

報 文

ミセル動電クロマトグラフィーを用いたジメチルスルホキシド還元酵素の基質特異性に関する研究

立花 誠^{®*}, 笹井 研^{*}, 大久保 明^{*}, 山崎 素直^{*}

(1995 年 5 月 19 日受付)

(1995 年 6 月 26 日審査終了)

酵素反応の基質特異性を調べる上で、動力学的パラメーターである K_m や V_{max} の算出は必要不可欠である。非常に高い分離能を有し、しかも極微量の試料を簡便に短時間で分析できる特徴を有するキャピラリー電気泳動 (CE) は酵素の基質特異性を調べるための新たな分析法の一つとして期待された。著者らは光合成細菌の呼吸酵素、ジメチルスルホキシド還元酵素 (DMSO reductase) の基質特異性を調べるため、CE の分離モードの一つであるミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) による反応溶液中の生成物の微量定量に基づいた活性測定系を構築した。幾つかのピリジン誘導体 *N*-オキシドとアデノシン *N*-オキシドの 8 物質を基質として酵素反応にかけ、その反応溶液を直接 MEKC により分析した。その結果、本活性測定系は K_m や V_{max} の算出に非常に有効で簡便な手段であった。本法によって DMSO reductase は広範な *N*-オキシド還元活性を有することが証明された。

1 緒 言

生体内触媒である酵素の基質特異性はその動力学的パラメーターであるミハエリス定数 K_m と V_{max} によって表される。酵素の基質特異性を調べるために、その酵素の特性や、基質、生成物の化学的性質に応じて様々な分析機器が応用されている。酵素の活性測定のアッセイ系はルーチンワークであることが多く、簡単にしかも短時間で測定可能であることが望ましい。更に K_m と V_{max} などのパラメーターの測定は、基質、生成物を少なくとも μM オーダーで取り扱うため、測定機器の分解能や感度が重要な問題となる。

近年医学、生化学、薬学の分野で急速に広まりつつあるキャピラリー電気泳動 (CE) は取り扱いが簡単であり、短時間で非常に高い分離能を発揮する分析機器と言える。

このような特徴を備えた CE は、酵素の基質特異性を調べるための新たな分析法の一つとして期待される。著者らは CE を用いた活性測定系を用いて光合成細菌の産生する酸化還元酵素の広範な基質特異性を調べる研究を行った。

脱窒光合成細菌である *Rhodobacter sphaeroides* f.s. *denitri-*

ficans のジメチルスルホキシド還元酵素 (DMSO reductase) を対象に研究を行った。本酵素は分子量 82000、水溶性のモノマーで、嫌気呼吸系の末端反応を触媒し、DMSO を還元してジメチルスルフィド (DMS) を生成する¹⁾。既報²⁾において著者らは CE の 1 変法であるミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) 法³⁾⁴⁾による DMSO reductase の活性測定系を構築した。本酵素の従来の活性測定系は、電子供与体である半還元型ベンジルピオロゲン (BV) の退色を分光光度計でモニターする間接的な方法⁵⁾がとられていたが、この方法は反応液中の酸素などの混在物質による妨害を受けやすい。酸素その他の酸化還元物質がアッセイ系に混在すると還元型 BV から酸素へ電子が渡ってしまうため正確な酵素反応のモニターが困難となる。その点 MEKC 法による活性測定系は直接反応生成物である DMS を定量するため、正確なアッセイが可能であった。

DMSO reductase は本来スルホキシドの還元酵素として単離されたが、トリメチルアミン *N*-オキシドも還元することが分かっている。本報では MEKC 法による DMSO reductase の活性測定系を更に応用し、本酵素がどのような *N*-オキシド還元活性を有するかを検討した。基質として七つのピリジン誘導体 *N*-オキシドとアデノシン *N*-オキシドの計 8 物質を用いた。これらの化合物

