

高基質特異性 L-グルタミン酸オキシダーゼより作成した 基質特異性改変酵素 L-アルギニンオキシダーゼの性質検討

中井隆一郎・藤野志保子・内海 友宏・田村 隆
日下部 均^{a)}・稲垣 賢二
(農芸化学コース)

Characterization of L-Arginine Oxidase Made from L-Glutamate Oxidase

Ryuichiro Nakai, Shihoko Fujino, Tomohiro Utsumi, Takashi Tamura,
Hitoshi Kusakabe^{a)} and Kenji Inagaki
(Course of Agrochemical Bioscience)

L-Glutamate oxidase (LGOX) from *Streptomyces* sp. X-119-6 has strict substrate specificity toward L-glutamate. Recently, we solved the X-ray crystal structure of LGOX and this revealed that Arg305 in the active site is the key residue involved in substrate recognition. Therefore, we created 19 mutant enzymes of R305X-LGOX by saturation mutagenesis. One of them R305D-LGOX, Arg305 substituted with Asp exhibited oxidase activity for L-Arg. Optimum pH of R305D-LGOX mutant enzyme was pH 8.5. Interestingly, the activity of R305D-LGOX toward L-Arg was inhibited by phosphate. And furthermore, the substrate specificity of R305D-LGOX was affected by using buffer. The results of inhibition analysis suggest, that phosphate is a competitive inhibitor of R305D-LGOX when L-Arg is used as substrate. Kinetic analysis of R305D-LGOX showed that K_m value and k_{cat} value of R305D-LGOX toward L-Arg were 0.68 mM and 6.7 s⁻¹ respectively. In this study, we showed that R305D-LGOX mutant enzyme is a novel L-arginine oxidase and useful for L-arginine biosensor.

Key words : L-glutamate oxidase, L-arginine oxidase, biosensor, modified substrate specificity, L-amino acid oxidase

緒 言

L-グルタミン酸オキシダーゼはL-グルタミン酸の酸化脱アミノ化反応を触媒するL-アミノ酸オキシダーゼの一種であり、一分子のL-グルタミン酸、酸素、水から一分子の α -ケトグルタル酸、過酸化水素、アンモニアを生成する反応を触媒する^{1,2,3}。*Streptomyces* sp. X-119-6由来L-グルタミン酸オキシダーゼ(LGOX)は蛇毒由来酵素等の一般的なL-アミノ酸オキシダーゼ(LAAO)とは異なり、非常に厳格な基質特異性を有している¹。また、高い熱安定性やpH安定性も有しているため、L-グルタミン酸の微量定量、検出という面で非常に有用で、現在、食品工業や医療分野でバイオセンサーとして幅広く活用されている^{1,3,4}。

これまでに我々は本酵素の結晶化及びX線結晶構造解析に成功し⁵、ドッキングスタディーと部位特異的変異酵素の解析により、305番のアルギニン残基(R305)がLGOXの基質認識に最も重要であることを明らかにした⁶。また、R305に部位特異的変異を導入することで基質特異性改変酵素の創出に成功している⁶。創出した変異酵素は何れもL-グルタミン酸に活性を示さず、

R305L-LGOXはL-ヒスチジンに、R305D-LGOXはL-アルギニンに最も高い活性を示した。

本研究で扱うR305D-LGOXの基質であるL-アルギニンには成長ホルモンの分泌の促進等の生理機能⁷があり、尿素回路のアルギナーゼ欠損によって血中のアルギニン濃度が上昇することも報告されている^{8,9}。そのため、食品中や血中のL-ヒスチジンやL-アルギニンの微量定量は食品工業分野での品質管理、医療分野での検査薬という点で非常に重要である。

本研究はR305D-LGOXの性質検討を行うことで、新規L-アミノ酸バイオセンサーとしての有用性について考察を行った。

材料と方法

1) 使用菌株及びプラスミド

目的タンパク質発現における組換えプラスミドpGOX-mallを用い、宿主には*Escherichia coli* JM 109株を用いた。

Received October 1, 2013

a) 株式会社エンザイムセンサ (Enzyme Sensor Co., Ltd.,)

2) 酵素活性測定法 (MBTH 法)¹⁰⁾

L-アミノ酸 1 μ mol, カタラーゼ 30 U, リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) もしくはホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.5) 70 μ mol を含む反応混合液 900 μ l に酵素液を 100 μ l 添加して反応を開始させた. 5 分間反応させた後, 反応液に 25% トリクロロ酢酸を 100 μ l 添加することで反応を終了させた. その後, 反応液に 1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を 1900 μ l, 0.1% 3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン (MBTH) を 800 μ l 添加し, 50°C で 30 分間恒温した. 恒温終了後は 20 分間室温で静置した後に反応液を 316 nm で比色定量を行った (島津 UVmini-1240). なお, 1 分間に 1 μ mol の α -ケト酸を生成する酵素量を 1 U と定義した.

