

平成 21 年 4 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770058
 研究課題名 (和文) D-アルギニンの生合成と光学選択性を持たないアルギニンキナーゼに関する研究
 研究課題名 (英文) The study of D-arginine metabolism and substrate specificity of arginine kinase from *Sbellastrte indica*.

研究代表者
 宇田 幸司 (KOUJI UDA)
 高知大学・教育研究部自然科学系・助教
 研究者番号：10448392

研究成果の概要：

環形動物類のケヤリの生体内には D-及び L-アルギニンを共に基質として利用し、D-及び L-アルギニンリン酸を合成することのできる特異なアルギニンキナーゼが存在している。

本研究では、このケヤリ・アルギニンキナーゼのアミノ酸置換変異体を多数作製し、その酵素活性の変化を検討することで、触媒機能に関与するアミノ酸残基の特定を行った。その結果、54 位のアミノ酸残基が酵素触媒反応に関与すること、64, 89, 320 位のアミノ酸残基は基質認識に関与することが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	0	2,400,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：代謝生理, 比較生化学

1. 研究開始当初の背景

アルギニンキナーゼはリン酸基転移酵素群フォスファゲンキナーゼファミリーの一員であり、細胞内で ATP の γ リン酸基をアルギニンに転移させ、アルギニンリン酸と ADP を合成する反応を可逆的に触媒する酵素である。そして、アルギニンキナーゼは無脊椎動物全般に広く分布しており、細胞内の ATP 濃度の調整とエネルギー代謝に密接に関与する酵素であるため、古くから国内外の

多くの研究者によって研究対象とされてきた。

特に、節足動物や軟体動物のアルギニンキナーゼについては、結晶構造解析をはじめとする様々な研究によって、その機能と構造の解明が進められている。申請者も、様々な生物からアルギニンキナーゼを含むフォスファゲンキナーゼを単離し、その構造と機能の進化について明らかにしてきた。

なかでも、環形動物類のケヤリから単離し

たアルギニンキナーゼは、通常生体内に存在する L-アルギニンだけでなく、非生体アミノ酸である D-アルギニンをも基質として利用できることを発見した。一般的に、酵素は光学活性を持つ化合物を基質とすると、光学異性体の片方のみを特異的に認識し利用する光学選択性を有している。例えば、節足動物や軟体動物から単離されるアルギニンキナーゼは、L 体のアルギニンのみを基質として利用するが、その光学異性体である D-アルギニンを基質として利用することはできない。

現在までに、光学活性をもつ化合物の両光学異性体を基質として利用する、つまり、光学選択性を持たない酵素は、光学活性を反転させるラセマーゼの存在が知られているのみであり、ケヤリアルギニンキナーゼの基質特異性には非常に興味深い点が多い。

さらに、申請者はケヤリの生体内に存在する遊離アルギニンのうち、実に 94%が D 体であること、同様に遊離アルギニンリン酸の 92%が D 体であることを確認し、ケヤリ生体内で D-アルギニンがリン酸基の貯蔵源として機能していることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究では、L-アルギニンに加えて D-アルギニンに対しても活性を示す特異なケヤリ・アルギニンキナーゼの酵素触媒機能の解明を目指した。まず、ケヤリ・アルギニンキナーゼのどのアミノ酸残基が基質認識や酵素触媒機能に関与するかを特定した。さらに、これらのアミノ酸残基がフォスファゲンキナーゼファミリー全般においても酵素機能に関与するかどうかを検討した。また、D-アルギニンの生体内での代謝メカニズムの解明も試みた。

3. 研究の方法

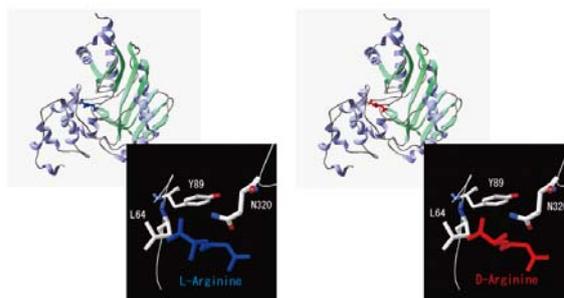
(1) ケヤリ・アルギニンキナーゼの酵素触媒機能に関与するアミノ酸残基の特定

ケヤリから単離された、L-及びD-アルギニンの両者に対して触媒活性を示すアルギニンキナーゼの、それぞれの基質に対する基質認識部位の特定を進めた。

具体的な手法としては、既に発現ベクターに組み込まれているケヤリアルギニンキナーゼの遺伝子に対して、部位特異的突然変異導入法により、アミノ酸置換変異体を作製し、その詳細な酵素活性の測定を比較により解析を進めた。

まず、ケヤリ・アルギニンキナーゼの一次構造を基に SWISS-MODEL による立体構造の予測を行った。さらに、得られた立体構造上のどこに基質である L-または D-アルギニンが結合するかを、コンピュータを利用したシミュレーションによって特定したのが次の図

