

Marinomonas mediterranea 由来キノン含有 新規グリシンオキシダーゼの大腸菌発現系の確立と性質検討

梶山 雄輝・溝端佐津紀・赤地 周作・根本 理子・田村 隆・稲垣 賢二
(農芸化学コース)

Recombinant expression and characterization of quinone-containing novel glycine oxidase from *Marinomonas mediterranea*

Yuki Kajiyama, Satsuki Mizobata, Shusaku Akaji, Michiko Nemoto, Takashi Tamura, and Kenji Inagaki

(Course of Agrochemical Bioscience)

Novel glycine oxidase (GlyOX) from *Marinomonas mediterranea* depends on cysteine tryptophylquinone (CTQ) and catalyzes the oxidative deamination of glycine to produce a glyoxylate, ammonia, and hydrogen peroxide. *M. mediterranea* GlyOX genes (*goxA* and *goxB*) were cloned and recombinant GlyOX was heterologously expressed by *E. coli*. The purification of recombinant GlyOX was carried out by metal affinity and DEAE-Toyopearl 650 M column chromatographies. *M. mediterranea* GlyOX was homotetrameric with a molecular mass of 76 kDa and showed optimum activity around 30°C and at pH 5.0, and stability below 50°C and between pH 5.0 to 9.0. *M. mediterranea* GlyOX shows a strict substrate specificity toward glycine, and the Michaelis constant for glycine was 0.5 mM. *M. mediterranea* GlyOX could determine the quantity of glycine in human serum and human blood plasma with high sensitivity. This study revealed the catalytic and structural properties of *M. mediterranea* GlyOX with high substrate specificity.

Key words : glycine oxidase, *Marinomonas mediterranea*, cysteine tryptophylquinone, recombinant expression, enzymatic glycine assay

緒 言

海洋性細菌 *Marinomonas mediterranea* はメラニン形成能を有し Oceanospirillaceae 科に属するグラム陰性細菌である。生育温度は15～30℃であり、1～5%のNaCl存在下で生育できる。*M. mediterranea* が菌体外に産生するL-リシンε-オキシダーゼ(εLysOX)はL-リシンに対して厳格な基質特異性を持つ事が報告されている¹⁾。εLysOXは、L-リシンの酸化的脱アミノ化反応を触媒し、副産物として過酸化水素を生成する。この反応で生じる過酸化水素はバイオフィーム内の細胞死を促し、バイオフィームの形成及び分化に関与しているとされる²⁾。本研究室ではこの*M. mediterranea* 由来εLysOXのX線結晶構造解析に成功し、全体構造を明らかにするとともに、酵素内アミノ酸残基のCys516とTrp581が結合して補酵素システイントリプトフィルキノン(CTQ)を形成していることを明らかにした(Fig.1)³⁾。更に本菌がεLysOXと同様にCTQ依存性の新規なグリシンオキシダーゼを生産していることが判明した⁴⁾。

グリシンオキシダーゼ(GlyOX)はグリシンの酸化的脱アミノ化反応を触媒し、グリオキシル酸、過酸化水素、

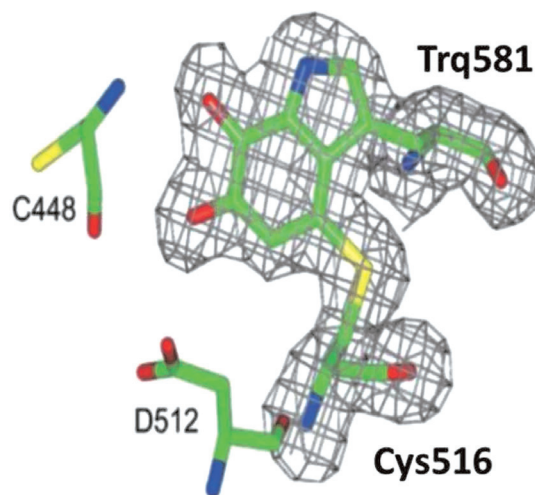


Fig. 1 Structure of 'Built-in' type cofactor, cysteine tryptophylquinone (CTQ) of εLysOX³⁾.

