

氏 名 山 本 篤
学 位 の 種 類 博 士 (医 学)
学 位 記 番 号 博 士 (論) 第 3 4 8 号
学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 9 年 9 月 1 2 日
学 位 論 文 題 目 Functional and Structural Characterization of D-Aspartate Oxidase
from Porcine Kidney: Non-Michaelis Kinetics due to Substrate
Activation
(ブ タ 腎 臓 D-ア ス パ ラ ギ ン 酸 オ キ シ ダ ー ゼ の 構 造 と 機 能 : 基 質 活 性 化 に よ
る 非 ミ カ エ リ ス 型 酵 素 反 応)

審 査 委 員 主 査 教 授 大 久 保 岩 男
副 査 教 授 木 村 隆 英
副 査 教 授 木 村 博

論文内容要旨

※整理番号	352	(ふりがな) 氏名	やまもと あつし 山本 篤
学位論文題目	Functional and Structural Characterization of D-Aspartate Oxidase from Porcine Kidney: Non-Michaelis Kinetics due to Substrate Activation (ブタ腎臓 D-アスパラギン酸オキシダーゼの構造と機能：基質活性化による非ミカエリス型酵素反応)		
<p>【目的】</p> <p>D-アスパラギン酸 (D-Asp) は、哺乳類の下垂体や松果体のような神経内分泌系に高レベル (~mM) 存在する。D-Asp レベルが正常に維持できないと、神経内分泌系ホルモンの合成・分泌に影響し、摂食行動異常などが出現する。D-Asp の合成・輸送・分解の協調的制御機構は、ほとんど分かっていない。</p> <p>D-Asp の主たる分解酵素は、D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO) である。しかし、DDO は精製が非常に困難で、ウシとヒトの DDO の性状の一部が知られているのみである。そこで本研究では、DDO を大量に発現しているブタ腎臓に着目し、そこから初めて DDO を精製・クローニングし、その性質を詳細に解析した。</p> <p>【方法】</p> <p>(1) ブタ腎臓粗ペルオキシソーム画分より、酒石酸存在下で、熱変性と各種クロマトグラフィーを組み合わせ、DDO を精製した。(2) 精製酵素の純度は SDS-PAGE で評価した。サブユニットの分子量は、MALDI-TOFMS で測定した。天然酵素の分子量は、HPLC ゲルろ過と光散乱を組み合わせ、GPC-LALLS 法で測定した。(3) 補酵素の同定は、吸収スペクトルの測定と薄層クロマトグラフィーにより行った。(4) ブタ DDO cDNA のクローニングは、ブタ腎臓から Total RNA を精製し、RT-PCR と RACE 法を用いて行った。(5) ブタ DDO cDNA を pET/D-TOPO ベクターに組み込み、発現ベクター (pETDDO) を作成した。大腸菌 BL21star(DE3) 株を、pETDDO で形質転換した。(6) 発現酵素は、His-Trap カラム、エンテロキナーゼによる His-tag の除去、ゲルろ過カラムにより精製した。(7) 活性測定には、酸素電極法、フェニルヒドラジン法、HPLC による α-ケト酸定量法を用いた。(8) タンパク質定量は BCA 法で行い、精製酵素のホロサブユニット濃度は 450 nm の吸光度から求めた。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】

(1) ブタ DDO は、分子質量 160 kDa のホモ 4 量体であった。(2) 補酵素は、FAD のみであった。(3) DDO のモノマーは、341 アミノ酸からなり、ウシ・ヒト・マウス DDO と高い相同性を示した (約 80%)。フラビン結合配列 (GAGVMG) と PTS 配列 (SKL) が保存されていた。(4) メソ酒石酸、L-酒石酸、マロン酸、D-酒石酸は、ブタ DDO にこの順で強く結合した ($K_d = 0.12, 1.4, 2.6, 20 \text{ mM}$)。 (5) DDO を大腸菌で大量発現し、培養液 1 リットルあたり約 10 mg のホロ酵素が得られた。発現酵素と精製酵素に、有意な違いはなかった。(6) DDO は、D-Asp、D-Glu に対して基質活性化を、NMDA に対して基質阻害をそれぞれ示し、非ミカエリスメンテン型のキネティクスに従った。(7) 基質活性化/阻害のメカニズムを説明する反応モデルを考案し、このモデルに基づくデータ解析法を確立した。

【考察】

(1) 本酵素は、触媒反応中に遊離型の還元型酵素 (Er) が生成する。基質濃度が高くなると、還元型酵素-基質複合体 (Er-S) が形成され、この Er-S が酸素と反応することによって酸化型酵素-基質複合体 (Eo-S) ができる。この反応経路が、酸化型酵素 (Eo) から始まる反応経路と競合することで、基質活性化が起こることが明らかになった。(2) 本酵素の触媒としての性質は、4 つのパラメータ (A1~A4) で特徴付けられる。このうち、A1 は濃度の単位を持ち、酸素濃度が低いほど小さくなる。基質濃度が A1 に等しい時、Er から Eo が生成する速度と、Er から Er-S を経て Eo-S が生成する速度が等しくなる。D-Asp に対する A1 は $177 \mu\text{M}$ なので、神経内分泌系では Er から始まる $\text{Er} \rightarrow \text{Er-S} \rightarrow \text{Eo-S} \rightarrow \text{Er-P} \rightarrow \text{Er} + \text{P}$ の経路で D-Asp が分解されていると考えられる。すなわち、Eo だけでなく、Er も触媒作用を示す。(3) 基質活性化/阻害の現象は、L-アスパラギン酸オキシダーゼ、L-アミノ酸オキシダーゼ、モノアミンオキシダーゼなど、他のフラビン依存性オキシダーゼでも報告されている。これらに関しても、遊離型の還元型酵素も触媒として機能するという、今回提案した反応モデルを用いて、統一的に解析できる可能性が考えられる。(4) 本酵素は、D-Asp 濃度がある濃度を超えると、より速く D-Asp を分解する。従って、本酵素が D-Asp の生理的濃度の維持機構の一つであることを示唆する。

【結論】

ブタ DDO を初めて精製・クローニングし、大腸菌での大量発現を行なった。本酵素は、D-Asp に対して基質活性化を示した。基質活性化のメカニズムから、D-Asp が高濃度で酸素が低濃度という生理的条件下で、DDO が D-Asp の細胞内濃度の維持に関与していることが示された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	352	氏名	山 本 篤
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>D-アスパラギン酸は神経内分泌系に高濃度存在し、ホルモンの合成・分泌に関与しているが、その合成・輸送・分解の調節機構はほとんど分かっていない。</p> <p>本研究では分解酵素の D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO) に着目し、酵素含有量の高いブタ腎臓から初めて酵素を精製・クローニングし、その性質を解析したものである。</p> <p>その結果、DDO は FAD を補酵素とするホモ 4 量体酵素であり、D-アスパラギン酸と D-グルタミンに対して基質活性化を、N-メチル-D-アスパラギン酸に対しては基質阻害を示す非ミカエリス型酵素であることを見いだした。この現象は、酸化型酵素だけでなく還元型酵素も触媒作用を示す、という反応モデルで説明される。高濃度 D-アスパラギン酸・低濃度酸素という生理的条件下で DDO は活性化され、その結果 D-アスパラギン酸の細胞内濃度が保たれる。ここで初めて示された反応機構は他のフラビン酵素にも適用でき、オキシダーゼ反応を統一的に解析できる道を切り開いた。</p> <p>以上より、本論文は博士 (医学) の学位論文に値する。</p>			
(平成 19 年 8 月 31 日)			