である。



図に示したように、L-アルギニン、D-アルギニン共にほぼ同じ場所に結合することが予測され、64 番目のロイシン、89 番目のチロシン、320 番目のアスパラギン残基が基質結合部位周辺に位置することが示唆された。

これらの三つのアミノ酸残基に加え、上記の立体構造や、他のフォスファゲンキナーゼとのアミノ酸配列のアライメント解析などから、酵素触媒機能に関与すると考えられた幾つかのアミノ酸残基について、数十のアミノ酸置換変異体を作製した。

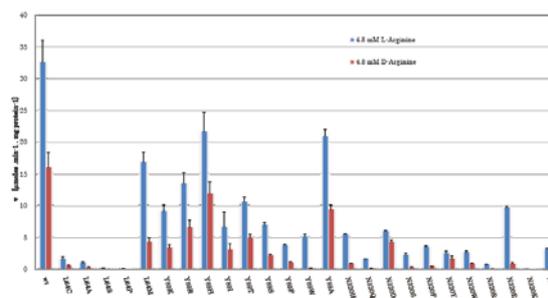
作製したアミノ酸置換変異体は、その酵素活性を詳細に検討し、酵素触媒機能に関与するアミノ酸残基の特定を進めた。

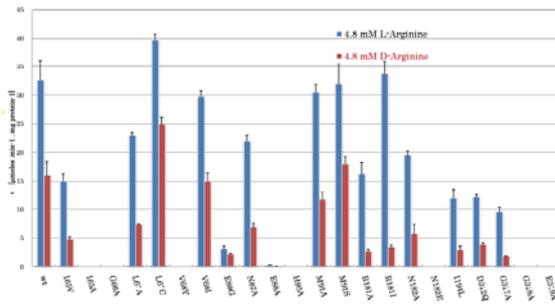
(2) フォスファゲンキナーゼにおける酵素触媒機能について

ケヤリ・アルギニンキナーゼにおいて基質認識に関与することが示されたアミノ酸残基について、他のフォスファゲンキナーゼにおいても同様に基質認識に関与するかを、アミノ酸置換変異体の作製によって検討した。

4. 研究成果

基質結合部位の予測により、基質認識及び触媒機能に関与すると考えられたアミノ酸残基に対する数十のアミノ酸置換変異体を作製し、その酵素活性の解析を行った。次に示した二つの図が、多数のアミノ酸置換変異体の L-アルギニン及び D-アルギニンへの酵素活性を比較した図である。





ケヤリ・アルギニンキナーゼのアミノ酸置換変異体の酵素活性 2

これらのアミノ酸置換変異体を用いた酵素活性の比較の結果、ケヤリ・アルギニンキナーゼの54, 64, 89, 320位のアミノ酸残基の重要性が確認され、54位のアミノ酸残基は酵素触媒反応に関与すること、64, 89, 320位のアミノ酸残基はL-及びD-アルギニンの認識に関与することが示された。

さらに、これらのアミノ酸置換変異体のうち、特徴的な酵素活性を示した幾つかについて、さらに詳細な酵素活性パラメータの測定を行った。その測定結果の一部をまとめたものが下記の表である。

	L-Arg			D-Arg		
	k_{cat} [1/s]	K_m^{Arg} [mM]	k_{cat}/K_m	k_{cat} [1/s]	K_m^{Arg} [mM]	k_{cat}/K_m
Wild-Type	45.99 ± 3.39	3.69 ± 0.20	12.48 ± 0.95	40.81 ± 5.19	9.00 ± 0.39	4.52 ± 0.40
G54S	81.16 ± 3.67	2.05 ± 0.09	39.54 ± 0.14	86.67 ± 1.84	9.34 ± 0.41	9.29 ± 0.25
G54A	121.5 ± 7.6	2.72 ± 0.12	44.67 ± 2.80	120.7 ± 1.5	4.40 ± 0.16	27.47 ± 1.37
L64I	75.44 ± 4.38	0.39 ± 0.03	194.6 ± 10.9	90.68 ± 4.32	3.14 ± 0.13	28.96 ± 1.79
L64V	62.27 ± 4.36	6.45 ± 0.12	9.65 ± 0.61	90.69 ± 6.04	9.55 ± 0.79	9.52 ± 0.40
Y89Q	78.79 ± 4.19	5.07 ± 0.35	15.60 ± 1.29	62.27 ± 4.36	6.45 ± 0.12	9.65 ± 0.61

野生型酵素では54番目のアミノ酸残基はグリシン (G) である。これをセリン (S) またはアラニン (A) に置換したアミノ酸置換変異体を作製し、その酵素活性を測定したところ、L-アルギニンを基質としたとき、D-アルギニン基質としたときの両方で酵素活性 k_{cat} が2~3倍に上昇した。一方で基質親和性は野生型酵素と比べて大きな変化を示さなかったことから、54番目のアミノ酸残基が基質認識ではなく、酵素の触媒機能に関与することが示された。

