

微生物が D-リシンを利用するのに必須な酵素, アルギニンラセマーゼの構造特性

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*)

Characterization of Structure of Arginine Racemase, the Essential Enzyme for Microorganism to Utilize D-Lysine as a Carbon Source

Daisuke MATSUI and Tadao OIKAWA

Department of Life Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University,
3-3-35 Yamate-Cho, Suita, Osaka-Fu 564-8680, Japan

Summary

We found that the single intramolecular disulfide bond between the cysteines C47 and C73 exists in the primary structure of arginine racemase (ArgR) from *Pseudomonas taetrolens* NBRC 3460, and this is the first example of a pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent amino acid racemase that contains a disulfide bond. The thermal and pH profiles and the quaternary structure of ArgR did not change when the disulfide bond of ArgR was disrupted by site-directed mutagenesis. The substrate specificity and the overall structure changed when the disulfide bond of ArgR was disrupted by site-directed mutagenesis. The total activity of ArgR decreased when the disulfide bond of ArgR was disrupted by site-directed mutagenesis before the protein was matured or when ArgR was expressed in the cytoplasm. Based on these results, the disulfide bond of ArgR is probably essential for ArgR to fold and mature as an amino acid racemase with a broad substrate specificity.

これまでに、微生物や動植物において、さまざまなアミノ酸ラセマーゼの存在が報告されている。それらのアミノ酸ラセマーゼにより生合成される D-アミノ酸は、微生物のペプチドグリカンの必須構成成分 (D-アラニン, D-グルタミン酸) やヒトの脳内で神経伝達に関与 (D-セリン) することなどが報告されている。*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ユニークなピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) 酵素である^{1,2)}。先にわれわれは、低基質特異性アミノ酸ラセマーゼであるアルギニンラセマーゼ (ArgR) は、*Pseudomonas 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を報告した³⁾。本研究では、本酵素の構造とフォールディング機構を MALDI-TOF MS を用いて解明することを目的としている。

実験方法

1. ArgR の発現と精製

アルギニンラセマーゼ遺伝子 (*argr*) を pET11b, pET21b

に各々ライゲーションし、*E. coli* BL21 (DE3) で発現した。超音波破碎機で菌体を破碎後、粗酵素液を調製し、DEAE- と Butyl-Toyopearl で精製した⁴⁾。

2. MALDI-TOF MS を用いたジスルフィド結合の検出

精製アルギニンラセマーゼ (10 ng) を 8 M 尿素溶液 (10 mL) で変性後、以下の 3 つの条件でそれぞれ処理した。(A) ジチオスレイトール (DTT) による還元とヨードアセトアミドによるアルキル化, (B) ヨードアセトアミドによるアルキル化, (C) 処理なし。トリプシンで、各々の混合液を一晩消化し、ZipTip C18 (Millipore) を用いて、脱塩・濃縮した。分析プレート上で、各々のサンプル (0.5 mL) とマトリックス CHCA を混合し、自然乾燥した後に、MALDI-TOF MS で分析した⁵⁾。

3. 部位特異的変異導入による C47A/C73A-ArgR の構築

C47A/C73A-*argr* は、PCR によるオーバーラップエクステンション法で構築した。得られた C47A/C73A-*argr* は、*argr* と同様に pET11b, pET21b に各々ライゲーションし、*E. coli* BL21 (DE3) で発現した。C47A/C73A-ArgR は、実験方法 1 と同様にして精製した。

*所在地：大阪府吹田市山手町 3-3-35 (〒564-8680)

4. ArgR と C47A/C73A-ArgR の大腸菌における発現効率の比較

pET21b-*argR* と pET21b-C47A/C73A-*argR* を *E. coli* BL21 (DE3) で発現後、SDS-PAGE で泳動した。Invision His-tag In-gel Stain kit (Invitrogen) で、染色を行った後に、イメージアナライザーでバンドを解析し、発現効率を比較した。

5. 酵素活性法

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°C で 10 分間反応し、100°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。また、嫌気条件下での活性測定は、20 mM DTT を添加し、Vacuum Globe Box SGV-65V (AS ONE) 内で行った。