Received October 10, 2019

岡山大学大学院 環境生命科学研究科

(Graduate School of Environmental and Life Science,
Okayama University)

ゲル濾過法により算出した。標準タンパク質として牛由来チログロブリン (670 kDa), 牛由来 γ -グロブリン (158 kDa), 鳥由来オボアルブミン (44 kDa), 鳥由来ミオグロビン (17,400 Da), ビタミン B12 (1,350 Da) を用いた。

また、サブユニットの質量は SDS-PAGE により決定した。

血清、血漿中のグリシン定量

和光純薬社のヒト血清、コスモバイオ社のヒト血漿サンプルを使用した。組換え GlyOX (28 mU) を使用し、クエン酸緩衝液 (pH 5.0), 常温という条件で活性測定した。さらに同酵素を用いて既知のグリシン濃度の溶液で検量線を作成し、グリシン濃度 (μ M) を算出した。

結果と考察

組換え GlyOX の大腸菌での発現と精製

E. coli Rosetta (DE3) pLysS/pRSFD *goxA-goxB* で発現させた酵素はアフィニティークロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーで精製を行った。Table 1 が示すように大腸菌無細胞抽出液より収率 9.5%, 650倍に精製することができた。精製酵素を用いてポリアクリルアミド電気泳動を行ったところ、電気泳動的にはほぼ単一に精製することができた (Fig. 2)。

組換え GlyOX の性質検討

最適温度、最適 pH、熱安定性、pH 安定性の検討を行った。最適温度を 10~50℃ で検討したところ、30℃ が最適温度であることが分かった。最適 pH を 3.0~10.0 の間で検討したところ、最適 pH は 5.0 であることが分かった (Fig. 3)。熱安定性は 20~80℃ で 30 分間保持し、活性測定法の反応試薬と混合して相対活性を算出した結果、GlyOX は 20~50℃ では安定だったが、60℃ 以上で酵素が失活し、70℃ では完全に失活した。pH 安定性で検討したところ、pH 5.0~9.0 で安定であった (Fig. 4)。

19種類の L-アミノ酸への基質特異性を検討したところ、グリシン以外の L-アミノ酸には活性を示さなかった (Fig. 5)。このことから *M. mediterranea* 由来大腸菌組換え GlyOX はグリシンに対して厳格な基質特異性を持つことが示された。また特徴的なのは Table 2 のように他の細菌由来の GlyOX が活性を強く示す D-アミノ酸やサルコシンのようなグリシン構造類似体に対してもほぼ活性を示さなかった。このことから本酵素の高い基質特異性が示された。

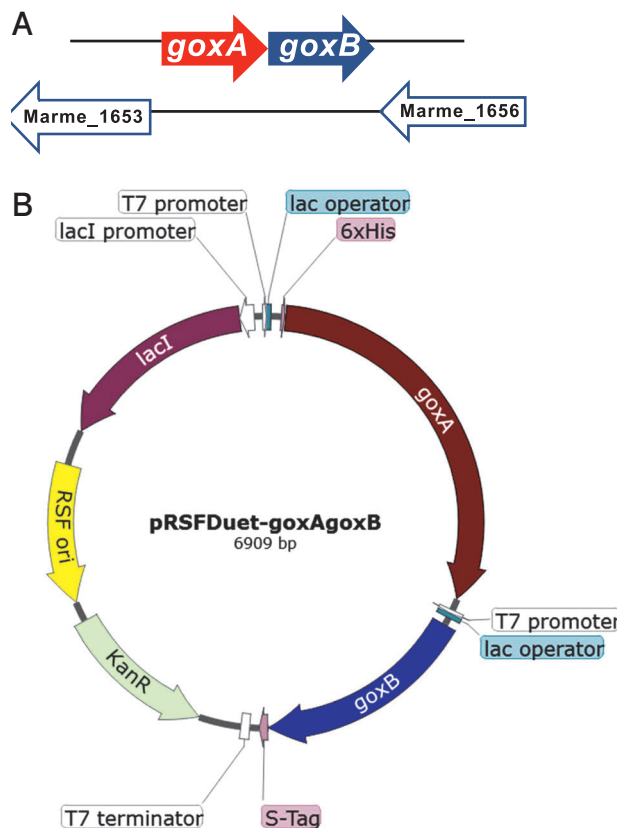


Fig. 2 Genes around GlyOX coding region (A). Plasmid map of pRSFD *goxA-goxB* (B).