64番目のアミノ酸残基は野生型酵素ではロイシン (L) であるが、イソロイシンに変えた変異体では、L-アルギニンに対する基質親和性が約10倍上昇し、D-アルギニンに対する基質親和性は約3倍上昇した。また、64番目のロイシンをバリン (V) に置換した変異体では、L-アルギニンに対する基質親和性が1/2程度に減少したが、D-アルギニンに対する基質親和性に変化は生じなかった。このことから、64番目のアミノ酸残基はL-アルギニン及びD-アルギニンの認識に関与することが強く示唆された。

89番目のアミノ酸残基は野生型酵素ではチロシン (Y) であるが、これをグルタミン

(Q) に置換した変異体はL-アルギニンに対する基質親和性を低下させたが、D-アルギニンに対する基質親和性は上昇させた。このことから、このアミノ酸残基も基質認識に関与することが示された。

また、他の生物から単離されたアルギニンキナーゼやフォスファゲンキナーゼファミリーの他の酵素を用いたアミノ酸置換変異体による研究でも、89位のアミノ酸残基が基質認識に関与することが示された。

特に、ゼブラフィッシュから単離されたクレアチンキナーゼの89番目のアミノ酸残基に関する研究は、このアミノ酸残基の重要性に関して興味深い結果を示した。ゼブラフィッシュ・クレアチンキナーゼの89番目のアミノ酸残基はアルギニンである。このアミノ酸残基を他の19種類のアミノ酸残基に置換した19のアミノ酸置換変異体を作製し、その酵素活性を測定した。その結果、全ての変異体は著しい活性の低下を示し、89番目のアミノ酸残基がアルギニンであることが、ゼブラフィッシュ・クレアチンキナーゼの活性に必須であることを示した。

これらの結果により、フォスファゲンキナーゼファミリーの酵素全般において、89位のアミノ酸残基が基質認識に関与することを示した。また、光沢特異性を持たないケヤリ・アルギニンキナーゼの光学特異性に関与するアミノ酸残基の特定を行うことができた。

これらの研究成果に基づき、今後はL-アルギニンまたは、D-アルギニンのみを基質とするケヤリ・アルギニンキナーゼの作製により、人工的な光学特異性の導入を目指す予定である。

これらの研究成果と、今後の研究は、酵素の光学選択性の成り立ちや、その機構の解明に大いに貢献すると考えられる。また、ケヤリ・アルギニンキナーゼの基質認識部位の改変により、人工的な光学選択性が導入できれば、光学選択性の逆転等による新規人工酵素作製の技術的な基礎ともなりうるであろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1. Uda K., Kuwasaki, A., Shima, K., Matsumoto, T. and Suzuki, T. (2009) The Role of Arg-96 in Danio rerio Creatine Kinase in Substrate Recognition and Active Center Configuration. Int. J. Biol. Macromol. (印刷中) 査読有

2. Iwanami, K., Iseno, S., Uda K. and Suzuki, T. (2009) A novel arginine kinase

from the shrimp *Neocaridina denticulata*: the fourth arginine kinase gene lineage. Gene (印刷中) 査読有

3. Suzuki T., Uda K., Adachi M., Sanada H., Tanaka K., Mizuta C., Ishida K., Ellington W. R. (2008) Evolution of the diverse array of phosphagen systems present in annelids. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochemistry and Molecular Biology 152; 60-66. 査読有

4. Uda K., Yamamoto K., Iwasaki N., Iwai M., Fujikura K., Ellington W. R., Suzuki T. (2008) Two-domain arginine kinase from the deep-sea clam *Calyptogena kaikoi* - Evidence of two active domains. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochemistry and Molecular Biology 151; 176-182. 査読有

5. Iwanami K., Uda K., Tada H., Suzuki T. (2008) Cytoplasmic and mitochondrial creatine kinases from the skeletal muscle of sperm whale (*Physeter macrocephalus*). Molecular cloning and enzyme characterization. The Protein Journal 27: 43-49. 査読有

6. Tanaka K., Uda K., Shimada M., Takahashi K., Gamou S., Ellington W. R., Suzuki T. (2007) Evolution of the cytoplasmic and mitochondrial phosphagen kinases unique to annelid groups. J. Mol. Evol. 65: 616-625. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. Uda K. and Suzuki T. REACTION MECHANISM OF SABELLASTARTE ARGININE KINASE WITH SUBSTRATE SPECIFICITY TOWARDS D-ARGININE, 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, 2008 年 7 月 1 日, アテネ (ギリシア)

2. 宇田 幸司, ケヤリ・アルギニンキナーゼの基質認識機構の解明, 日本動物学会 第 78 回弘前大会, 2007 年 9 月 21 日, 弘前大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇田 幸司 (KOUJI UDA)

高知大学・教育研究部自然科学系・助教

研究者番号 : 10448392

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :