

N-15

アフリカツメガエル *Xenopus laevis* からの D-アミノ酸オキシダーゼの精製と酵素的性質Purification and properties of D-amino-acid oxidase from *Xenopus laevis*○古谷隆司¹, 相馬宏樹¹, 谷川実², 長田洋子²○Ryuji Furuya¹, Hiroki Soma¹, Minoru Tanigawa², Yoko Nagata²

In larvae of *Xenopus laevis*, we previously detected D-proline and D-amino acid oxidase activity. The enzyme activity was highest in stages 54-57 larvae. We purified the enzyme protein about 7500-fold by three successive column chromatographies; hydrophobic chromatography, anion exchange chromatography, and gel filtration chromatography. The optimal temperature and pH of the enzyme were formed to be 38°C and 8.2, respectively. The enzyme showed the highest activity to D-proline.

【緒言】

従来、D-アミノ酸は真核生物では利用されないとされていたが、近年さまざまな高等生物において、遊離型 D-アミノ酸とその代謝酵素の存在が報告されている。本研究では、高等な真核生物として、発生、変態のモデルに広く利用されているアフリカツメガエル *Xenopus laevis* の幼生に D-プロリンが存在することを見出し、D-アミノ酸代謝酵素の一つである D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) の活性も検出した。本研究では、D-アミノ酸オキシダーゼの働きと幼生の変態との関係を明らかにするために、*X. laevis* 幼生 (stage 54-57) より本酵素を精製し、その酵素学的性質を調べた。

【方法】

〈D-アミノ酸オキシダーゼの精製〉

X. laevis 幼生 (stage 54-57) を等倍量 (v/w) の 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM dithiothreitol (DTT), 5% glycerine を含む 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl (Tris-HCl) buffer (pH 8.2) 中で、Polytron 型ホモジナイザーを使用し十分にすり潰した。これを遠心分離 (14,500 g × 20 min) し、得られた無細胞抽出液からさらに超遠心分離 (140,000 g × 40 min) により可溶性画分を得た。可溶性画分に 0-30%飽和になるよう、硫酸アンモニウム (硫酸) を加え塩析、遠心分離 (14,500 g × 20 min) により沈殿を除去した液に 30-45%飽和になるように硫酸を加えた。生じた沈殿を 10 μM flavin adenine dinucleotide (FAD), 10% glycerine を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に懸濁し、Butyl Toyopearl を用いて疎水クロマトグラフィーを行った。溶出した DAO 画分を 10 μM FAD, 10% glycerine を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) に透析し、Q Sepharose を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。得られた DAO 画分を Amicon Ultra-15 (5000 NMWL) を用いて濃縮し、Sephacryl S100 によるゲルろ過分子篩クロマトグラフィーを行い、精製酵素標品を得た。

〈D-アミノ酸オキシダーゼの活性測定〉

酵素標品を 20 mM D-プロリン, 西洋ワサビペルオキシダーゼ, sodium 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid, 4-aminoantipyrine などを含む 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2) 中, 37°C, 10 分間反応させ, 100 mM sodium borate buffer (pH 10.0) を加え反応を停止後, 500 nm の吸光度変化を測定し, DAO 酵素反応により産生した H₂O₂ を定量することにより比活性を算出した。

【結果と考察】

X. laevis 幼生から DAO の精製を進めた結果, Q Sepharose 後の時点で精製倍率 439 倍の DAO 活性画分が得られた。ここまでの操作を 4 回繰り返し, 活性画分を収集した後, Sephacryl S100 によるゲルろ過クロマトグラフィーを行った。精製酵素標品は 8.6 μmol/min/mg の DAO 活性を示し, 約 7490 倍に精製できた (Table 1)。

精製酵素標品を用いて基質特異性について調べた結果 (Fig. 1), 本酵素は D-プロリンに対して高い活性を示し,

1: 日大理工・学部・応化 2: 日大理工・教員・応化

L-アミノ酸にはほとんど活性を示さないことがわかった。今回調べた 14 種の基質アミノ酸の中では D-プロリンに次いで高い活性を D-フェニルアラニンに対して示したが、その程度は D-プロリンに比べて 1/3 に満たないことから、本酵素は D-プロリンに特異的に働き、生体内でも D-プロリンを主たる基質としていると予測される。また、本酵素反応の pH 依存性、温度依存性を調べた結果、最適 pH は 8.2、最適温度は 38°C 付近であった。30°C から 40°C の範囲で最適温度下の 95% の活性が見られた。これらの結果から、本酵素は変温動物である *X. laevis* の体内で、その温度変化に広く対応できることが示唆された。