6. ArgR と C47A/C73A-ArgR の構造比較

C47A/C73A-ArgR と ArgR に 10 mM KPБ (pH 7.3) に溶解したアクリルアミド溶液 (終濃度: 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 mM) を添加し、トリプトファン残基の蛍光消

失を励起波長 295 nm で生じる蛍光を 330 nm で分光蛍光光度計を用いて測定した。また Stern-Volmer 定数は①式より算出した^{6,7)}。

$$F_0/(F_0 - F_Q) = 1/f_a + 1/K_{sv} [Q] \cdots \cdots \cdots \textcircled{1}$$

F_0 : 消光剤 (アクリルアミド) 非存在下での蛍光強度, F_Q : 蛍光強度, Q : 消光剤濃度 (M), K_{sv} : Stern-Volmer 定数, f_a : トリプトファン残基の蛍光画分

7. ArgR と C47A/C73A-ArgR の諸性質の比較

ArgR と C47A/C73A-ArgR の 15~50°C における、各アルギニンラセマーゼ活性を測定した。同様に、pH 5.5~11.5 での各アルギニンラセマーゼ活性を測定した。

結果

1. MALDI-TOF MS によるジスルフィド結合の検出

実験方法 1 で示した 3 つの条件で処理した ArgR の MALDI-TOF MS のマススペクトルを Fig. 1 に示した。還元・アルキル化した ArgR では、特徴的なペプチドピーク (m/z 861.20, 3,184.15) が検出された。これらの m/z は、ArgR のアミノ酸配列から計算した理論値 (m/z 861.48 と 3,184.55) とよく一致し、システイン残基をそれぞれ含ん