3) 最適 pH の検討

pH 6.0~8.0 の範囲ではリン酸カリウム緩衝液を, pH 8.0~10.0 の範囲ではホウ酸ナトリウム緩衝液を用いて MBTH 法で活性測定を行い, 最適 pH を検討した. R305D-LGOX の基質には L-アルギニンを用いた.

4) 緩衝液の違いによる基質特異性の検討

20 種類の L-アミノ酸 1 mM を基質として用いて MBTH 法で活性測定を行い, 基質特異性を検討した. 緩衝液はリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) とホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.5) を用いた.

5) リン酸によるアルギニンオキシダーゼ活性の阻害様式の検討

ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.5) にリン酸を添加した後, 水酸化ナトリウムを用いて pH を 8.5 に再調製した緩衝液を用いて MBTH 法で活性測定を行い, Lineweaver-Burk プロットを用いてリン酸による阻害様式を検討した.

6) 反応速度論解析

最適条件において活性を示した基質 4 種類について MBTH 法で活性測定を行い, Lineweaver-Burk プロットを用いて速度論解析を行った.

結果と考察

1) 変異酵素の最適 pH

R305D-LGOX はホウ酸ナトリウム緩衝液の pH 8.0~8.5 を用いた場合に最も高い活性を示した (Fig. 1). 興味深いことに, R305D-LGOX では pH 8.0 のリン酸カリウム緩衝液を用いた場合の活性は, ホウ酸ナトリウム緩衝液を用いた場合の活性の 55% だった. 一方で, 野生型 LGOX ではリン酸カリウム緩衝液とホウ酸ナトリウム緩衝液の間で大きな活性の変化は確認されなかった.

2) 緩衝液の違いによる基質特異性への影響

R305D-LGOX は L-グルタミン酸には活性を示さず, L-アルギニンが最も良い基質であった. 他にリシン, チロシン, ヒスチジンに微弱な活性を示した (Fig. 2). リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を用いた場合, L-アルギ

ニンに対する活性はホウ酸ナトリウム緩衝液を用いた場合の 24% まで減少していた. また, L-リシンに対する活性はリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を用いた場合ではほぼ見られず, リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を用いた場合の L-ヒスチジンに対する活性はホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.5) を用いた場合の約 2 倍に上昇していた. 一方で, チロシン, フェニルアラニン, ロイシンに対する活性は 2 種類の緩衝液の間に変化は見られなかった. この基質特異性の変化は塩基性アミノ酸を基質として用いた場合に見られた. R305D-LGOX の活性部位での塩基性アミノ酸との結合は変異によって導入されたアスパラギン酸残基との酸塩基相互作用によるものであると考えられる. 緩衝液の種類もしくは pH がアスパラギン酸残基と基質との結合に影響を及ぼしていることが考えられる.

3) リン酸による L-アルギニンオキシダーゼ活性の阻害様式の検討

リン酸ナトリウム緩衝液を用いた場合でも, リン酸カリウム緩衝液と同様の活性の低下が確認され, Tris-HCl 緩衝液を用いた場合では, ホウ酸ナトリウム緩衝液を用いた場合と同等の活性を示したことから, リン酸が R305D-LGOX の L-アルギニンオキシダーゼ活性を阻害していると推測した. そのため, リン酸を終濃度 5, 10, 20, 40 mM 添加したホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.5) を用いて速度論解析を行った. その結果, V_{max} がほぼ一定であったためリン酸は R305D-LGOX の競合阻害剤であることが明らかになった (Fig. 3). リン酸カリウム緩衝液を用いた場合に活性が低下する基質と影響を受けない基質があるため, 活性部位に結合する古典的競合阻害ではなく, 阻害剤が活性部位の遠隔位で結合する非古典的競合阻害であると考えられる. 尚, R305D-LGOX のリン酸に対する阻害定数は (K_i) 39.4 mM だった. この値に

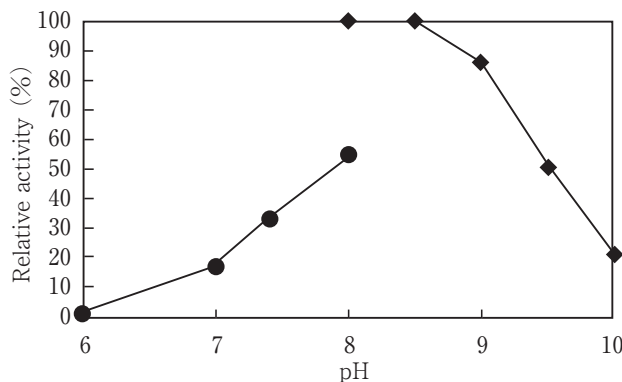


Fig. 1 Effect of pH on activities of R305D-LGOX mutant enzyme. The reaction was performed using potassium phosphate buffer at a pH range of 6.0-8.0 (●) and sodium borate buffer at a pH range of 8.0-10.0 (◆). L-Arginine was used as substrate.

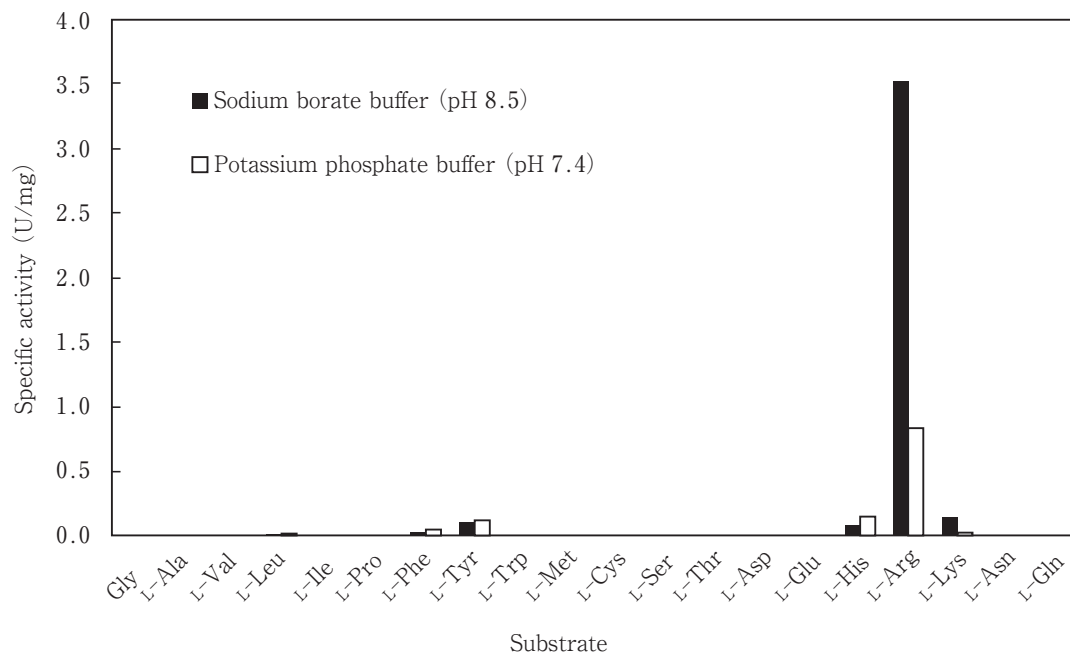


Fig. 2 Substrate specificities of R305D-LGOX mutant enzyme. The reaction was performed using sodium borate buffer (pH 8.5) (■) or potassium phosphate buffer (pH 7.4) (□).

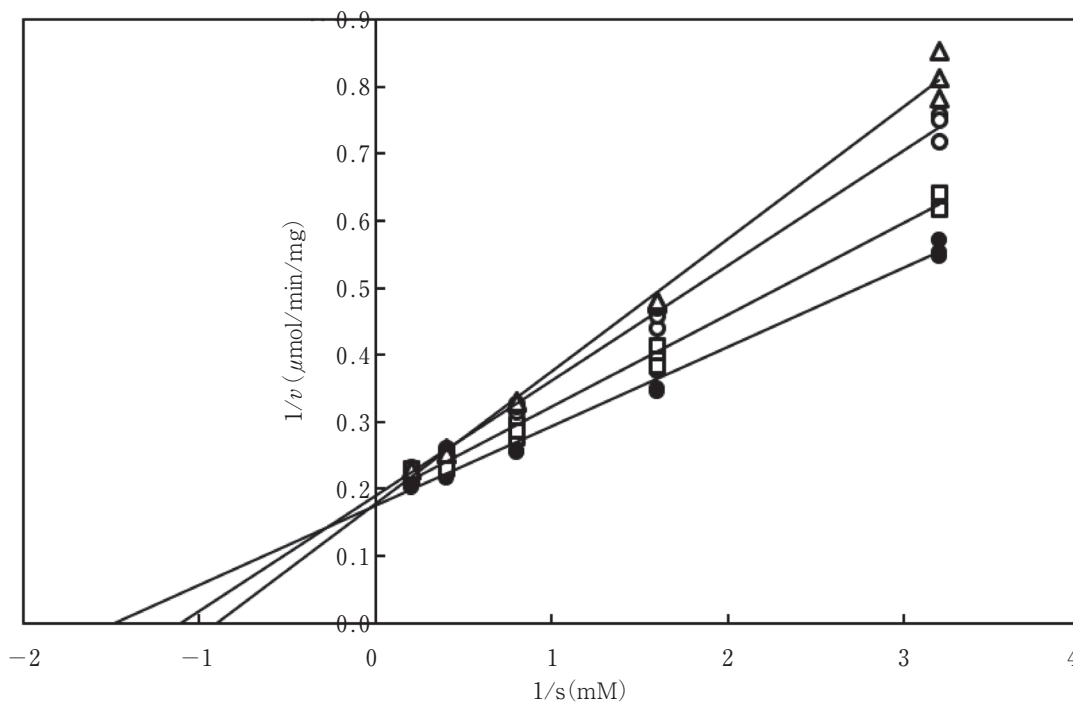


Fig. 3 Lineweaver-Burk plot of R305D-LGOX mutant enzyme for L-arginine oxidation in the presence of phosphate. The reaction was performed using sodium borate buffer (pH 8.5) (●), sodium borate buffer (pH 8.5) containing 5 mM phosphate (□), sodium borate buffer (pH 8.5) containing 10 mM phosphate (○), or sodium borate buffer (pH 8.5) containing 20 mM phosphate (△).

Table 1 Kinetic parameters of L-glutamate oxidase and R305D-LGOX mutant enzyme

	Substrate	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ · M ⁻¹)
LGOX	L-Glu	0.41	173.2	4.27×10^5
	L-Arg	0.68	6.7	9.86×10^3
R305D-LGOX	L-Lys	10.6	1.4	1.33×10^2
	L-Tyr	12.3	1.1	9.1×10
	L-His	38.5	3.0	7.8×10

より、リン酸は強い阻害剤ではないことが明らかになった。そのため、バイオセンサーとして R305D-LGOX を用いる場合はリン酸を含まない緩衝液でサンプルを希釈することで対応可能であると考えられる。

4) 基質特異性改変酵素 R305D-LGOX の速度論解析

R305D-LGOX は L-アルギニン、L-リシン、L-チロシン、L-ヒスチジンを基質として用いて速度論解析を行った。また、L-グルタミン酸を基質として用いて野生型 LGOX の速度論解析を行い、R305D-LGOX と比較した (Table 1)。その結果、基質特異性改変酵素 R305D-LGOX は、L-アルギニンを最も良い基質とし、更に L-アルギニンに対する K_m 値 0.68 mM は野生型 LGOX のグルタミン酸に対する K_m 値 0.41 mM とほぼ同等の非常に低い値であることが明らかになった。つまり野生型 LGOX より部位特異的変異により作成した R305D-LGOX は新規な L-アルギニンオキシダーゼであると言える。 k_{cat} 値は野生型 LGOX の 1/30 程度に低下しているものの、触媒効率が他の L-リシンや L-チロシンといった基質と比較して非常に高い値を示していることから、非常に基質特異性が厳格であることが明らかになった。珪藻土カラムに固定化したこの L-アルギニンオキシダーゼ (R305D-LGOX) を用いて、液体サンプル中の L-アルギニン量を過酸化水素電極により定量することも判明している。

