

Saccharomyces cerevisiae 由来 D-アミノ酸アセチルトランスフェラーゼの精製と性質

田代 (山田) 百合子, 田村 隆, 田中 英彦, 稲垣 賢二
(生物資源化学講座)

Purification and Some Properties of D-Amino Acid Acetyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*

Yuriko (Yamada) Tashiro, Takashi Tamura, Hidehiko Tanaka
and Kenji Inagaki

(Department of Bioresources Chemistry)

Some properties of D-amino acid acetyltransferase purified from *Saccharomyces cerevisiae* were investigated. The enzyme was purified to homogeneity by ammonium sulfate fractionation, column chromatographies on DEAE-Toyopearl 650 M, Butyl-Toyopearl 650 M, Sephacryl S-200, QAE-Toyopearl 550C and affinity chromatography with D-glutamate as a ligand. The molecular weight was estimated to be about 53,000 by gel filtration. Relative molecular mass studies indicated that the enzyme was a monomer structure. The purified enzyme had an optimum pH of 8.4 and an optimum temperature of 40°C. The K_m values of the purified enzyme determined with tryptophan and acetyl-CoA were $4.5 \times 10^{-3} \text{M}$ and $0.7 \times 10^{-3} \text{M}$, respectively. The 20 residues of N-terminal amino acid sequence were analyzed.

Key words : D-amino acid acetyltransferase, *Saccharomyces cerevisiae*, acyl donor, affinity chromatography

緒 言

グリシン以外のアミノ酸には、不斉炭素原子が存在し、D型、L型の2種類の立体配置を取り得る。D型アミノ酸は、その化学的性質においてはL型と全く同じであるが、生理的性質はかなり異なっている。天然に存在するほとんどすべてのタンパク質はL-アミノ酸からできており、D-アミノ酸は含まれていない。しかし、D-アミノ酸を基質として用いる酵素が幾つか報告されている。一つには現在D-アミノ酸の鋭敏な検出に広く用いられているD-アミノ酸オキシターゼ(EC 1.4.3.3)がある¹⁾。この酵素は構造と機能の相関についてD-アミノ酸代謝関連酵素としては最も盛んに研究されている酵素の一つである。D-アミノ酸デヒドロゲナーゼは *Pseudomonas*, *Escherichia* 属細菌に存在し、各種D-アミノ酸に作用する酸化還元酵素である²⁾。そのほかにも細菌の細胞膜成分であるD-アラニンやD-グルタミン酸の合成を触媒するD-アミノ酸トランスアミラーゼが知られている³⁾。

D-アミノ酸アセチルトランスフェラーゼは生体内でD-アミノ酸のアミノ基へアセチル基を転移する反応を触媒する酵素である。本酵素は1995年に Zenk と Schmitt によって発見され、部分精製標品の性質が明らかにされており^{4,5)}、現在、*Saccharomyces cerevisiae* にのみ存在し、

他の酵母や細菌、カビには一切存在しないことが確認されている。現在までに本酵素が均一に精製された報告例はなく、本酵素を均一に精製することはタンパク質レベルでの研究に重要な役割を果たすと考えられている。さらに、精製酵素標品をもとに合成オリゴヌクレオチドプローブを作成し、クローニングを行うことにより、本酵素の大量生産及び遺伝子レベルでの研究が可能となり、本酵素の *S. cerevisiae* 内の役割やその構造と機能の関係についての詳細な知見が得られると期待される。本報では市販のパン酵母からの本酵素精製と諸性質の検討を行った。

材料と方法

酵素活性の測定⁴⁾

D-トリプトファン10 μmol 、アセチルリン酸5 μmol 、CoA 0.13 μmol 、ホスホトランスアセチラーゼ0.2 unit、Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.4) 100 μmol 、フッ化カリウム40 μmol を含む反応混合液0.7mlに酵素液0.3mlを添加して反応を開始した。30°C、60分間反応を行わせた後2 N H_2SO_4 を添加して反応を停止した。脱塩水0.2mlを加え、遠心分離によりタンパク質を除去した後、その上澄1 ml

に0.05 N NaOH を1 ml加え1分間振とうし、3分間静置した。そして、その水層0.5 mlをとり *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド試薬 (12 N HCl に対して0.5% *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液) 2.5 mlを添加し、室温で暗所に30分間静置した後、99%エタノール2.5 mlと0.2 N NaNO₂溶液50 mlを加え、再び暗所に30分間静置して、発色した青色を620 nm で比色定量した (島津 UV-1200)。酵素1 unit とは30°Cで1分間に1 μmol のアセチル-D-トリプトファンを生成する酵素量と定義した。