* 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻:
113 東京都文京区弥生 1-1-1

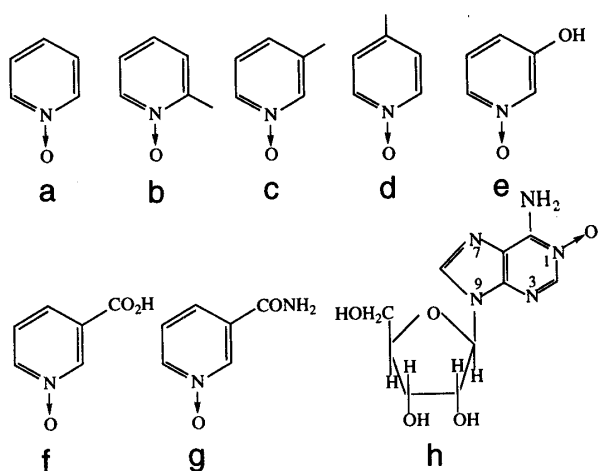


Fig. 1 *N*-Oxides as candidate substrates for DMSO reductase

(a): pyridine *N*-oxide; (b): α-picoline *N*-oxide; (c): β-picoline *N*-oxide; (d): γ-picoline *N*-oxide; (e): 3-hydroxypyridine *N*-oxide; (f): nicotinic acid *N*-oxide; (g): nicotinamide *N*-oxide; (h): adenosine *N*-oxide

は酵素反応によって脱酸素されるが、そのときの生成物を MEKC 法によって定量し、酵素反応のパラメーターの算出を試みた。その結果、MEKC 法による活性測定系は K_m や V_{max} の算出に非常に有効で簡便な手段であり、本法によって DMSO reductase は広範な *N*-オキシド還元活性を有することが証明されたので報告する。

2 実 験

2.1 DMSO reductase の精製

脱窒光合成細菌である *Rhodobacter sphaeroides* f.s. *denitrificans* を DMSO 添加培地で培養し、その菌体のペリプラズム空間より、硫酸分画、ゲル濾過、陰イオン交換、そしてヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーにより DMSO reductase を精製した¹⁾。精製酵素のタンパク量はウシ血清アルブミンを標準にして bicinconinic acid によって行った。

2.2 基質、生成物の調製

DMSO reductase の反応基質としてピリジン *N*-オキシド、α-ピコリン *N*-オキシド、β-ピコリン *N*-オキシド、γ-ピコリン *N*-オキシド、3-ヒドロキシピリジン *N*-オキシド、ニコチン酸 *N*-オキシド、ニコチン酸 *N*-オキシド、そしてアデノシン *N*-オキシドの 8 物質を選ん

だ (Fig. 1 a~h)。又、これらの基質の酵素反応生成物である脱酸素化合物の標準溶液を調製し、泳動条件や試料注入量を酵素活性測定時と同じ設定 (2.4 参照) で検量線を作成した。これらの基質、あるいは生成物の試薬は Sigma 製、もしくは和光純薬製のものを用いた。

2.3 酵素反応の条件

酵素反応のバッファーには 25 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ と 50 mM NaH_2PO_4 を pH 7.0 になるように加えたもの (BP バッファー) を使用し、きつくキャップした 0.5 ml 容量のマイクロチューブ中で 25°C で反応を行った。酵素と電子供与体である BV の濃度はそれぞれ 0.02, 100 μM で、基質の濃度は 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mM の五つについてそれぞれ 10 分間反応させた。なお、アデノシン *N*-オキシドは還元速度がピリジン誘導体 *N*-オキシドに比べて速いため反応時間を 1 分にした。BV の還元剤としては 3.36% NaHCO_3 溶液に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を 2% になるように加えたものを調製し、これを 0.4 ml の反応溶液に 0.1 ml 加え、反応を開始した。

2.4 MEKC 法による酵素活性測定

キャピラリー電気泳動装置は日本分光製の CE-800 システムで、キャピラリーは内径 50 μm で有効長 30 cm の溶融シリカ製のものを用いた。泳動バッファーは BP バッファーにドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を 50 mM になるように加えたものを使用し、検出はオンカラムの 200 nm で行った。検量線作成の標準溶液は 5 cm の高さで 20 秒間、キャピラリーの陽極からサイフォン式⁴⁾で注入した。1 回の測定ごとにシリンジで陰極を陰圧にし、蒸留水によってキャピラリーを 5 分間洗浄した。試料注入量は、約 6 nl である。印加電圧は 16 kV で、このときの電流値は約 28 μA であった。培養後の酵素反応溶液も同様に直接キャピラリーに導入して MEKC を行った。生成物を検出し、その面積とあらかじめ作成した検量線をもとに酵素反応速度 (μM/min) を算出した。