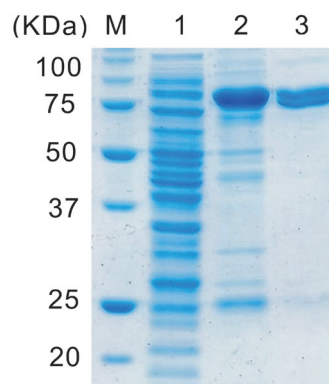


Fig. 3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of recombinant GlyOX.

Lane M, molecular mass standard marker, Lane 1, crude extract, Lane 2, after metal affinity chromatography, Lane 3, after DEAE Toyopearl 650 M column chromatography. Ten μ g of protein was applied in each lane.

Table 1 Summary of purification of recombinant GlyOX from *E. coli* transformant

	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
crude extract	1,600	420	0.26	100	1
metal affinity	1.0	90	90	21	350
DEAE-Toyopearl 650 M	0.25	40	160	9.5	620

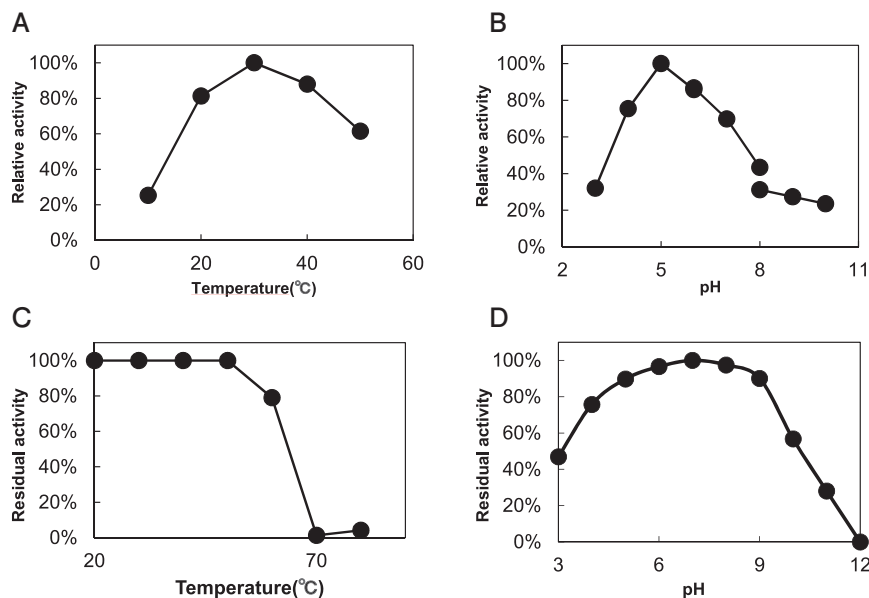


Fig. 4 Effect of temperature and pH on the activity and stability of recombinant GlyOX.

(A) Optimum temperature of recombinant GlyOX. (B) Optimum pH of recombinant GlyOX. The reaction was performed using citrate buffer at a pH range of 3–6, potassium phosphate buffer at a pH range of 6–8 and sodium borate buffer at a pH range of 8–10. (C) Thermal stability of recombinant GlyOX. (D) pH stability of recombinant GlyOX.

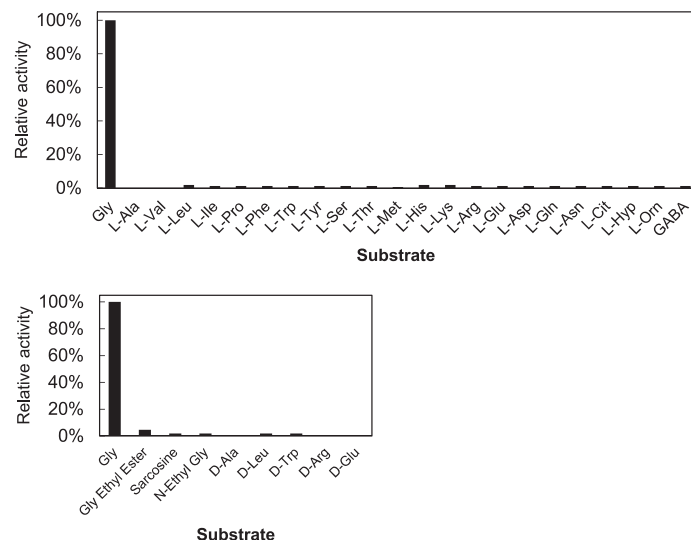


Fig. 5 Substrate specificities of recombinant GlyOX.