酵素タンパク質の定量には Bio-Rad protein assay を用いた。適度に希釈した酵素溶液0.8 mlに Bio-Rad protein assay 試薬0.2 mlを添加した後、5分間放置し、595 nm の吸光度を測定した。精製が進んだ段階(280 nm/260 nm=1.5以上のとき)では光路長1 cmのセルを用いて280 nm の吸光度を測定し、1 mg/mlの溶液を1と仮定して概算した。

アフィニティーカラムの作成

硫酸5.1 mmolを10 mlのメタノール中に加え攪拌後、D-グルタミン酸3.25 mmol を加え30°Cで3時間振とうした。Na₂CO₃で中和し、氷中で冷却し再結晶を行った。これを濾過し乾燥することによってD-グルタミン酸-γ-メチルエステルを作成した⁶⁾。Sephacryl S-300の50%水懸濁液20 mlに対して2 M Na₂CO₃20 mlを加え穏やかに攪拌した。これにアセトニトリル溶液(2 g/ml)の1 mlを加えさらに1-2分間攪拌後、0.1 M NaHCO₃ (pH 9.5) 500 mlを用いて洗浄した。冷水500 mlで洗浄した後、0.1 M NaHCO₃ (pH 10.0) で洗浄した。このゲルに0.1 M NaHCO₃に溶解し pH を10.0に調整したジアミンヘキサミン7.2 mmolを加え、30°Cで16時間振とうし、ガラスフィルターで濾過した。得られた吸着体を1 M NaCl に懸濁し、室温で30分振とう後、1 M NaCl, 脱塩水(500 ml) で交互に洗浄した。さらに0.1 M NaHCO₃ (pH 10.0) 500 mlで洗浄した後、10 mlに懸濁した。これにD-グルタミン酸メチルエステル0.6 gを3 mlの脱塩水に懸濁したものをゆっくりと滴下した。30°Cで18時間反応させた後、濾過し、1 M NaCl と脱塩水で洗浄した。

酵素の精製

精製はすべて4°Cで行った。市販のパン酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, 鐘淵化学)をフレンチプレスで破碎後、細胞残さを遠心分離(20,000×g)により除き粗酵素液とした。硫酸アンモニウム分画, DEAE-Toyopearl 650 M, Butyl-Toyopearl 650 M, Sephacryl S-200, QAE-Toyopearl 550 C, D-グルタミン酸-Sepharose アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて精製を行った。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Davis らの方法⁷⁾に従って行った。分離用ゲル濃度は7.5%で行った。ディスク1本あたり2 mA の定電流で泳動した。タンパク質の染色は0.25% Coomassie brilliant blue

R-250, 10%酢酸を含んだ45%メタノール溶液で行った。**分子量の測定**

精製酵素の分子量は Sephacryl S-300により決定した。標準タンパク質として牛血清アルブミン(M.W. 67,000), 卵白アルブミン(M.W. 43,000), キモトリプシノーゲン A (M.W. 25,000) リボヌクレアーゼ A (M.W. 13,700) を用いた。

また、サブユニットの分子量は SDS-ポリアクリルアミドゲル(PAGE)電気泳動法により行った。標準タンパク質として牛血清アルブミン(M.W. 67,000), 卵白アルブミン(M.W. 43,000), カルボニックアンヒドラーゼ(M.W. 30,000)ダイズトリプシンインヒビター(M.W. 20,100), α-アルブミン(M.W. 14,400)を用いた。

N末端アミノ酸配列の決定

SDS-PAGEで泳動した後、ブロッティング用緩衝液(10 mM 3-シクロヘキシルアミノ-1-プロパンスルホン酸(pH 11)含有10%メタノール溶液)に5分間浸した。

ゲルと同様の大きさに濾紙(Whatman 3 MM Chr)と ProBlott™ (PVDF膜, Applied Biosystems社)を切り、数秒間100%メタノールに浸した後ブロッティング用緩衝液に浸した。ザルトブロットセミドライブロッター(Sartoblot II-S, Sartorius社)を用いて室温において定電流150 mAで1時間ブロッティングした。タンパク質の検出には0.1%Comasie brilliant blue R-250, 1%酢酸を含んだメタノール溶液を用いた。脱色は50%メタノール溶液で行い、Pro-Blott™膜を蒸留水で洗浄し、乾燥後、目的タンパク質を切り出した。そして、Applied Biosystems プロテインシークエンサー477A, PTH アミノ酸分析機120Aを用いてN末端アミノ酸配列を決定した。

