

2S-Fa03 L-アスパラギン酸オキシダーゼ：キノリン酸合成酵素複合体の解析とL-アスパラギン酸オキシダーゼの安定化芦田 裕之², 〇澤 嘉弘¹⁽¹⁾島根大・生物資源, ⁽²⁾島根大・総合科学研究支援セ) ysawa@life.shimane-u.ac.jp

多くの細菌、高等植物では、NAD 生合成経路の初発酵素 (NadB) として、L-アスパラギン酸オキシダーゼ (LAO) が、好熱性細菌 *Thermotoga* 属やアーキアでは L-アスパラギン酸デヒドロゲナーゼ (AspDH) が働いていることが知られている。生成物は、共にイミノアスパラギン酸 (ImAsp) であるが、極めて不安定で半減期 144 s¹ でオキサロ酢酸とアンモニアに加水分解される。このため、NadB は次反応を触媒するキノリン酸合成酵素 (QS, NadA) と複合体を形成し、ImAsp を疎水性分子間トンネルで QS 活性中心まで輸送し、ジヒドロキシセトンリン酸 (DHAP) との縮合反応でキノリン酸を生成すると予想されている。これまで、LAO, AspDH, QS の X 線結晶構造解析や生化学的解析は報告されているが、複合体の解析はほとんど行われていない。

我々は、常温性細菌 *Ralstonia eutropha* と *Pseudomonas aeruginosa* より AspDH を見出し、それらの分子特性、L-アスパラギン酸生産、ポリヒドロキシ酸 (PHA) 生合成への関与等について報告している。興味深いことに、これらの細菌は共に NadB として LAO を有している。

今回は *R. eutropha* 由来の LAO, QS 遺伝子の共発現系で効率的に LAO:QS 複合体を調製することに成功したので、複合体の生化学的解析について報告する。2つの遺伝子をタンデムに結合した pCold II nadA : nadB 等を構築し、発現後、嫌気条件下で超音波破碎、金属担体カラムで精製を行ったところ、SDS-PAGE で、溶出画分に等量の 40 kDa (QS) と 60 kDa (LAO) の2つのバンドが確認された。嫌気条件下での DHAP, L-Asp, フマル酸に対する Km 値は、それぞれ、4.08 mM, 3.09 mM, 5.78 mM であった。一方、複合体 LAO 単独での L-Asp に対する Km 値は、3.74 mM であった。また、好気条件下での複合体反応のカイネティクス・パラメーターも測定したが、嫌気条件の値と大差なかった。これらの結果は、LAO:QS 複合体が効率よく共役反応していることを示唆している。また嫌気条件下では、LAO 反応で生成した還元型 FADH₂ は、コハク酸デヒドロゲナーゼ逆反応のように LAO 活性中心でフマル酸をコハク酸に還元することで、再び酸化型 FAD に戻ることが示唆された。*P. horikoshi* QS の三次元構造情報を基に、LAO : QS 複合体を形成している QS 側インタフェースを予想し、種々の変異酵素を作製し、複合体に対する影響を種々解析した。

また、LAO は、L-アスパラギン酸、D, L-アスパラギン酸の分別定量に有用な酵素であるが、大腸菌を始めとする常温型 LAO (60 kDa) は精製中あるいは保存中に LAO 分子中の 120-140 付近のフレキシブルループで切断が起こり、15 kDa と 45 kDa に分断され失活してしまうことが知られている。今回は、この切断メカニズムと常温型 LAO の安定化についても報告する。

2S-Fa04 L-リジン定量を目的とした変異型 L-アミノ酸オキシダーゼの開発〇松井 大亮^{1,2}, 磯部 公安³, 浅野 泰久^{1,2}⁽¹⁾富山県大・工・生工研セ, ⁽²⁾JST・ERATO, ⁽³⁾岩手大・農) d-matsui@pu-toyama.ac.jp

血中の各種アミノ酸濃度は様々な疾病検出のために有用なマーカーとなること、が近年明らかとなっている。アミノ酸濃度に基づく診断を医療の現場で行うために、簡便かつ迅速な定量法が望まれている。HPLC などの機器分析法では短時間に多数の検体の測定が困難であることから、医療での使用は限られているのが現状である。一方、酵素法による定量では、簡便・迅速な測定が可能であり、我々の研究グループではこれまでに多くの種類の L-アミノ酸定量用酵素 (オキシダーゼ、デヒドロゲナーゼ) の開発に成功している。わが国において、新生児の先天的代謝異常のフェニルケトン尿症の検出に L-フェニルアラニン脱水素酵素が利用され、新生児の約 30% (過去の累積 500 万人以上) がこの酵素法により診断されていることが一例である¹⁾。