Substrate specificity of recombinant GlyOX was examined using natural L-amino acids and structural analogue of glycine, and D-amino acids. Relative activity of each substrate was calculated as 100% activity toward glycine.

Table 2 Substrate specificity of GlyOXs from various kinds of bacteria

Substrate	GlyOX from <i>Marinomonas mediterranea</i>	GlyOX from <i>Bacillus subtilis</i> ⁽⁵⁾	GlyOX from <i>Geobacillus kaustophilus</i> ⁽⁷⁾
glycine	100	77.4	36
sarcosine	0	100	69
N-ethyl glycine	0	85.3	85
glycine ethyl ester	5	–	26.3
glyphosate	0	–	–
D-Ala	1	7.4	69
D-Pro	–	15.1	100

組換え GlyOX の反応速度論解析と分子質量測定

精製酵素を用いてグリシンに対する反応速度論の解析を行った。元菌由来 GlyOX と大腸菌組換え GlyOX の結果を比較したところ Table 3 に示す結果となった。 k_{cat}/K_m が組換え GlyOX では $27 \text{ s}^{-1}/\text{mM}$ と元菌由来 GlyOX と同等の触媒効率であることを示した。また *M. mediterranea* 由来 GlyOX の触媒定数 ($k_{\text{cat}} = 13.4$) は *Bacillus subtilis* 由来 GlyOX ($k_{\text{cat}} = 0.9$) よりも優位に高い結果であった。

分子質量をゲル濾過法で測定したところ $260,000 \text{ Da}$ と算出され、組換え GlyOX の SDS-PAGE の結果からサブユニットの質量は $76,000 \text{ Da}$ であることから本酵素はホモ 4 量体であることが示唆された。

組換え GlyOX を用いた血清及び血漿中のグリシン定量

28 mU の組換え GlyOX を用いて作成した標準グリシン検量線をもとに血清および血漿中のグリシン濃度を酵素を用いた定量と HPLC での定量を行った結果、血漿中のグリシンを HPLC とほぼ同感度で定量することができた (Fig. 6)。

以上をまとめると Table 3 のようになる。*M. mediterranea* 由来 CTQ 依存性 GlyOX と従来報告のあった FAD 依存性 GlyOX と比較して、グリシンに対する厳格な基質特異性と高い触媒効率が見られ、更に血中のグリシン濃度を高感度に定量できることから今後の応用利用が期待される。また今回確立した精製系によって *Marinomonas mediterranea* の培養上清から GlyOX を精製する場合よりも簡便かつ短時間の精製が可能になったので、今後 X 線結晶構造解析による立体構造の解明や CTQ 形成機構の解明が期待される。

要 約

海洋細菌 *Marinomonas mediterranea* 由来の新規グリシンオキシダーゼ (GlyOX) はシステイントリプトフィルキノン (CTQ) 依存性の酵素で、グリシンの酸化的脱アミノ化を触媒しグリオキシル酸、アンモニア、過酸化水素を生産する酵素である。*M. mediterranea* 由来 GlyOX の発現に必要な *goxA* と *goxB* 両遺伝子をクローニング

し、組換え GlyOX を大腸菌で異種発現させた。組換え GlyOX の精製はメタルアフィニティークロマトグラフィーと DEAE-トヨパール 650 M カラムクロマトグラフィーで行った。本酵素は 30°C 、 $\text{pH } 5.0$ が反応最適条件で 50°C 、 $\text{pH } 5.0 \sim 9.0$ まで安定であった。組換え GlyOX はグリシンに対して高い基質特異性を示し、これまで報告のある GlyOX の中で最も基質特異性の厳格な酵素であった。反応速度論解析を行ったところグリシンに対する K_m は 0.5 mM 、 k_{cat} は 13.4 s^{-1} であった。*M. mediterranea* 由来 GlyOX を用いて血漿及び血清中のグリシン濃度を正確に測定可能であった。