結果と考察

酵素の精製

本報ではアフィニティークロマトグラフィーを用いて高純度に精製することを試みた。担体には非特異的吸着が低く、しかも多孔性が非常に高く化学的安定性に優れたアガロース(Sephacryl)を用いた。リガンドには、スパーサーのジアミンと結合することにより、高い活性を示すグルタミンの構造を取ることのできるグルタミン酸を用いた。

市販のパン酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 2 kgを用いて精製を行った。Table 1に示した各精製ステップを踏むことによって、収率は1.7%と高くはないものの、13,600倍に精製できた。精製酵素14 mgを用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったところ、電気泳動的にはほぼ均一であった(Fig. 1)。

以前の報告に比べ、精製段階の簡略化することができた。しかしながら、収率は良くなかった。また今回アフィニティークロマトグラフィーによる精製を行ったが、リガンドをグルタミン酸でなく他のアミノ酸を用いるこ

Table 1 Summary of purification of D-amino acid acetyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (mU)	Specific activity (mU/mg)	Yield (%)
Crude extract	126,000	49,000	0.39	100
Ammonium sulfate fractionation (35-50%)	38,000	47,000	1.2	96
DEAE-Toyopearl 650M	250	27,000	110	55
Butyl-Toyopearl 650M	37	15,000	410	31
Sephacryl S-200	6	7,200	1,200	15
QAE-Toyopearl 550C	1.8	5,200	2,900	11
D-Glu-Sepharose	0.16	850	5,300	1.7

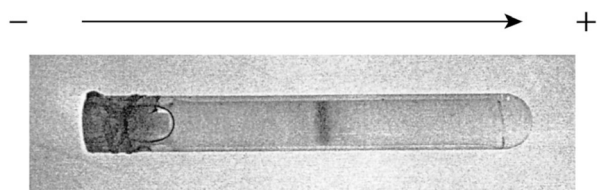


Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis of purified enzyme. The purified D-Amino acid acetyltransferase (14 μ g) was subjected to 7.5% polyacrylamide disc gel electrophoresis. Protein was stained with Coomassie brilliant blue R250.

とにより、精製段階のさらなる簡略化および収率の上昇の可能性も期待される。

精製酵素の性質

精製酵素の等電点 (pI) は pI マーカーによる標準曲線とゲルの pH 勾配から 5.0 であると推定された。この結果は本酵素が pH 7.5 で弱陰イオン交換クロマトグラフィー DEAE-Toyopearl 650M に吸着することと一致した。0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0~8.0), 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5~9.0), 0.1 M Na₂CO₃-NaHCO₃ (pH 9.0~10.0) を用いて酵素活性に対する pH の影響を調べた結果、本酵素の最適 pH は 8.4 であった (Fig. 2)。酵素液に pH 2.5~11.5 の範囲の 0.1 M 緩衝液を加え、30°C で 30 分間保持した後、活性測定法の反応混合液に添加し、pH が 8.4 であることを確認した後 60 分間反応を行った。その結果 pH 4.0~10.0 の範囲では 100% の残存活性を示した (Fig. 3)。0~70°C の各温度で 60 分間反応させた場合 40°C に最大活性が認められた (Fig. 4)。

反応系でホスホトランスアセチラーゼを欠くと本酵素はアセチル化反応を触媒しないことからアセチルリン酸はアセチル基供与体ではなく、アセチル CoA がアセチル基供与体であることが判明した。アシル基供与体における基質特異性についてアセチル CoA (炭素数 2)、プロピオニル CoA (炭素数 3)、ブチル CoA (炭素数 4) の 3 つの活性を比較した。Table 2 に示すように本酵素活性は炭素数の増加に伴って減少していった。一方アシル基受容体の基質特異性について調べた結果を

