. *Sens Actuators B Chem* 242, 95-101 (2017).
108. L. Pollegioni, G. Molla, New biotech applications from evolved D-amino acid oxidases. *Trends Biotechnol* 29, 276-283 (2011).
109. Hashimoto et al., Decreased serum levels of D-serine in patients with schizophrenia: evidence in support of the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 60, 572-576 (2003).
110. J. Sasabe, M. Suzuki, N. Imanishi, S. Aiso, Activity of D-amino acid oxidase is widespread in the human central nervous system. *Front Synaptic Neurosci* 6, 14 (2014).

111. G. Fisher et al., Free D- and L-amino acids in ventricular cerebrospinal fluid from Alzheimer and normal subjects. *Amino acids* 15, 263-269 (1998).
112. A. Hesaka et al., D-Serine reflects kidney function and diseases. *Sci Rep* 9, 5104 (2019).
113. M. Friedman, Origin, microbiology, nutrition, and pharmacology of D-amino acids. *Chem Biodivers* 7, 1491-1530 (2010).
114. J. Fang, T. Sawa, T. Akaike, H. Maeda, Tumor-targeted delivery of polyethylene glycol-conjugated D-amino acid oxidase for antitumor therapy via enzymatic generation of hydrogen peroxide. *Cancer Res* 62, 3138-3143 (2002).
115. I. Fotheringham, I. Archer, R. Carr, R. Speight, N. J. Turner, Preparative deracemization of unnatural amino acids. *Biochem Soc Trans* 34, 287-290 (2006).
116. Z. Xu, Y.-K. Cen, S.-P. Zou, Y.-P. Xue, Y.-G. Zheng, Recent advances in the improvement of enzyme thermostability by structure modification. *Crit Rev Biotechnol* 40, 83-98 (2020).
117. V. G. H. Eijssink et al., Rational engineering of enzyme stability. *J Biotechnol* 113, 105-120 (2004).
118. C. Vieille, G. J. Zeikus, Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 1-43 (2001).
119. F. Pucci, M. Rooman, Physical and molecular bases of protein thermal stability and cold adaptation. *Curr Opin Struct Biol* 42, 117-128 (2017).
120. B. W. Matthews, H. Nicholson, W. J. Becktel, Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *PNAS* 84, 6663-6667 (1987).
121. S. F. Betz, Disulfide bonds and the stability of globular proteins. *Protein Sci* 2, 1551-1558 (1993).
122. A. Szilágyi, P. Závodszky, Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure* 8, 493-504 (2000).
123. A. Razvi, J. M. Scholtz, Lessons in stability from thermophilic proteins. *Protein Sci* 15, 1569-1578 (2006).
124. J. D. Bloom, S. T. Labthavikul, C. R. Otey, F. H. Arnold, Protein stability promotes evolvability. *PNAS* 103, 5869-5874 (2006).
125. L. Pollegioni et al., Contribution of the dimeric state to the thermal stability of the flavoprotein D-amino acid oxidase. *Protein Sci* 12, 1018-1029 (2003).
126. M. Arroyo et al., The role of cofactor binding in tryptophan accessibility and conformational stability of His-tagged D-amino acid oxidase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1774, 556-565 (2007).
127. M. Bakke, N. Kajiyama, Improvement in thermal stability and substrate binding of pig kidney D-amino acid oxidase by chemical modification. *Appl Biochem Biotechnol* 112, 123-131 (2004).
128. M. Yoshimoto, M. Yamasaki, M. Okamoto, H. Umakoshi, R. Kuboi, Oligolamellar vesicles for covalent immobilization and stabilization of D-amino acid oxidase. *Enzyme Microb Technol* 52, 13-19 (2013).
129. L. Caldinelli, G. Molla, S. Sacchi, M. S. Pilone, L. Pollegioni, Relevance of weak flavin binding in human D-amino acid oxidase. *Protein Sci* 18, 801-810 (2009).
130. L. Pollegioni et al., Engineering the properties of D-amino acid oxidases by a rational and a directed evolution approach. *Curr Protein Pept Sci* 8, 600-618 (2007).
131. I. Kuan, R. Liao, H.-C. Hsieh, K. Chen, C. Yu, Properties of *Rhodotorula gracilis* D-Amino Acid Oxidase Immobilized on Magnetic Beads through His-Tag. *J Biosci Bioeng* 105, 110-115 (2008).

132. F. López-Gallego et al., Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *J Biotechnol* 119, 70-75 (2005).
133. R. Fernández-Lafuente et al., Stabilization of enzymes (D-amino acid oxidase) against hydrogen peroxide via immobilization and post-immobilization techniques. *J Mol Catal B Enzym* 7, 173-179 (1999).
134. J. Nahalka, I. Dib, B. Nidetzky, Encapsulation of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase and fast comparison of the operational stabilities of free and immobilized preparations of the enzyme. *Biotechnol Bioeng* 99, 251-260 (2008).
135. I. Dib, B. Nidetzky, The stabilizing effects of immobilization in D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. *BMC Biotechnol* 8, 72 (2008).
136. F. López-Gallego et al., Preparation of a robust biocatalyst of D-amino acid oxidase on sephabeads supports using the glutaraldehyde crosslinking method. *Enzyme Microb Technol* 37, 750-756 (2005).
137. I. C. Kuan et al., Stabilization of D-amino acid oxidase from *Rhodospiridium toruloides* by encapsulation in polyallylamine-mediated biomimetic silica. *Biochem Eng J* 49, 408-413 (2010).
138. J. Hou et al., A rapid in situ immobilization of D-amino acid oxidase based on immobilized metal affinity chromatography. *Bioprocess Biosyst Eng* 37, 857-864 (2014).
139. M. Bakke, C. Setoyama, R. Miura, N. Kajiyama, Thermostabilization of porcine kidney D-amino acid oxidase by a single amino acid substitution. *Biotechnol Bioeng* 93, 1023-1027 (2006).
140. I. V. Golubev et al., Study of the Structure-Function-Stability Relationships in Yeast D-amino Acid Oxidase: Hydrophobization of Alpha-Helices. *Acta Naturae* 6, 76-88 (2014).
141. L. CARRETO et al., *Rubrobacter xylanophilus* sp. nov., a New Thermophilic Species Isolated from a Thermally Polluted Effluent. *Int J Syst Evol Microbiol* 46, 460-465 (1996).
142. N. Empadinhas et al., Functional and structural characterization of a novel mannosyl-3-phosphoglycerate synthase from *Rubrobacter xylanophilus* reveals its dual substrate specificity. *Mol Microbiol* 79, 76-93 (2011).
143. R. Maheshwari, G. Bharadwaj, M. K. Bhat, Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 461-488 (2000).
144. D. G. Cooney, R. Emerson, *Thermophilic Fungi: An Account of Their Biology, Activities, and Classification*. (W. H. Freeman, 1964).
145. J. Mouchacca, Thermophilic Fungi: Present Taxonomic Concepts. (1999), pp. 43-83.
146. I. Morgenstern et al., A molecular phylogeny of thermophilic fungi. *Fungal Biol.* 116, 489-502 (2012).
147. J. Houbraken, R. P. de Vries, R. A. Samson, in *Adv Appl Microbiol*, S. Sariaslani, G. M. Gadd, Eds. (Academic Press, 2014), 86, 199-249.
148. I. Maalej, I. Belhaj, N. F. Masmoudi, H. Belghith, Highly Thermostable Xylanase of the Thermophilic Fungus *Talaromyces thermophilus*: Purification and Characterization. *Appl Biochem Biotechnol* 158, 200-212 (2009).
149. H. Mallek-Fakhfakh, H. Belghith, Physicochemical properties of thermotolerant extracellular β -glucosidase from *Talaromyces thermophilus* and enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides. *Carbohydr Res* 419, 41-50 (2016).
