

アルギニンラセマーゼは微生物が D-リシンを栄養素として利用するために必須の酵素である

松井大亮, 老川典夫
(関西大学化学生命工学部生命生物工学科*)

Arginine Racemase is the Essential Enzyme for *Pseudomonas taetrolens* NBRC 3460 to Utilize D-lysine as a Carbon Source

Daisuke MATSUI and Tadao OIKAWA
Department of Life Science and Technology, Faculty of chemistry,
Material Bioengineering, Kansai University, Suita Osaka 564-8680

Summary

The pyridoxal-5'-phosphate (PLP)-dependent amino acid racemases occur in almost every bacterium but may differ considerably with respect to substrate specificity. We here isolated the cloned broad substrate specificity racemase ArgR of *Pseudomonas taetrolens* from *Escherichia coli* by classical procedures. The racemase was biochemically characterized and amongst other aspects it was confirmed that it is mostly active with lysine, arginine and ornithine, but merely weakly active with alanine, whereas the alanine racemase of the same organism studied in comparison acts on alanine only. ArgR is necessary for the catabolism of D-arginine and D-lysine by *P. taetrolens*.

これまでに、多くのアミノ酸ラセマーゼの存在が報告されている。しかし、アミノ酸ラセマーゼの生体内における機能は、微生物のペプチドグリカンの必須構成成分¹⁾であるD-アラニンやD-グルタミン酸を生合成するアラニンラセマーゼやグルタミン酸ラセマーゼ、ヒトの脳内で神経伝達に参与するD-セリンを生合成するセリンラセマーゼ²⁾についてはよく知られているが、その他のアミノ酸ラセマーゼの機能については、不明なものが多い。*Pseudomonas taetrolens* NBRC 3460のアルギニンラセマーゼ (ArgR) は、アミノ酸ラセマーゼの中では例外的に基質特異性が低く、*in vitro*では10数種類のアミノ酸をラセミ化する (Table 1)

ユニークなピリドキサルリン酸 (PLP) 酵素である。また、本酵素はN末端にシグナル配列を有しており、Sec経路 (Secretory system) で輸送され、ペリプラズムに局在している。本研究では、生体内における ArgR の機能を解明するために、*P. taetrolens* NBRC 3460内の ArgR 遺伝子 (*argr*) を破壊し、野生株との生育の比較を行った。

実験方法

1. アルギニンラセマーゼ遺伝子 (*argr*) の調製

FastPure kit (TaKaRa)を用いて、*Pseudomonas taetrolens* NBRC 3460からゲノムDNAを抽出した。そのゲノムDNA (1.4 µg) を鋳型として、プライマー A, B (0.2 pmol) を用いてアニーリング温度 40 °C で PCR を行った (プライマー A : GTGCTCAA (A/G) GC (C/G) GA (C/T), プライマー B : GGTGCGGTC (A/G) TAGCC (C/G) AC)。再度得られた PCR 産物を鋳型として、プライマー C, D を用いてアニーリング温度 52 °C で PCR を行った (プライマー C : GACGCCTA (C/T) GG (A/T/C) CA (C/T) GG, プライマー D : GGTGCGGTC (A/G) TAGCC (C/G) AC)。pT7 Blue T に得られた PCR 産物をライゲーションし、DNA シーケンサー SQ5500E (日立) で配列を確認した。その DNA 断片を基にして、HindIII と EcoRI カセットを用いたクローニングキット LA PCR™ (TaKaRa) を用い、アルギ

Table 1 Specificity of ArgR
Relative activity (%)

Substrate	Arginine racemase (%)
L-Alanine	12.4
L-Lysine	100
L-Arginine	95.2
L-Ornithine	42.0
L-Methionine	12.4
L-Ethionine	11.8
L-Homoarginine	6.2
L-Norvaline	6.5
L-Leucine	1.7
L-2-Aminobutyrate	1.4
L-Phenylalanine	0.02

*所在地：大阪府吹田市山手町 3-3-35 (〒564-8680)

ニンラセマーゼ遺伝子をクローニングした。

2. アルギニンラセマーゼ遺伝子破壊株の調製

上記1で得られたアルギニンラセマーゼ遺伝子 (*argr*) を制限酵素 HincII 処理し、得られた内部フラグメントを SmaI 処理した相同組換えベクター pK18 mob に導入した (Fig. 1)。 *P. taetrolens* NBRC 3460 のコンピテントセルに構築したベクターをエレクトロポレーション法で形質転換し、本酵素遺伝子の破壊株をスクリーニングした。エレクトロポレーションは、Voltage 25,000 V, Field strength 12.5 kV/cm, Capacitor 25 μ F, Resister 200 Ω , Time constant 4.7 msec で行った。PCRと活性測定により、アルギニンラセマーゼ破壊株 (*P. taetrolens* NBRC3460::*argr*) の構築を確認した。