3 結果及び考察

3.1 基質、生成物の分離と検量線作製

基質として用いた八つの物質とその脱酸素物の混合物を MEKC 法によって分析した。泳動条件は 2.4 に従って行った。Fig. 2 にそのクロマトグラムを示す。MEKC 法によって、これらすべての 8 種類の *N*-オキシドは各々の脱酸素化合物と分離して検出された。3-ヒドロキシピリジン *N*-オキシドのみその脱酸素物より泳動

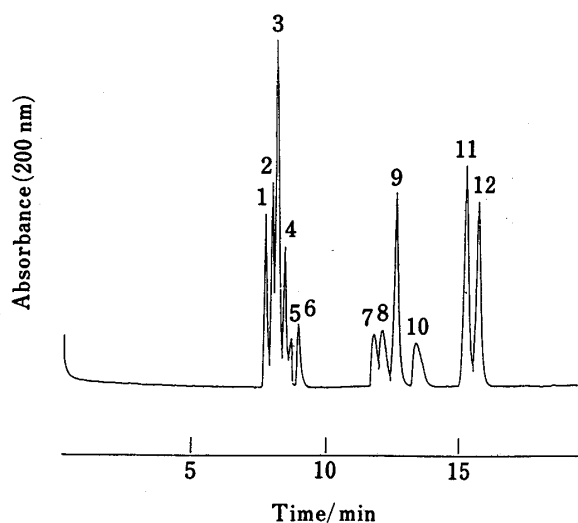


Fig. 2 Separation of *N*-oxides as substrates and corresponding deoxygenated products by MEKC

(1): pyridine *N*-oxide and nicotinamide *N*-oxide; (2): α -picoline *N*-oxide; (3): β -picoline *N*-oxide, γ -picoline *N*-oxide, nicotinamide and adenosine *N*-oxide; (4): 3-hydroxypyridine; (5): adenosine; (6): pyridine; (7): α -picoline; (8): β -picoline; (9): 3-hydroxypyridine *N*-oxide; (10): γ -picoline; (11): nicotinic acid *N*-oxide; (12): nicotinic acid

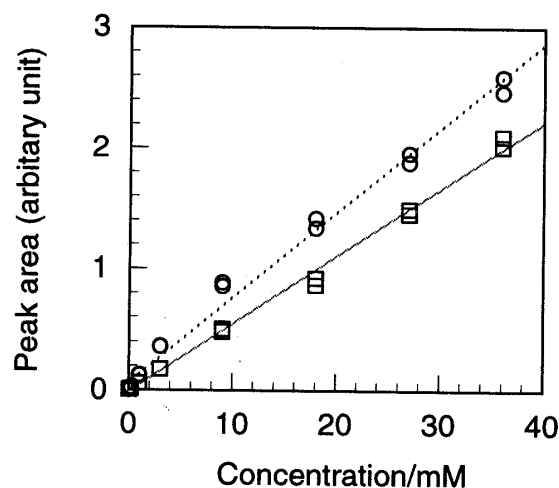


Fig. 3 Calibration curves for α -picoline *N*-oxide and α -picoline

About 6 nl of a standard solution, in which α -picoline *N*-oxide (○) and α -picoline (□) were respectively dissolved, was introduced into the capillary.