150. X. Zhang, X. Li, L. Xia, Heterologous Expression of an Alkali and Thermotolerant Lipase from *Talaromyces thermophilus* in *Trichoderma reesei*. *Appl Biochem Biotechnol* 176, 1722-1735 (2015).

151. J. Houburken, H. Spierenburg, J. C. Frisvad, *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101, 403-421 (2012).
152. A. C. Stolk, Thermophilic species of *Talaromyces Benjamin* and *Thermoascus Miehe*. (1965), 31, 262-276.
153. C. M. Collins et al., Molecular cloning and expression analysis of two distinct beta-glucosidase genes, *bg1* and *aven1*, with very different biological roles from the thermophilic, saprophytic fungus *Talaromyces emersonii*. *Mycol Res* 111, 840-849 (2007).
154. P. M. Martínez, M. M. Appeldoorn, H. Gruppen, M. A. Kabel, The two *Rasamsonia emersonii* α -glucuronidases, ReGH67 and ReGH115, show a different mode-of-action towards glucuronoxylan and glucuronoxyloligosaccharides. *Biotechnol Biofuels* 9, 105 (2016).
155. S. J. Wang, C. Y. Yu, C. K. Lee, M. K. Chern, I. C. Kuan, Subunit fusion of two yeast D-amino acid oxidases enhances their thermostability and resistance to H₂O₂. *Biotechnol Lett* 30, 1415-1422 (2008).
156. M. Katane et al., Characterization of the enzymatic and structural properties of human D-aspartate oxidase and comparison with those of the rat and mouse enzymes. *Biol Pharm Bull* 38, 298-305 (2015).
157. O. I. Petriv, L. Tang, V. I. Titorenko, R. A. Rachubinski, A new definition for the consensus sequence of the peroxisome targeting signal type 2. *J Mol Biol* 341, 119-134 (2004).
158. A. A. Sibirny, Yeast peroxisomes: structure, functions and biotechnological opportunities. *FEMS Yeast Res* 16, (2016).
159. M. Katane, Y. Seida, M. Sekine, T. Furuchi, H. Homma, *Caenorhabditis elegans* has two genes encoding functional D-aspartate oxidases. *FEBS J* 274, 137-149 (2007).
160. L. Amery et al., C-terminal tripeptide Ser-Asn-Leu (SNL) of human D-aspartate oxidase is a functional peroxisome-targeting signal. *Biochem J* 336, 367-371 (1998).
161. P. P. Van Veldhoven, C. Brees, G. P. Mannaerts, D-Aspartate oxidase, a peroxisomal enzyme in liver of rat and man. *Biochim Biophys Acta* 1073, 203-208 (1991).
162. C. Nötzel, T. Lingner, H. Klingenberg, S. Thoms, Identification of New Fungal Peroxisomal Matrix Proteins and Revision of the PTS1 Consensus. *Traffic* 17, 1110-1124 (2016).
163. I. Dib, D. Stanzer, B. Nidetzky, *Trigonopsis variabilis* D-Amino Acid Oxidase: Control of Protein Quality and Opportunities for Biocatalysis through Production in Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* 73, 331-333 (2007).
164. W. Vollmer, D. Blanot, M. A. de Pedro, Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 32, 149-167 (2008).
165. H. O. Shigekazu Yano, Shinji Matsuo, Masahiro Ito, Mamoru Wakayama, Production, purification and characterization of D-aspartate oxidase from the fungus *Trichoderma harzianum* SKW-36. *Adv Biosci Biotechnol* 3, 7-13 (2012).
166. I. Dib, A. Slavica, W. Riethorst, B. Nidetzky, Thermal inactivation of D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* occurs via three parallel paths of irreversible denaturation. *Biotechnol Bioeng* 94, 645-654 (2006).
167. K. M. Polizzi, A. S. Bommarius, J. M. Broering, J. F. Chaparro-Riggers, Stability of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* 11, 220-225 (2007).