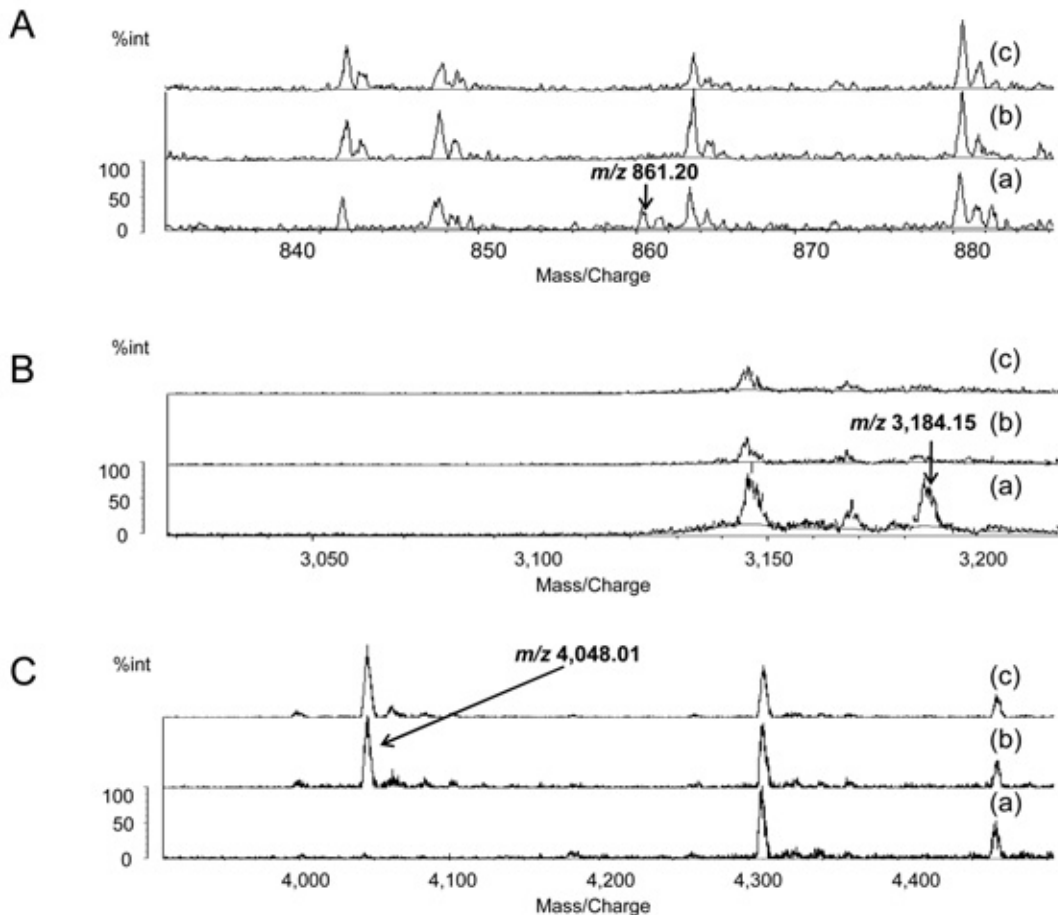


Fig. 1 MALDI-TOF Mass spectra of ArgR. The acquired profiles were focused on mass ranges from a) 830 to 885, b) 3,025 to 3,225 and c) 3,900 to 4,500. The purified ArgR was exposed to either i) reduction with dithiothreitol and S-alkylation with iodoacetamide (reduction + S-alkylation), ii) S-alkylation with iodoacetamide (S-alkylation), or iii) no treatment. Arrows and numerical values indicate specific peptide peaks and observed masses, respectively.

Table 1 Theoretical and observed monoisotopic mass values for tryptic digests of ArgR

Mass value	Position	MC	Peptide sequence	Observed mass value		
				(a)	(b)	(c)
4,308.14	215 – 254	0	ITLHAANSFATLEVPESHLDMVRPGGALFGDTPVSHTEYK	4,309.21		
3,184.56	52 – 83	0	ADAYGHGIGLLMPSVIAMGVPCVGVASNEEAR		3,184.15	N. D.
3,145.57	353 – 381	0	AETQAEIEDINGALLADLYTVWGNPNK	3,144.56		
2,908.46	99 – 125	0	TAALSELEAALPYNMEELVGNLDFAVK	2,909.21		
2,785.35	1 – 26	0	APPLSMTDGVAVQVNTQDSNAWVEINK	2,784.60		
2,616.37	126 – 150	0	ASLIAEDHGRPLVVHLGLNSSGMSR	2,616.97		
2,033.00	196 – 212	0	AFNQQAQWLMNVAQLDR	2,033.71		
1,834.89	323 – 339	0	VSMNTLMVDVTDAPDVK	N. D.		
1,645.80	177 – 191	0	AIMTHFAVEDAADVR	1,646.38		
1,428.71	289 – 301	0	LANITVGYSDGYR	1,429.23		
1,372.69	340 – 352	0	SGDEVVLFHQGK	1,373.14		
1,188.60	261 – 271	0	SHVASVNSYPK	1,188.94		
1,149.53	151 – 161	0	NGVDMTTAQGR	1,149.64		
978.58	308 – 316	0	GIVLINGHR	978.64		
957.49	27 – 34	0	AAFEHNIR	957.70		
902.53	35 – 43	0	TLQATALAGK	902.67		
861.49	44 – 51	0	SQICAVLK		861.20	N. D.
826.48	170 – 176	0	VPNLEVR	826.59		
823.41	272 – 279	0	GNTVGYGR	N. D.		
717.41	163 – 169	0	DAVAITK	N. D.		
710.38	280 – 285	0	TYTLGR	710.33		
652.35	256 – 260	0	VMQFK	652.29		
598.39	317 – 322	0	VPVVGK	N. D.		
586.37	92 – 96	0	GQLIR	598.00		
580.31	303 – 307	0	AFTNK	586.32		
567.28	87 – 91	0	ESGFK	N. D.		

MC, number of missed cleavages;

(a) (b) (c) stand for the sample conditions in Detection of a disulfide bond in ArgR by MALDI-TOF MS.

ND, Not detected.