本酵素の精製度を調べるために、現在、精製酵素標品の SDS ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による解析を行っている。今後、DAO の N 末端配列を明らかにするために、クロマトグラフの方法を再検討し、最適な条件を見つけて本酵素タンパク質を単一成分になるまで精製したい。

Table 1. Purification of D-amino acid oxidase

Purification fraction	Specific activity (nmol/min/mg)	Total activity (nmol/min)	Yield (%)	Purification (fold)
Cell-free extract	1.15	6631.59	100	1
30-45% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate	3.46	1843.32	27.80	3.01
Butyl-toyopearl	180.45	1543.02	23.27	156.91
Q-sepharose	505.46	803.14	12.11	439.53
Sephacryl S100	8615.41	107.69	1.62	7491.67

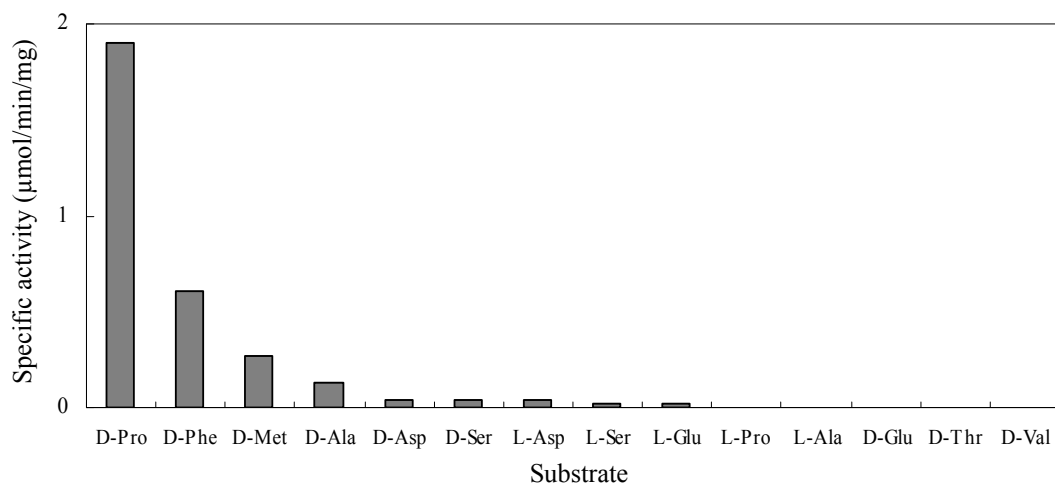


Fig. 1. Substrate specificity of D-amino acid oxidase

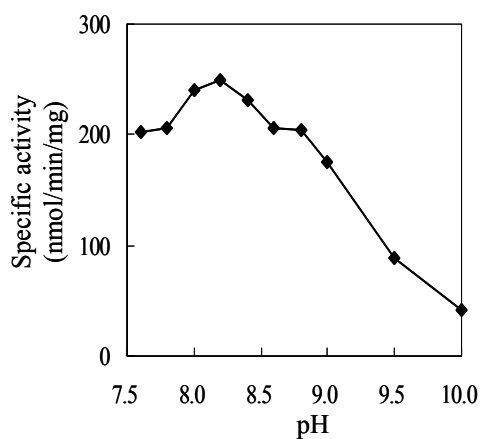


Fig. 2. pH dependency of D-amino acid oxidase activity

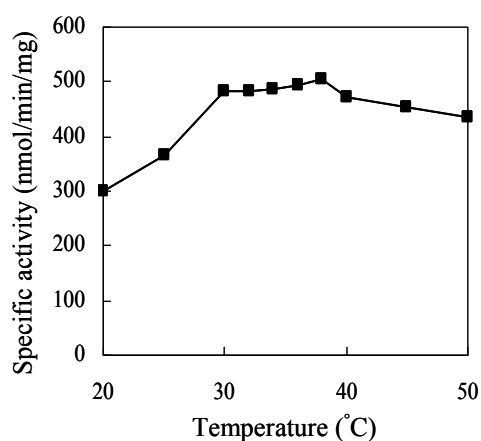


Fig. 3. Temperature dependency of D-amino acid oxidase activity