168. P. J. Haney et al., Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic *Methanococcus* species. *PNAS* 96, 3578-3583 (1999).

169. R. Yamada et al., Purification and properties of D-aspartate oxidase from *Cryptococcus humicola* UJ1. *Biochim Biophys Acta* 1294, 153-158 (1996).
170. L. Pollegioni, K. Fukui, V. Massey, Studies on the kinetic mechanism of pig kidney D-amino acid oxidase by site-directed mutagenesis of tyrosine 224 and tyrosine 228. *J Biol Chem* 269, 31666-31673 (1994).
171. J. H. Yu et al., Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 41, 973-981 (2004).
172. P. Casalin, L. Pollegioni, B. Curti, M. P. Simonetta, A study on apoenzyme from *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *Eur J Biochem* 197, 513-517 (1991).
173. D. K. Manter, J. M. Vivanco, Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *J Microbiol Methods* 71, 7-14 (2007).
174. T. Sugita, A. Nishikawa, R. Ikeda, T. Shinoda, Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *J Clin Microbiol* 37, 1985-1993 (1999).
175. C. L. Schoch et al., Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 109, 6241-6246 (2012).
176. G.-Y. Yow, T. Uo, T. Yoshimura, N. Esaki, D-Amino acid-N-acetyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*: a close homologue of histone acetyltransferase Hpa2p acting exclusively on free D-amino acids. *Arch Microbiol* 182, 396-403 (2004).
177. S. Takahashi, H. Okada, K. Abe, Y. Kera, D-Amino Acid-Induced Expression of D-Amino Acid Oxidase in the Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Microbiol* 65, 764-769 (2012).
178. G. Molla, L. Motteran, L. Piubelli, M. S. Pilone, L. Pollegioni, Regulation of D-amino acid oxidase expression in the yeast *Rhodotorula gracilis*. *Yeast* 20, 1061-1069 (2003).
179. L.-L. Lin et al., Expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase gene in *Escherichia coli* and characterization of its inactive mutants. *Enzyme Microb Technol* 27, 482-491 (2000).
180. M. Grenson, C. Hou, M. Crabeel, Multiplicity of the Amino Acid Permeases in *Saccharomyces cerevisiae* IV. Evidence for a General Amino Acid Permease. *J Bacteriol* 103, 770-777 (1970).
181. D. J. Porter, J. G. Voet, H. J. Bright, Mechanistic features of the D-amino acid oxidase reaction studied by double stopped flow spectrophotometry. *J Biol Chem* 252, 4464-4473 (1977).
182. P. Partanen, J. Hultman, L. Paulin, P. Auvinen, M. Romantschuk, Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiol* 10, 94-94 (2010).
183. S. Sacchi et al., Engineering the substrate specificity of D-amino-acid oxidase. *J Biol Chem* 277, 27510-27516 (2002).
184. K. Subramanian et al., Modulating D-amino acid oxidase (DAAO) substrate specificity through facilitated solvent access. *PLoS one* 13, e0198990 (2018).
185. N. V. Komarova, I. V. Golubev, S. V. Khoronenkova, T. A. Chubar, V. I. Tishkov, Engineering of substrate specificity of D-amino acid oxidase from the yeast *Trigonopsis variabilis*: directed mutagenesis of Phe258 residue. *Biochemistry (Mosc)* 77, 1181-1189 (2012).

186. Y. Nishina, K. Sato, R. Miura, K. Shiga, Substrate Recognition and Activation Mechanism of D-Amino Acid Oxidase: A Study Using Substrate Analogs. *J biochem* 128, 213-223 (2000).
187. L. Pollegioni, A. Falbo, M. S. Pilone, Specificity and kinetics of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1120, 11-16 (1992).
188. D. Romano, G. Molla, L. Pollegioni, F. Marinelli, Optimization of human D-amino acid oxidase expression in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 68, 72-78 (2009).
189. Y. Nishina, K. Sato, R. Miura, K. Shiga, Substrate recognition and activation mechanism of D-amino acid oxidase: a study using substrate analogs. *J Biochem* 128, 213-223 (2000).
190. M. G. Sarower, S. Okada, H. Abe, Catalytic and structural characteristics of carp hepatopancreas D-amino acid oxidase expressed in *Escherichia coli*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 140, 417-425 (2005).
191. G. D. Haki, S. K. Rakshit, Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour. Technol.* 89, 17-34 (2003).
192. I. Lasa, J. Berenguer, Thermophilic enzymes and their biotechnological potential. *Microbiologia* 9, 77-89 (1993).
193. H. Mizutani et al., Three-dimensional structure of porcine kidney D-amino acid oxidase at 3.0 Å resolution. *J Biochem* 120, 14-17 (1996).
194. T. Kawazoe, H. Tsuge, M. S. Pilone, K. Fukui, Crystal structure of human D-amino acid oxidase: context-dependent variability of the backbone conformation of the VAAGL hydrophobic stretch located at the si-face of the flavin ring. *Protein Sci* 15, 2708-2717 (2006).
195. H. Akita, T. Seto, T. Ohshima, H. Sakuraba, Structural insight into the thermostable NADP⁺-dependent meso-diaminopimelate dehydrogenase from *Ureibacillus thermosphaericus*. *Acta Crystallogr D* 71, 1136-1146 (2015).
196. L. Betancor et al., Use of physicochemical tools to determine the choice of optimal enzyme: stabilization of D-amino acid oxidase. *Biotechnol Prog* 19, 784-788 (2003).
197. M. Korabecna, The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8S rRNA Gene): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (A. Méndez-Vilas 2007).
198. W. Kabsch, XDS. *Acta Crystallogr D* 66, 125-132 (2010).
199. P. Evans, Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D* 62, 72-82 (2006).
200. P. Evans, An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallogr D* 67, 282-292 (2011).
201. A. A. Vagin et al., REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr D* 60, 2184-2195 (2004).
202. P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D* 66, 486-501 (2010).
203. A. K. Dunker, C. J. Brown, J. D. Lawson, L. M. Iakoucheva, Z. Obradović, Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry* 41, 6573-6582 (2002).
204. A. Boselli, S. Sacchi, V. Job, M. S. Pilone, L. Pollegioni, Role of tyrosine 238 in the active site of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *Eur J Biochem* 269, 4762-4771 (2002).

205. T. Yano et al., A novel fluorescent sensor protein for visualization of redox states in the cytoplasm and in peroxisomes. *Mol Cell Biol* 30, 3758-3766 (2010).
206. L. Piubelli, L. Caldinelli, G. Molla, M. S. Pilone, L. Pollegioni, Conversion of the dimeric D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis* to a monomeric form. A rational mutagenesis approach. *FEBS Lett* 526, 43-48 (2002).
207. R. Fernandez-Lafuente, Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme Microb Technol* 45, 405-418 (2009).
208. N. Maeda, T. Kanai, H. Atomi, T. Imanaka, The unique pentagonal structure of an archaeal Rubisco is essential for its high thermostability. *J Biol Chem* 277, 31656-31662 (2002).
209. S. Takahashi, K. Abe, Y. Kera, Bacterial D-amino acid oxidases: Recent findings and future perspectives. *Bioengineered* 6, 237-241 (2015).
210. T. Lundqvist et al., Exploitation of structural and regulatory diversity in glutamate racemases. *Nature* 447, 817-822 (2007).
211. T. J. Stillman, P. J. Baker, K. L. Britton, D. W. Rice, Conformational flexibility in glutamate dehydrogenase. Role of water in substrate recognition and catalysis. *J Mol Biol* 234, 1131-1139 (1993).
212. A. Vagin, A. Teplyakov, Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D* 66, 22-25 (2010).
213. S. McNicholas, E. Potterton, K. S. Wilson, M. E. Noble, Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallogr D* 67, 386-394 (2011)