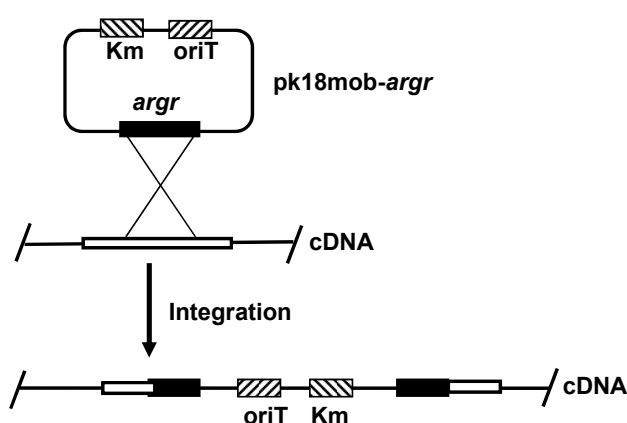


Fig. 1 Integration of *argr*

3. 酵素活性法

アミノ酸ラセマーゼ活性は、L-アルギナーゼを用いて測定した^{3,4)}。上記酵素法とともにHPLCを用い、様々なアミノ酸ラセマーゼ活性を測定した⁵⁾。反応系には、CHES-NaOH buffer, pH 10.0 (130 μ L), 0.1 M L-アミノ酸 (80 μ L), 0.1 mM PLP (200 μ L) を用い、酵素 10 μ L を添加し反応を開始後、37 $^{\circ}$ C で 10 分間反応し、100 $^{\circ}$ C, 2 分間熱処理し反応停止後の遠心上清を HPLC で分析した。1 U は D-または L-アミノ酸を基質として用い、1 分間に 1 μ mol のエナンチオマーを生成する酵素量とした。

4. 資化能試験

資化能試験には最少培地 No. 154 を用い、唯一の炭素源として、*in vitro* でアルギニンラセマーゼの相対活性の高い D-アルギニン、D-リシン、D-アラニン、D-オルニチン、L-アルギニン、L-リシン、L-アラニン、または L-オルニチンを添加した。最少培地 No. 154⁶⁾ には 1 L あたり KH₂PO₄ 1.4 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 14.3 g, NaCl 0.6 g, K₂SO₄ 1.7 g, MnSO₄ · 4H₂O 0.55 mg, MgSO₄ · 7H₂O 50 mg, FeCl₃ · 6H₂O 5 mg, 10 mM (NH₄)₂SO₄ (窒素源), 10 mM 炭素源を添加した。野生株、アルギニンラセマーゼ破壊株をそれぞれ各培地に植菌し、30 $^{\circ}$ C, 160 rpm で培養し、生育の経時的变化を

測定した。アルギニンラセマーゼ破壊株の培地には、カナマイシンを 20 μ g/mL 添加した。

結果

1. アルギニンラセマーゼ遺伝子 (*argr*) のクローニング

Pseudomonas striata や *Pseudomonas putida* の低基質特異性アミノ酸ラセマーゼ遺伝子の配列を基に、アルギニンラセマーゼをクローニングした。*P. taetrolens* NBRC 3460 のゲノム DNA からアルギニンラセマーゼ遺伝子 (*argr*) の PLP 結合部位付近を増幅した後に、*in vitro* クローニングキット LA PCR™ (TaKaRa) を用いて、1,227 bp の *argr* をクローニングした。

2. アルギニンラセマーゼによるアミノ酸の炭素源としての利用

アルギニンラセマーゼの生体内での機能を解明するために、pK18mob-*argr*-int を用いて相同組み換えを行った。得られた破壊株 *P. taetrolens* NBRC3460::*argr* では、アルギニンラセマーゼ活性が消失している事を確認した。最少培地を用い、10 mM の L-または D-アミノ酸を炭素源として生育曲線を作成した (Fig. 2)。野生株では、D-リシン、L-リシン、D-アルギニン、L-アルギニンまたは L-オルニチンを炭素源として用いた場合、D 体および L 体での生育にほとんど差異は認められなかった。一方、D-オルニチンや D-アラニンでは、L 体に比べて生育に遅延が見られた。*P. taetrolens* NBRC 3460::*argr* では、D-リシンを炭素源として用いた場合、生育は確認できなかった。また、D-アルギニンをういた場合、生育の遅延が見られたことから、アルギニンラセマーゼはこれらの D-アミノ酸の代謝において重要な役割を果たしていると考えられる。