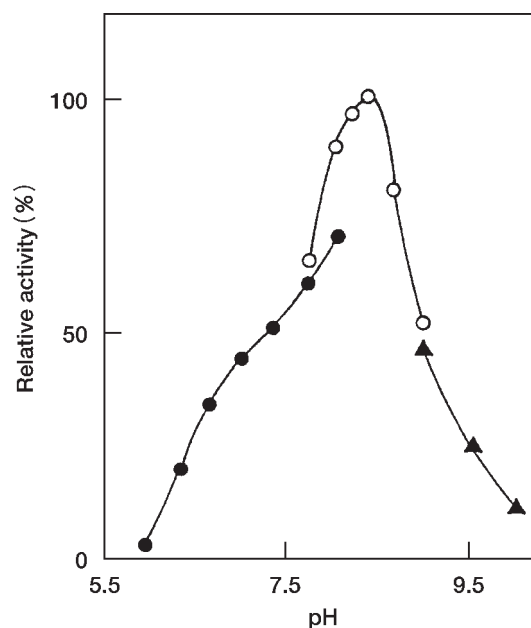


Fig. 2 Effect of pH on the enzyme activity. The enzyme activity was measured in the following buffer: ●, 0.1 M potassium phosphate; ○, 0.1 M Tris-HCl; ▲, 0.1 M Na₂CO₃-NaHCO₃.

Table 3 に示した。本酵素はすべての D-アミノ酸に作用したが、L 体には一切作用しなかった。非極性アミノ酸の多くが高い活性を示し、負電荷をもつアミノ酸は活性が低いという特性が見られた。側鎖が枝分かれしているロイシンと直鎖であるノルロイシンに対する活性を比較すると、ロイシンは 73%、ノルロイシンは 104% とノルロイシンの方が高い活性を示した。このことより側鎖は疎水性を示し、直鎖であるとより高い活性を示すであろうと予想された。DL 体は D 体とほぼ同じ活性であったことから、L 体は何の影響も与えていないと考えられた。さらに光学不活性なグリシンやタウリンにわずかながら作用し、 β -アミノ酸である β -アラニンにも 10% の活性が確認できた。D 体のアミノ基をもっているセファロsporin C やジペプチドである D-アラニルアラニンには作用しなかった。

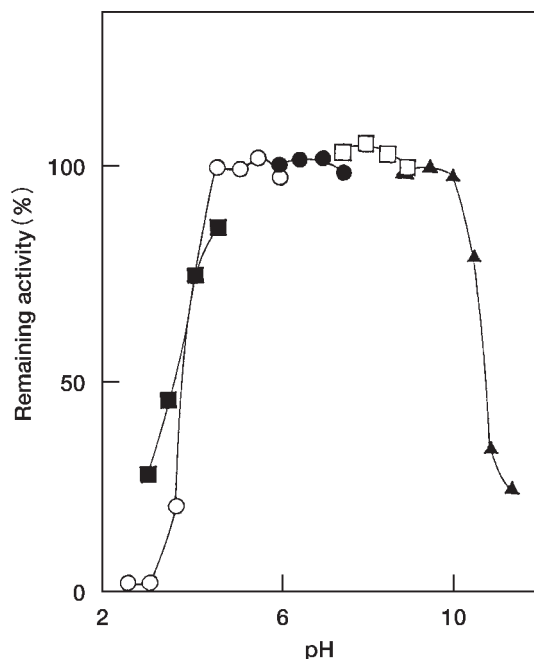


Fig. 3 Effect of pH the on enzyme stability.

The enzyme activity was measured after incubation of the enzyme at the indicated pH and at 30°C for 30 min in the following buffer; ■, CH₃COOH-HCl; ○, CH₃COONa-CH₃COOH; ●, potassium phosphate; □, Tris-HCl; ▲, Na₂CO₃-NaHCO₃

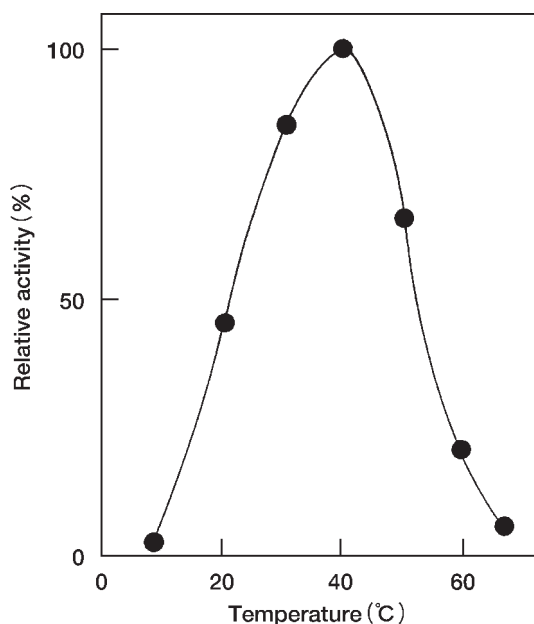


Fig. 4 Effect of temperature on the enzyme activity.