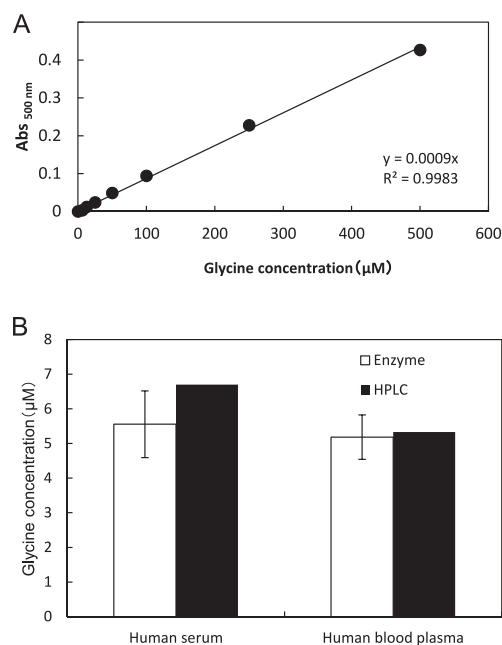


Fig. 6 Glycine determination in human serum and human blood plasma.

(A) Standard curve of glycine by GlyOX enzymatic assay. (B) Glycine concentration in human serum and human blood plasma were determined by HPLC (■) and enzymatic assay using recombinant GlyOX (□). The mean $\pm$ SD of triplicates.

Table 3 Properties of GlyOX from *M. mediterranea*

	GlyOX from <i>Marinomonas mediterranea</i>	GlyOX from <i>Bacillus subtilis</i> ⁽⁵⁾	GlyOX from <i>Geobacillus kaustophilus</i> ⁽⁷⁾
Cofactor	CTQ	FAD	FAD
Molecular mass of subunit (kDa)	76	41	43
Molecular mass (kDa)	260 (Homotetramer)	159 (Homotetramer)	160 (Homotetramer)
Optimum temperature ($^\circ\text{C}$)	30	45	74
Optimum pH	5.0	8.0	8.5
Specific activity (U/mg)	160	0.46	11.85
K_m (mM)	0.5	1.0	0.25
k_{cat} (s^{-1})	13.4	0.6	—

文 献

- 1) Matsuda, M. and Y. Asano : Determination of plasma and serum L-lysine using L-lysine epsilon-oxidase from *Marinomonas mediterranea* NBRC 103028 (T), Anal. Biochem., **406**, 19-23, (2010)
- 2) Mai-Prochnow, A., P. Lucas-Elio, S. Egan, T. Thomas, JS. Webb, A. Sanchez-Amat and S. Kjelleberg : Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria, J. Bacteriol., **190**, 5493-5501, (2008)
- 3) Okazaki, S., S. Nakano, D. Matsui, S. Akaji, K. Inagaki and Y. Asano : X-Ray crystallographic evidence for the presence of the cysteine tryptophylquinone cofactor in L-lysine epsilon-oxidase from *Marinomonas mediterranea*, J. Biochem., **154**, 233-236, (2013)
- 4) Campillo-Brocal, J. C., P. Lucas-Elio and A. Sanchez-Amat : Identification in *Marinomonas mediterranea* of a novel quino-protein with glycine oxidase activity. MicrobiologyOpen, **2**, 684-694, (2013)
- 5) Nishiya, Y. and T. Imanaka : Purification and characterization of a novel glycine oxidase from *Bacillus subtilis*, FEBS Letters, **438**, 263-266, (1998)
- 6) Molla, G., L. Motteran, V. Job, M. Pilone and L. Pollegioni, Kinetic mechanisms of glycine oxidase from *Bacillus subtilis* : Eur. J. Biochem., **270**, 1474-1482, (2003)
- 7) Martinez-Martinez, I., J. Navarro-Fernandez, F. Garcia-Carmona, H. Takami, and A. Sanchez-Ferrer : Characterization and structural modeling of a novel thermostable glycine oxidase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426, Proteins Struct. Funct. Bioinform., **70**, 1429-1441, (2008)