今後は R305D-LGOX で確認されたリン酸による阻害のメカニズムの解明に興味を持たれる。緩衝液によって各基質への活性が変化することから、1 種類の変異 LGOX で複数のアミノ酸を測定することができるようになるかもしれない。

要 約

LGOX の 305 番目のアルギニンに部位特異的変異を導入することで、基質特異性改変酵素を創出することに成功した。創出した変異酵素のうち、R305D-LGOX の性質検討を行うことで、新規 L-アミノ酸バイオセンサーとしての有用性について検討を行った。その結果、最適 pH の検討を行ったところ、リン酸カリウム緩衝液を用いた場

合に R305D-LGOX の L-アルギニンに対する活性が低下することが確認された。基質特異性を検討した結果、R305D-LGOX はほぼ L-アルギニンに対してのみ活性を示した。また、リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) とホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.5) を用いた場合の基質特異性を比較した結果、塩基性アミノ酸に対する活性のみが変化していた。アルギニンに対する活性低下の原因の解析のためにその阻害の原因を推測し、速度論解析を行った結果、リン酸が R305D-LGOX の競合阻害剤であることが明らかになった。リン酸の阻害定数は 39.4 mM だった。阻害定数から見てリン酸の阻害の程度は低いが、バイオセンサーとして R305D-LGOX を用いる場合にはリン酸を含まない緩衝液を用いることが好ましい。速度論解析の結果から、R305D-LGOX は L-アルギニンに非常に高い触媒効率を示し、L-アルギニン以外の基質に対しての触媒効率は非常に低かったことから、非常に高い基質特異性を有していることが明らかになった。以上の結果から、R305D-LGOX が新規な L-アルギニンオキシダーゼであることが明らかとなり、本酵素は L-アルギニンバイオセンサーとして非常に有用であると考えられる。

引用文献

- 1) Kusakabe, H., Y. Midorikawa, T. Fujishima, A. Kuninaka and H. Yoshino : Purification and properties of a new enzyme, L-glutamate oxidase, from *Streptomyces* sp. X-119-6 grown on wheat bran. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1323-1328 (1983)
- 2) Böhmer, A., A. Müller, M. Passarge, P. Liebs, H. Honeck and H. G. Müller : A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus*. Purification and properties, *Eur. J. Biochem.*, **182**, 327-332 (1989)
- 3) Arima, J., T. Tamura, H. Kusakabe, M. Ashiuchi, T. Yagi, H. Tanaka, and K. Inagaki : Recombinant Expression, Biochemical Characterization and Stabilization Through Proteolysis of an L-Glutamate Oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. *J. Biochem.* **134**, 805-812 (2003)
- 4) Upadhyay, S., N. Ohgami, H. Kusakabe, H. Mizuno, J. Arima, T. Tamura, K. Inagaki, and H. Suzuki : Performance characterization of recombinant L-glutamate oxidase in a micro GOT/GPT sensing system. *Sensor and Actuators B*, **119**, 570-576 (2006)
- 5) Arima, J., C. Sasaki, C. Sakaguchi, H. Mizuno, T. Tamura, A. Kashima, H. Kusakabe, S. Sugio and K. Inagaki : Structural characterization of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. *FEBS J.*, **276**, 3894-3903 (2009)
- 6) Utsumi, T., J. Arima, C. Sakaguchi, T. Tamura, C. Sasaki, H. Kusakabe, S. Sugio and K. Inagaki : Arg305 of *Streptomyces* L-glutamate oxidase plays a crucial role for substrate recognition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 951-955 (2012)
- 7) Dieguez C., MD Page and MF Scanlon : Growth hormone neuroregulation and its alteration in disease states. *Clin Endocrinol.*, **28**, 109-143 (1988)
- 8) Beruter J., JP Colombo and C. Bachmann : Purification and

- properties of arginase from human liver and erythrocytes. *Biochem J.*, **175**, 449-454 (1979)
- 9) Specter EB., M. Kiernan, B. Bernard, and SD. Cederbaum : Properties of fetal and adult red blood cell arginase : a possible diagnostic test for arginase deficiency. *Am J Hum Genet.*, **32**, 79-87 (1980)
- 10) Soda K. : Microdetermination of D-amino acids and D-amino acid oxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Anal. Biochem.*, **24**, 228-235 (1963)