The enzyme activity was measured in a 1 ml reaction mixture containing 10 μmol D-tryptophan, 1.5 μmol acetyl-CoA, 100 μmol Tris-HCl buffer, pH 8.4 and 0.5 ml enzyme solution at various temperature.

Table 2 Acyl donors substrate specificity of D-amino acid acetyltransferase

Acyl donor	Relative activity (%)
Acetyl-CoA	100
Propionyl-CoA	69
Butyl-CoA	8.6

Table 3 Substrate specificity of D-amino acid acetyltransferase

Substrate	Relative activity (%)		
	D	L	DL
Tryptophan	100	0	107
Alanine	103	0	109
Valine	67	0	—
Leucine	73	0	—
Phenylalanine	102	0	116
Methionine	117	0	136
Serine	120	0	—
Threonine	40	0	—
Lysine	60	0	—
*Tyrosine	16	0	—
*Cysteine	73	0	—
Glutamine	134	0	—
Asparagine	122	0	—
Arginine	64	0	—
Histidine	119	0	—
Aspartate	16	0	—
Glutamate	22	0	26
Norleucine	104	0	115
Norvaline	—	—	139
*Cystine	23	0	—
Ornithine	76	0	—
Penicillamine	43	0	41
Alanylalanine	0	0	—
Phenylglycine	107	—	—
Cephalosporine C	0	—	—
Glycine	38	—	—
Taurine	6	—	—
β-Alanine	10	—	—

*Substrate concentration: Tyrosine 1.3 μmol, Cysteine 6.0 μmol, Cystine 3.0 μmol, other L and D-amino acid 10 μmol, DL-amino acid 20 μmol

次にアミノ基を2つもつアミノ酸ではどちらにアセチル基が転移されているのかという問題がある。そこでD-リジンについて調べてみた。アミノ基はニンヒドリンによって発色するが、一級アミノ基は570 nm に二級アミノ基は405 nm に吸収極大をもっている。もし、リジンの α 位と ε 位の両方のアミノ基がアセチル化されているなら、405 nm の吸収しかないはずである。しかし、アセチル-D-リジンには405 nm と570 nm の両方に吸収極大が見られ

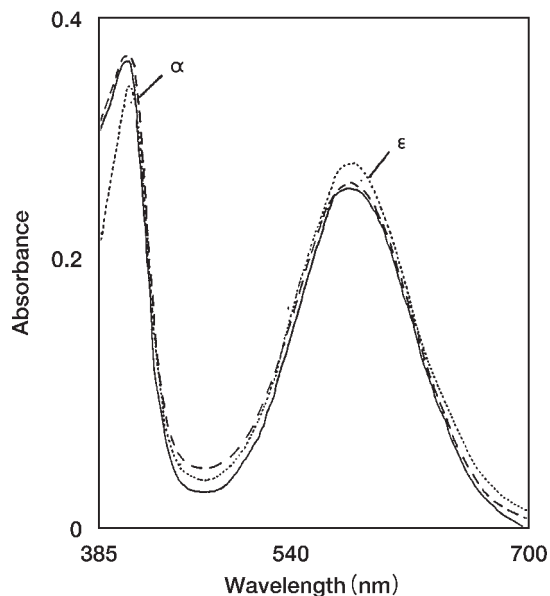


Fig. 5 Absorption spectrum of *N*-acetyl-D-lysine with ninhydrine.

N-acetyl-D-lysine (—), *N*_α-acetyllysine (---), *N*_ε-acetyllysine(· · · · ·)

た。このことはリジンのどちらか片方のアミノ基がアセチル化されているということを示す。そこで、*N*_α-アセチルリジンと *N*_ε-アセチルリジンをそれぞれニンヒドリンで発色した後、吸収スペクトルを測定した (Fig. 5)。α と ε では405nm と570nm の吸収極大の比 (405nm/570nm) が異なっていた。 *N*_α-アセチルリジンではその比が1.4, *N*_ε-アセチルリジンでは1.2であった。D-リジンの反応生成物は405nm/570nm が1.4であったことから、α 位のアミノ基がアセチル化されていると推定された。

D-トリプトファンとアセチル-CoA 濃度をそれぞれ変えて酵素活性を測定し、両逆数プロットを行った (Fig. 6)。それぞれの勾配と切片から *K*_m 値を求めた。D-トリプトファンに対しては 4.5×10^{-3} M, アセチル CoA に対しては 0.7×10^{-3} M であった。Fig. 6 から本酵素反応は Ordered 機構であると予想された。