Table 2 Theoretical and observed mass values for disulfide-linked peptides

Mass value	Position	MC	Modification	Peptide sequence	Modified mass value	Observed mass value
3,184.56	52 – 83	0	Disulfide bond: 47 - 73	ADAYGHGIGLLMPSVIAMGVPCVGVASNEEAR	4,043.04	4,048.01
861.49	44 - 51	0		SQICAVLK		

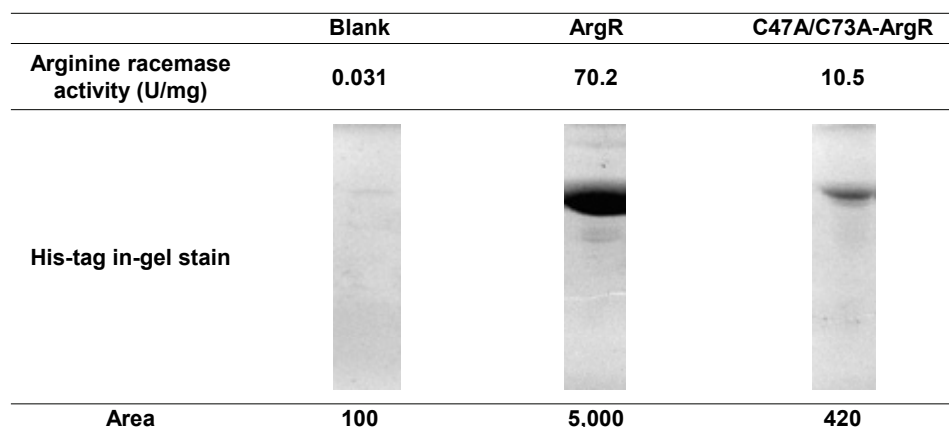
MC, number of missed cleavages;

Disulfide linkages are indicated by lines.

でいた (Table 1)。対照的に、 m/z 4,048.01 のピークが、非還元条件下では ArgR のサンプルで観察された (Fig. 1)。この値は、ジスルフィド結合を含むペプチドフラグメントの理論値 (m/z 4,043.04) とよく一致した (Table 2)。これらの結果から、ArgR の C47-C73 間に分子内ジスルフィド結合が存在することが示唆された。

2. C47A/C73A-argr の発現と C47A/C73A-ArgR の諸性質

ArgR の無細胞抽出液中での比活性は、 70.2 ± 0.5 U/mg であった。一方、C47A/C73A-ArgR の比活性は 10.5 ± 0.1 U/mg であった (Fig. 2)。Invision His-tag In-gel Stain kit で発色した可溶性画分中の ArgR と C47A/C73A-ArgR の SDS-PAGE のバンドの面積は、それぞれ 420 と 5,000

**Fig. 2** Comparison of the expression levels of C47A/C73A-ArgR and ArgR.

と算出された。

また、C47A/C73A-ArgR のサブユニットの分子質量は、それぞれ 84 kDa, 41.5 kDa と算出され、いずれも ArgR と一致した。このことから、二つのシステイン残基をアラニンに変異導入しても、四次構造には影響がないことが明らかとなった。

C47A/C73A-ArgR の吸収スペクトルでは、420 nm にピークが生じ、このピークは NaBH₄ での還元で 310 nm にシフトすることから、ArgR と同様に C47A/C73A-ArgR は、PLP を補酵素としていることが示唆された。

3. ArgR と C47A/C73A-ArgR の基質特異性の比較

L-アルギニン, L-リシン, L-オルニチン, D-アルギニン, D-リシン, D-オルニチンに対する C47A/C73A-ArgR の相対活性は、ArgR の相対活性とよく一致した。しかし、興味深いことに L-アラニンと D-アラニンに対する相対活性は、それぞれ 25% と 26% に増加していた (Table 3)。一方、DTT の存在、非存在下での ArgR の相対活性は、ほぼ同じ値であった。このことから、ArgR がフォールディングした後にジスルフィド結合が切断されても、ArgR の基質特異性には影響しないことが明らかとなった (Table 3)。L-アルギニン, L-リシン, L-オルニチン, D-アルギニン, D-リシン, D-オルニチンに対する C47A/C73A-ArgR の触