考察

野生株とアルギニンラセマーゼ破壊株を用いた生育実験から、アルギニンラセマーゼが D-アルギニンおよび D-リシンの異化に重要な酵素であることがわかった。とくに D-リシンを炭素源として利用するには、アルギニンラセマーゼが *P. taetrolens* NBRC 3460 には必須であることがわかった。D-アルギニンを炭素源として用いた場合に見られた生育の遅延は、アラニンラセマーゼは基質特異性が高く D-もしくは L-アラニンのみを基質とすることから、アラニンラセマーゼ以外の他の酵素によりレスキューさせるためと考えられる。*P. taetrolens* NBRC 3460 のペリプラズムにアルギニンラセマーゼが局在していることは、アルギニンラセマーゼが D-リシンや D-アルギニンを生育基質として利用するのに有利であると考えられる。ペリプラズムでラセミ化された D-リシンや D-アルギニンを取り込む機構については、*Pseudomonas* 属細菌ではいまだ明らかになっていない^{7,8)}。

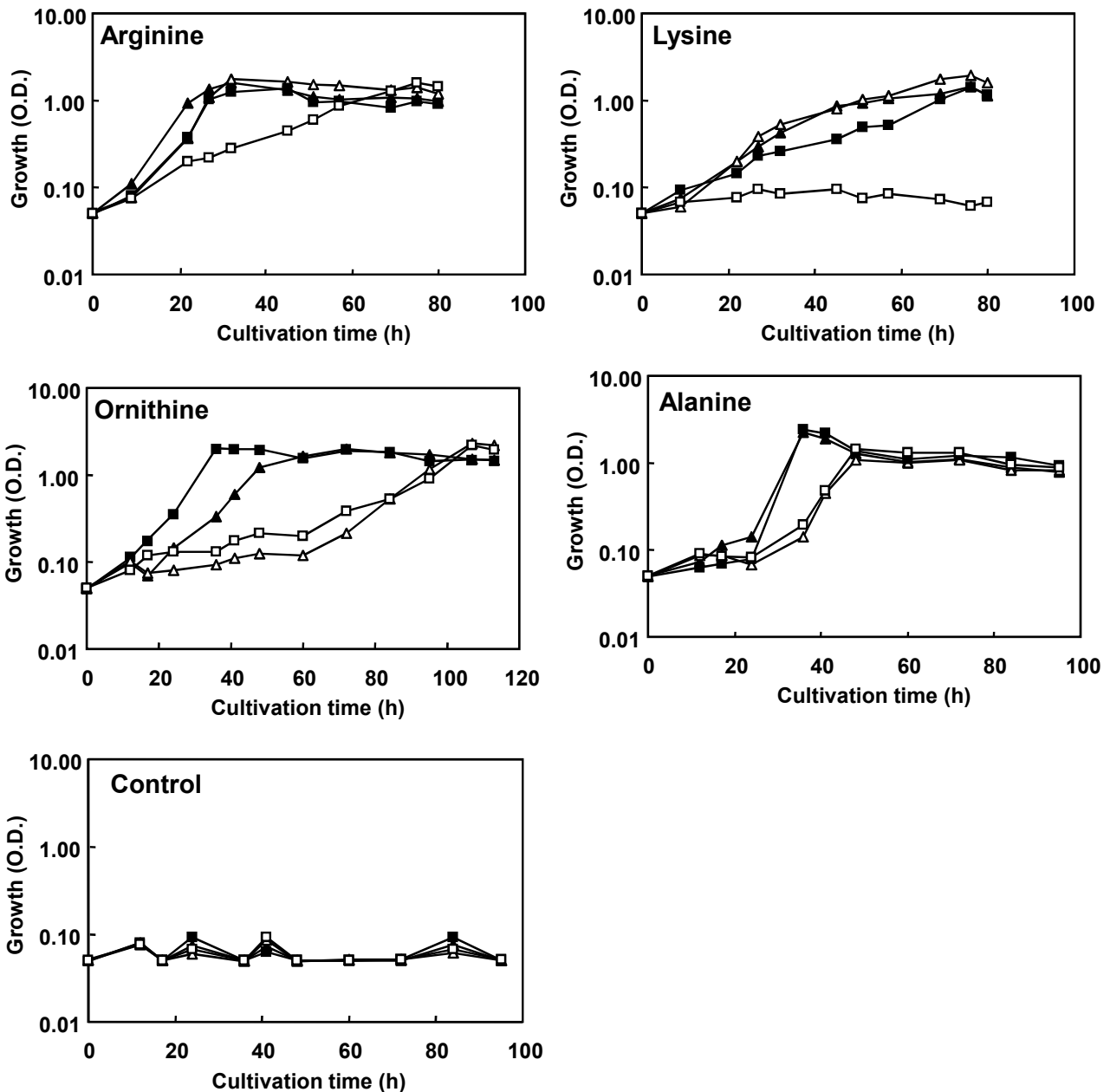


Fig. 2 Utilization of D- and L-amino acids as carbon source by *P. taetrolens*. The amino acid used are given in the individual graphs. Square is D-amino acid, triangle L-amino acid, wild type closed symbols, and *P. taetrolens* NBRC 3460: *argr* open symbols.

ホモロジー検索の結果、シグナル配列を持たないアルギニンラセマーゼのホモログの存在が明らかになっている。例えば、*Vibrio cholerae* の Q9KSE は、細胞質に存在するアルギニンラセマーゼ様タンパク質である⁹⁾。また、アルギニンラセマーゼ遺伝子に隣接して *N*-アシルアミノ酸アミドヒドロラーゼとプロテアーゼ (pfam: PF01546) が存在しており、D-リシンや D-アルギニンの代謝に関連する遺伝子クラスターである可能性が考えられる。

これらの結果から、アルギニンラセマーゼは、*P. taetrolens* NBRC 3460 が D-リシンを栄養素として利用するために必須の酵素であることが明らかとなった。アルギニンラセマーゼは、生体内での機能が解明されたアミノ酸ラセマーゼの希少な例となる¹⁰⁾。

参考文献

- 1) Osborn MJ (1969) Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. *Annu Rev Biochem* 38: 501–538.
- 2) Tsai G, Yang P, Chung L, Lange N, Coyle JT (1998) D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 44: 1075–1076.
- 3) Yorifuji T, Ogata K (1971) Arginine racemase of *Pseudomonas graveolens*. I. Purification, crystallization, and properties. *J Biol Chem* 246: 5085–5092.
- 4) Yorifuji T, Misono H, Soda K (1971) Arginine racemase of *Pseudomonas graveolens*. II. Racemization and transamination of ornithine catalyzed by arginine racemase. *J Biol Chem* 246: 5093–5101.