時間が長かったが、その他の化合物はより親水的な *N*-オキシドのほうがその脱酸素物よりも速く泳動した。検量線は生成物である脱酸素化合物八つについて濃度 10

μM から 40 mM の範囲で作製した。ここでは α -ピコリン *N*-オキシドと α -ピコリンの検量線のみ Fig. 3 に示すが、その他の化合物に関しても良好な直線性が得られた。これらの化合物はおおむね 10 μM の濃度まで検出可能で、絶対量でおよそ 10 pg が検出限界であった。今回は、CE による酵素活性測定の基礎的データを得ることが目的であるためマニュアル注入法によって検量線を作成したが、自動化された試料注入法や内標準を用いることによってより精度の高いデータが得られるであろう。酵素の基質特異性の測定に当たっては誤差を少なくするために基質濃度を K_m 値近辺で測定することが望ましい。MEKC 法によるこれら 8 組の基質、生成物の検出限界は十分に K_m 値算出に耐えうる値であった。

3.2 MEKC 法による酵素活性測定

用いた八つの基質はすべて DMSO reductase の良い基質となった。又、これらの基質はすべてミカエリス-メンテンの式に従い、高濃度の基質、生成物による反応阻害はみられなかった。例として基質に α -ピコリン *N*-オキシドを用いたプロットを Fig. 4 に示す。横軸に基質濃度の逆数 (mM^{-1})、縦軸に反応速度の逆数 ($\text{min } \mu\text{M}^{-1}$) をプロットし、Lineweaver-Burk の逆数プロットを作製した。アッセイは 3 回繰り返して行った。

3.3 基質特異性の算出

3.2 で得た逆数プロットからそれぞれの基質について K_m 値 (μM) と $V_{\max}$ 値 (unit/mg protein) を算出した。Table 1 にその結果を示す。なお、表中の DMSO, トリメチルアミン *N*-オキシド (TMAO) に対する K_m

Table 1 Substrate specificity of DMSO reductase

Substrate	$K_m/\mu\text{M}$	$V_{\max}/\text{unit mg protein}^{-1}$
DMSO [†]	15	15
Trimethyl amine <i>N</i> -oxide [†]	1000	48
Pyridine <i>N</i> -oxide	890	56
α -Picoline <i>N</i> -oxide	600	58
β -Picoline <i>N</i> -oxide	490	49
γ -Picoline <i>N</i> -oxide	570	58
3-Hydroxypyridine <i>N</i> -oxide	640	66
Nicotinic acid <i>N</i> -oxide	330	58
Nicotinamide <i>N</i> -oxide	640	53
Adenosine <i>N</i> -oxide	230	480

[†]Values of DMSO and TMAO reduction activities were quoted from ref. (1).

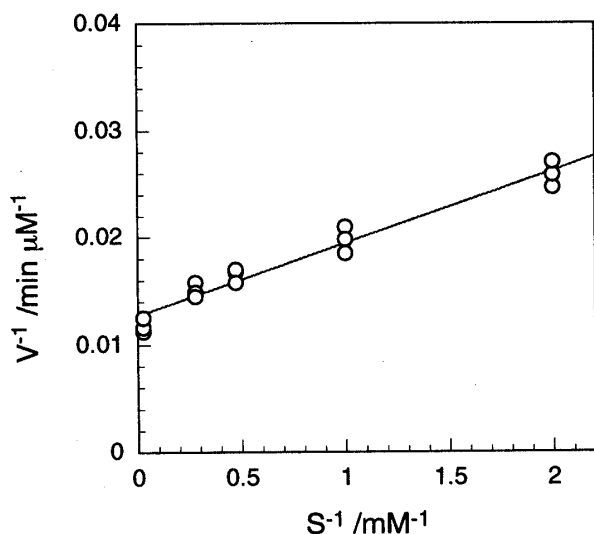


Fig. 4 Lineweaver-Burk plot for determination of α -picoline *N*-oxide reduction activity of DMSO reductase

値, V_{max} 値は文献 (1) による値である。著者らの測定した八つの *N*-オキシドについてはすべて DMSO より K_m 値, V_{max} 値とも大きいという結果が得られた。TMAO も含めて *N*-オキシドは DMSO reductase に対する親和性が低いものの、高濃度の基質では DMSO より反応性が高いという結果が得られた。ピリジン誘導体 *N*-オキシドの中ではニコチン酸 *N*-オキシドが最も酵素親和性が高かった。

アデノシン *N*-オキシドはピリジン誘導体 *N*-オキシドに比べ親和性、最大速度ともに高い結果が得られた。*E. coli* 由来の DMSO reductase はほとんどアデノシン *N*-オキシド還元活性を示さない⁶⁾ことから本酵素との構造、機能の相違は興味深い。