媒効率 (k_{cat}/K_m) は、ArgR の触媒効率とよく一致していた。しかし、L-アラニンと D-アラニンに対する触媒効率は、約 5 倍に増加していた (Table 4)。

4. ArgR と C47A/C73A-ArgR 中のトリプトファン残基の蛍光消失

C47A/C73A-ArgR と ArgR に対する Stern-Volmer 定数 K_{sv} は、それぞれ 4.44 と 5.16 と算出され、両者は一致しなかった (Fig. 3)。また、DTT で還元処理した ArgR の K_{sv} は、未処理の ArgR の K_{sv} と一致した。したがって、ジスルフィド結合は、酵素がフォールディングした後は、ArgR の構造には影響しないことが明らかとなった。このことから、本酵素のジスルフィド結合の形成が、フォールディングの過程に影響し、C47A/C73A-ArgR と ArgR の構造に違いが生じたと考えられる。

5. C47A/C73A-ArgR の温度と pH による影響

C47A/C73A-ArgR の最適温度は 70°C, 最適 pH は pH 10 であった。これらの値は ArgR の各値とよく一致し、システイン残基 (C47, C73) のアラニン残基への変異は、ArgR の温度と pH 特性には影響しないことが明らかとなった。

Table 3 Substrate specificities

Substrate	Oxidized ArgR		Reduced ArgR		C47A/C73A-ArgR	
	S.A. (U/mg)	R.A. (%)	S.A. (U/mg)	R.A. (%)	S.A. (U/mg)	R.A. (%)
L-Arginine	1,510 ± 10.4	100	1,510 ± 5.4	100	1,140 ± 13.2	100
L-Lysine	1,570 ± 9.8	104	1,560 ± 10.3	103	1,170 ± 11.1	103
L-Ornithine	660 ± 3.2	44	641 ± 8.3	42	501 ± 8.3	44
L-Alanine	177 ± 6.2	12	161 ± 4.2	11	280 ± 3.1	25
D-Arginine	1,490 ± 18.4	100	1,500 ± 12.4	100	1,100 ± 20.4	100
D-Lysine	1,540 ± 21.5	103	1,550 ± 13.2	103	1,150 ± 18.3	105
D-Ornithine	626 ± 6.8	42	611 ± 5.3	41	490 ± 13.2	45
D-Alanine	168 ± 5.2	11	160 ± 4.0	11	291 ± 5.4	26

Reported values are means ± SD (n=3).
S.A., Specific activity; R.A., Relative activity.

Table 4 Kinetic constants (k_{cat} , K_m and k_{cat}/K_m)

Substrate		ArgR			C47A/C73A-ArgR		
		k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
Lysine	L-form	109 ± 5.1	2.36 ± 0.42	46.2 ± 8.1	84.9 ± 2.1	1.79 ± 0.01	47.4 ± 0.3
	D-form	104 ± 4.3	2.38 ± 0.52	43.7 ± 5.2	81.7 ± 1.3	1.81 ± 0.02	45.1 ± 1.1
Arginine	L-form	119 ± 3.8	1.17 ± 0.01	101 ± 3.0	93.5 ± 1.9	1.01 ± 0.02	92.6 ± 1.0
	D-form	119 ± 0.2	1.24 ± 0.4	96.0 ± 0.5	94.6 ± 2.1	1.00 ± 0.1	94.6 ± 0.91
Ornithine	L-form	87.7 ± 0.5	3.74 ± 0.8	23.4 ± 4.1	68.8 ± 0.02	3.01 ± 0.04	22.9 ± 0.04
	D-form	83.3 ± 0.3	3.62 ± 1.2	23.0 ± 1.7	67.5 ± 0.03	3.06 ± 0.03	22.1 ± 0.02
Alanine	L-form	2.41 ± 0.01	15.7 ± 0.2	0.15 ± 0.05	6.29 ± 0.3	8.45 ± 0.01	0.74 ± 0.3
	D-form	2.62 ± 0.04	15.0 ± 0.1	0.17 ± 0.01	6.81 ± 0.4	8.82 ± 0.2	0.77 ± 0.2

Reported values are means ± SD (n=3).