- 5) Ono K, Yanagida K, Oikawa T, Ogawa T, Soda K (2006) Alanine racemase of alfalfa seedlings (*Medicago sativa* L.): first evidence for the presence of an amino acid racemase in plants. *Phytochemistry* 67 : 856–860.
- 6) Stalon V, Ramos F, Piérard A, Wiame JM (1967) The occurrence of a catabolic and an anabolic ornithine carbamoyl transferase in *Pseudomonas*. *Biochim Biophys Acta* 139 : 670.
- 7) Revelles O, Espinosa-Urgel M, Fuhrer T, Sauer U, Ramos JL (2005) Multiple and interconnected pathways for L-lysine catabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol* 187 : 7500–7510.
- 8) Yamanishi Y, Mihara H, Osaki M, Muramatsu H, Esaki N, Sato T, Hizukuri Y, Goto S, Kanehisa M (2007) Prediction of missing enzyme genes in a bacterial metabolic network. Reconstruction of the lysine-degradation pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS J* 274 : 2262–2273.
- 9) Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Umayam L, Gill SR, Nelson KE, Read TD, Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva MD, Vamathevan J, Bass S, Qin H, Dragoi I, Sellers P, McDonald L, Utterback T, Fleishmann RD, Nierman WC, White O, Salzberg SL, Smith HO, Colwell RR, Mekalanos JJ, Venter JC, Fraser CM (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406 : 477–483.
- 10) Matsui D, Oikawa T, Arakawa N, Osumi S, Lausberg F, Stähler N, Freudl R, Eggeling L (2009) A periplasmic, pyridoxal-5'-phosphate-dependent amino acid racemase in *Pseudomonas taetrolens*. *Appl Microbiol Biotechnol* 83 : 1045–1054.