我々が最近開発したオキシダーゼによる定量可能な L-アミノ酸として、L-アルギニンや L-トリプトファン、L-リジンが挙げられる。土壌から取得した *Pseudomonas* sp. BYC41-1 より L-アルギニンオキシダーゼ活性を見出し、ヒト血漿サンプル中の L-アルギニン定量に用いた²⁾。L-トリプトファン定量法として、ビスインドール抗生物質 staurosporine および violacein の生合成系に着目し、L-トリプトファンオキシダーゼの取得に成功した。両酵素とも、ヒト血漿サンプルにおいて高い定量性を示したことから、生体試料中の L-アミノ酸定量に有用な酵素であることが明らかとなった³⁾。

L-リジン定量を目的とした土壌からのスクリーニングの結果、*Pseudomonas* sp. AIU 813 由来 L-アミノ酸オキシダーゼを見出した。本酵素は塩基性 L-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する酵素であり、既存の L-アミノ酸オキシダーゼに比べて基質特異性が高いことが判明した⁴⁾。本酵素遺伝子のクローニングを行った結果、L-リジン 2-モノオキシゲナーゼと高い相同性を示し、また本酵素が触媒する反応を詳細に解明したところ、オキシダーゼ活性と共にモノオキシゲナーゼ活性を有する二機能性の酵素であることが明らかとなった。Yamauchi らは、同じ二機能性の酵素を用いて、*p*-クロロ水銀安息香酸 (以下、*p*-CMB) の添加実験により、モノオキシゲナーゼ活性の減少と共にオキシダーゼ活性の上昇を報告している⁵⁾。*p*-CMB の添加により、本酵素のオキシダーゼ活性も増加することから、この *p*-CMB が反応するシステイン残基に着目し、本酵素の 5つのシステイン残基に飽和変異を導入した。その結果、Cys254 をイソロイシンに置換した変異型酵素 (C254I) のオキシダーゼ活性は 5 倍上昇し、モノオキシゲナーゼ活性が著しく減少した。オキシダーゼ活性の上昇した本変異型酵素は、野生型酵素よりも L-リジンに対して高い基質特異性を示し、血漿中の L-リジン定量に有用な酵素であることが明らかとなった⁶⁾。

以上のように、土壌からのスクリーニング、タンパク質工学により新たなアミノ酸定量用酵素の開発が可能であり、今後疾病の診断への応用が期待できる。

【参考資料】

- 1) S. Tachibana, M. Suzuki and Y. Asano, *Anal. Biochem.*, 359 (1), 72-78 (2006).
- 2) Y. Asano and D. Matsui, JP2013-32588, patent pending
- 3) M. Kameya, H. Onaka and Y. Asano, *Anal. Biochem.*, 438(1), 124-132 (2013)
- 4) K. Isobe, M. Sugawara, H. Domon, Y. Fukuta and Y. Asano, *J. Biosci. Bioeng.*, 114, 257-261 (2012)
- 5) Yamauchi T, Yamamoto S and Hayaishi O, *J. Biol. Chem.* 248, 3750-3752 (1973)
- 6) Y. Asano and D. Matsui, JP2012-16165, patent pending

Characterization of L-aspartate oxidases / quinolinate synthase complex and stabilization of L-aspartate oxidaseHiroyuki Ashida², 〇Yoshihiro Sawa¹⁽¹⁾Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., ⁽²⁾Ctr. Integ. Res. Sci., Shimane Univ.)**Application of an L-amino acid oxidase mutant to amino acid assay**〇Daisuke Matsui^{1,2}, Kimiyasu Isobe³, Yasuhisa Asano^{1,2}⁽¹⁾Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., ⁽²⁾ERATO, JST, ⁽³⁾Fac. Agric., Iwate Univ.)**Key words** L-aspartate oxidase, Quinolinate synthase, LAO: QS complex, LAO stabilization**Key words** L-amino acid oxidase, L-amino acid determination