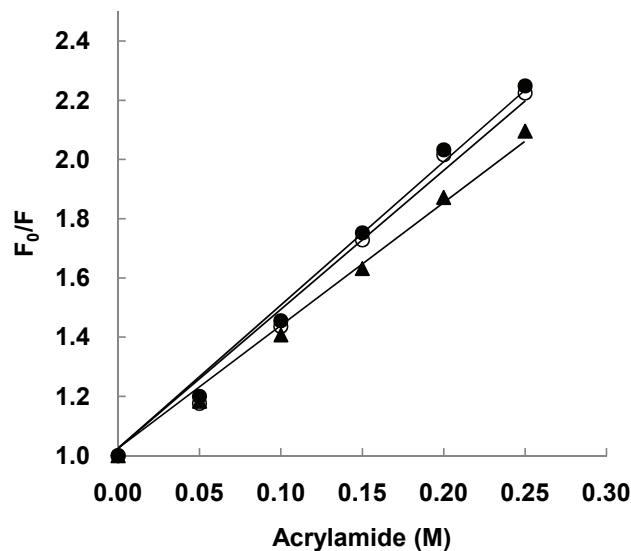


Fig. 3 Stern-Volmer plot for C47A/C73A-ArgR and ArgR.
 ●: ArgR; ○: ArgR under reduced conditions; ▲: C47A/C73A-ArgR.

考 察

われわれは、アルギニンラセマーゼの47残基目と73残基目のシステイン残基が、分子内ジスルフィド結合を形成することを明らかにした。これは、PLPを補酵素とするアミノ酸ラセマーゼでは、最初の報告例である⁸⁾。

ArgRをサイトプラズムで発現させた場合や、アルギニンラセマーゼのジスルフィド結合を部位特異的変異導入により切断した場合、ArgRの総活性は減少した (Fig. 2)。また、変異型酵素の温度やpH特性に影響はなかったが、基質特異性や構造に変化が見られた (Fig. 3, Table 3)。しかし、ArgRを嫌気ボックス内DTTで還元し、C47-C73間のジスルフィド結合を還元・切断したArgR (還元型)の基質特異性や構造は、野生型酵素と良く一致した。以上の結果から、ArgRのC47-C73間のジスルフィド結合は、ArgRを低基質特異性アミノ酸ラセマーゼにフォールドさせるために重要な機能を果たしていることが明らかになった。ArgRは、Sec経路によりペリプラズムに輸送され、ジスルフィド結合が形成されることで低基質特異性アミノ酸ラセマーゼにフォールドし、*P. taetrolens* NBRC 3460が菌体外から取りこまれたD-リシンを栄養素として利用するのに必須な酵素であると考えられる^{4,8)}。

参考文献

- 1) Yorifuji T, Ogata K (1971) Arginine racemase of *Pseudomonas graveolens*. I. Purification, crystallization, and properties. *J Biol Chem* 246: 5085-5092.
- 2) 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.
- 3) Matsui D, Oikawa T (2009) Arginine Racemase is the Essential Enzyme for *Pseudomonas taetrolens* NBRC 3460 to Utilize D-lysine as a Carbon Source. *Trace Nutrients Research* 26: 84-87.
- 4) 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.
- 5) Yamaguchi M, Nakazawa T, Kuyama H, Obama T, Ando E, Okamura T, Ueyama N, Norioka S (2005) High-throughput method for N-terminal sequencing of proteins by MALDI mass spectrometry. *Anal Chem* 77: 645-651.
- 6) Georgette D, Damien B, Blaise V, Depiereux E, Uversky V N, Gerday C, Feller G. (2003) Structural and functional adaptations to extreme temperatures in psychrophilic, mesophilic and thermophilic DNA ligases. *J Biol Chem* 278: 37015-37023.
- 7) Lehrer SS (1971) Solute perturbation of protein fluorescence. Quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. *Biochem* 10: 3254-3263.
- 8) Matsui D, Oikawa T (2010) Detection and function of the intramolecular disulfide bond in arginine racemase: an enzyme with broad substrate specificity. *Chem & Biodiv* 16: 1591-1602.