分子量をゲル濾過法で求めたところ、53,000と算出された。SDS-PAGE では1本のバンドが確認され、その分子量は53,000であったことより本酵素は単量体酵素であることが示唆された。

SDS-PAGE に供して得られた53,000のバンドを PVDF 膜にエレクトロブロットングし、直接その膜をアミノ酸分析機に供した。その結果、MLNILVLGNGAREHV LVTKL の20残基のN末端を決定することができた。この配列を *Saccharomyces cerevisiae* のゲノムデータと相同性検索したところ、*HPA 3* 遺伝子にコードされるヒストンアセチルトランスフェラーゼN末端20残基の配列と完全に一致した。

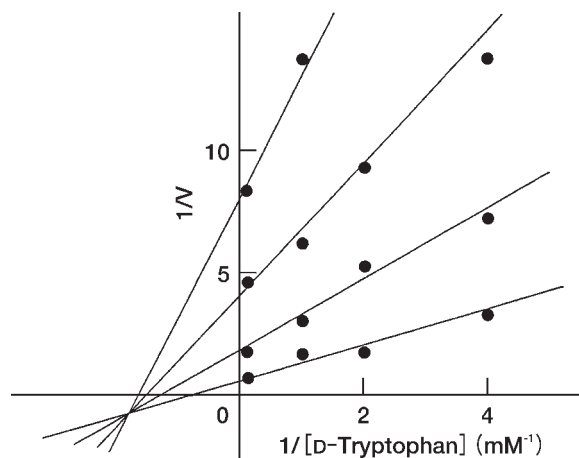


Fig. 6 Effect of substrate concentration on the enzyme activity.

D-Tryptophan was used as substrate. Velocity (*V*) was expressed as mol of *N*-acetyl-D-tryptophan formed per liter per min and substrate concentration (*S*) as mol per liter.

本酵素の生理的役割を考察する上で大変興味深い結果である。

今回の結果が、今後の本酵素の構造と機能の解明につながり、実用化へ進むことが期待される。

要 約

パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* からD-アミノ酸アセチルトランスフェラーゼを精製し、その性質について検討した。硫酸分画, DEAE-Toyopearl 650Mクロマトグラフィー, Butyl-Toyoperl 650Mクロマトグラフィー, Sephacryl S-200クロマトグラフィー, QAE-Toyoperl 550 Cクロマトグラフィー, D-グルタミン酸-Sepharose アフィニティークロマトグラフィーによって酵素を精製し、電気泳動的に均一な酵素が得られた。その分子量は53,000でモノマー酵素であることが確認された。精製酵素の至適 pH は8.4, 至適温度は40°Cであった。D-トリプトファンに対する *K*_m 値は 4.5×10^{-3} M, アセチル CoA に対する *K*_m 値は 0.7×10^{-3} M であった。さらにN末端アミノ酸配列の決定を行い、20残基のN末端を決定することができた。

文 献

- 1) Swenson, R.P., C.H., Jr. Williams, and V. Massey, : The primary structure of D-amino acid oxidase from pig kidney. *J. Biol. Chem.*, **257**, 8824-8834 (1982)
- 2) R.P. Paunio and W.T.Jenkins : D-Alanine oxidase from *Escherichia coli* : Localization and induction by L-alanine. *J. Bacteriol.*, **115**, 560-566 (1973)
- 3) Bhatia. M. B., A. Martinez del Pozo, D. Ring, T. Yoshimura, K. Soda, and J. M. Manning. : Role Reversal for substrates and inhibitors. Slow inactivation of D-amino

- acid transaminase by its normal substrates and protection by inhibitors. *J. Biol. Chem.*, **268**, 17687-17694 (1993)
- 4) Zenk, M. H. and J. H. Schmitt, : Purification and properties of acetyl-CoA : D - amino acid-alpha-N-acetyltransferase from yeast. *Biochem. J.*, **342**, 54-65(1965)
 - 5) Zenk, M.H. and Schmitt, J.H. : *Naturwiss.*, **51**, 510-511 (1964)
 - 6) Anderson. M. E., and A. Meister : Glutathione monoesters. *Anal Biochem.*, **183**, 16-20 (1989)
 - 7) Davis, B. J. : Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427 (1969)
 - 8) Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680 (1970)