以上、MEKC 法を DMSO reductase の基質特異性の探索に応用した結果、本酵素は広範な *N*-オキシド還元活性を有することが示された。このアッセイ系の利点は

基質生成物を直接定量するため正確な酵素反応をモニターできる点である。

当研究室において DMSO reductase は様々なアルキルアリルスルホキシドを光学選択的に還元することが示されている^{7,8)}。又、DL-アミノ酸などのラセミ体光学分割^{9,10)}が最近の CE の大きな研究分野の一つである。不斉を持ったスルホキシドや *N*-オキシドの CE による光学分割が可能となれば CE による DMSO reductase の光学選択的な酵素活性の測定が非常に容易なものとなるであろう。

ここに示した CE の酵素活性測定への応用はほんの 1 例にしか過ぎない。同様な研究は HPLC を用いても可能であるが、分析時間の短さや操作の手軽さ、そして極微量の試料で検出が可能であるなどの利点から、今後、酵素活性測定へのより広範な CE の応用が期待される。更に CE の応用範囲は無機イオンからタンパク、核酸にまで及ぶ。これら様々な物質を基質とする酵素で、従来反応解析が困難であったものに対して CE は大きな威力を発揮すると思われる。

文 献

- 1) T. Satoh, F. N. Kurihara: *J. Biochem.*, **102**, 191 (1987).
- 2) M. Tachibana, H. Onoe, A. Okubo, S. Yamazaki: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 232 (1995).
- 3) S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando: *Anal. Chem.*, **56**, 113 (1984).
- 4) S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando: *Anal. Chem.*, **57**, 834 (1984).
- 5) P. Dickie, J. H. Weiner: *Can. J. Biochem.*, **57**, 813 (1979).
- 6) J. H. Weiner, D. P. MacIsaac, R. E. Bishop, P. T. Birous: *J. Bacteriol.*, **170**, 1505 (1988).
- 7) M. Abo, M. Tachibana, A. Okubo, S. Yamazaki: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 596 (1994).
- 8) M. Abo, M. Tachibana, A. Okubo, S. Yamazaki: *Bioorg. Med. Chem.*, **3**, 109 (1995).
- 9) P. Gozel, E. Gassmann, H. Michelsen, R. N. Zare: *Anal. Chem.*, **59**, 44 (1987).
- 10) K. Otsuka, J. Kawahara, K. Takekawa: *J. Chromatogr.*, **559**, 209 (1991).



Substrate specificity of dimethyl sulfoxide reductase as proved by micellar electrokinetic chromatography. Makoto TACHIBANA, Ken SASAKI, Akira OKUBO and Sunao YAMAZAKI (Department of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113)

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was applied to study the substrate specificity of dimethyl sulfoxide (DMSO) reductase from a photodenitrifier, *Rhodobacter*

sphaeroides f. sp. *denitrificans*. Simple, direct, and accurate detection and quantification of enzymatically produced compounds from the reaction mixture containing the reductase and substrate were achieved by the MEKC assay system. This assay was shown to be quite effective for determination of the catalytic parameter values such as K_m and V_{max} . Seven pyridyl *N*-oxide derivatives and adenosine *N*-oxide were chosen as possible novel substrates for DMSO reductase. Each *N*-oxide was incubated for an appropriate time with DMSO reductase and its reductant in the reaction mixture. After incubation, the mixture was directly introduced into the capillary for MEKC analysis by which enzymatically deoxygenated compounds were monitored. Consequently, the eight *N*-oxides were proven to be suitable substrates for the reductase. The values of K_m and V_{max} of the *N*-oxides reduction activities were much larger than those of DMSO reduction activity. The V_{max} value of adenosine *N*-oxide reduction was about ten-fold higher than those of pyridyl *N*-oxide derivatives reduction activities. In conclusion, MEKC was suitable for the evaluation of kinetic parameters in enzymatic reaction. In addition, it was revealed that DMSO reductase has broad substrate specificity and is capable of reducing various *N*-oxides.

(Received May 19, 1995)

(Accepted June 26, 1995)

Keywords

MEKC as an enzymatic assay method; *N*-oxide reduction by DMSO reductase; DMSO reductase.
