

総合論文

糸状菌 *Trichoderma viride* 由来の抗腫瘍性酵素
L-リシン α -オキシダーゼに関する研究齋藤 雅哉・稲垣 賢二
(農芸化学コース)Studies on antitumor enzyme L-lysine α -oxidase from *Trichoderma viride*Masaya Saito and Kenji Inagaki
(Course of Agrochemical Bioscience)

L-Lysine α -oxidase (LysOX) from *Trichoderma viride* is a homodimeric flavoenzyme that catalyzes the oxidative deamination of L-lysine to produce α -keto- ϵ -aminocaproate with ammonia and hydrogen peroxide. LysOX inhibited the growth of cancer cells but showed relatively low toxicity for normal cells. The full-length cDNA consists of 2,119 bp, and encodes a long N-terminal propeptide composed of 77 residues (Met1-Arg77) and the mature protein (Ala78-Ile617). The LysOX gene was heterologously expressed in *Streptomyces lividans* TK24 or *Escherichia coli* SoluBL21. The enzymatic properties of the purified recombinant LysOX, such as substrate specificity, kinetic parameters and thermal stability, are the same as those of the native LysOX. The LysOX precursor (prLysOX) expressed in *E. coli* shows weak enzymatic activity and is activated by proteolytic processing. The crystal structure of prLysOX revealed that the propeptide of prLysOX indirectly changes the active site structure to inhibit enzyme activity. Moreover, the crystal structures of LysOX and its L-lysine complex revealed that the hydrogen bonding network formed by Asp212, Asp315 and Ala440 with two water molecules is responsible for the recognition of the ϵ -amino group of L-lysine. In addition, a narrow substrate-binding site and acidic surface at the active site entrance both contribute to strict substrate specificity. Mutational analysis demonstrated that Asp212 and Asp315 are essential for substrate recognition, and the D212A/D315A LysOX prefers aromatic amino acids. Furthermore, the structural basis of the substrate specificity change has also been revealed by the structural analysis of the D212A/D315A LysOX and its substrate complexes.

Key words : L-lysine α -oxidase, antitumor enzyme, substrate recognition, X-ray crystallography, enzyme activity regulation

はじめに

FAD 依存性のアミノ酸オキシダーゼには、L-アミノ酸オキシダーゼ(LAAO)とD-アミノ酸オキシダーゼ(DAAO)が存在する。近年、哺乳類由来のDAAOは盛んに研究が行われ、神経伝達の調節への関与が示唆されているが¹⁾、LAAOの研究例は少なかった。その中で研究が比較的進んでいるのは、蛇毒のLAAOであり、L-MetやL-Leu等の幅広いアミノ酸を酸化的に分解する低基質特異性酵素である^{2,3)}。これに対して、糸状菌 *Trichoderma viride* 由来のL-リシン α -オキシダーゼ (LysOX)⁴⁾は、我々が研究を進めてきた *Streptomyces* 属放線菌由来のL-グルタミン酸オキシダーゼ(LGOX)⁵⁻⁷⁾と並んで基質特異性が厳格である。LysOXは抗がん剤の探索中に *T. viride* から

単離され、多種多様ながん細胞に対して抗腫瘍活性を示す^{4,8)}。また、常温菌由来にも関わらず熱安定性が高く、60°C、30分間の熱処理に対しても90%以上の残存活性を示す⁴⁾。加えて、pHに対する安定性にも優れている。このため、抗がん剤としての開発が期待されるとともに、食品工業やバイオ産業の分野において、L-Lysの微量定量用バイオセンサーとして世界的に幅広く利用されてきた。

ここでは、LysOXの反応速度論的性質や厳格な基質特異性を示す構造的特徴、成熟化機構等、我々がこれまでの研究で明らかにしたLysOXの興味深い諸性質を紹介する。

LysOX の抗腫瘍活性と細胞毒性の検討

LysOX はマウスの腫瘍細胞のみならずヒトの多様ながん細胞に対する抗腫瘍活性を持つことが明らかになっている^{4,8)}。そこで、ヒトの肺がん細胞 (RERF-LC-AI) と子宮頸がん細胞 (HeLa) を用い、正常細胞の HUVEC

を対照として、LysOX の細胞毒性を検討した。その結果、RERF-LC-AI と HeLa は、LysOX を 3 mU/ml 添加すると、4 日後には多くの細胞が死滅した (Fig. 1)。これに対して、正常細胞では、同じく 3 mU/ml の LysOX の添加でも生存率は 80% となり、腫瘍細胞に対する選択毒性を示した⁹⁾。腫瘍細胞は正常細胞と比較して L-Lys

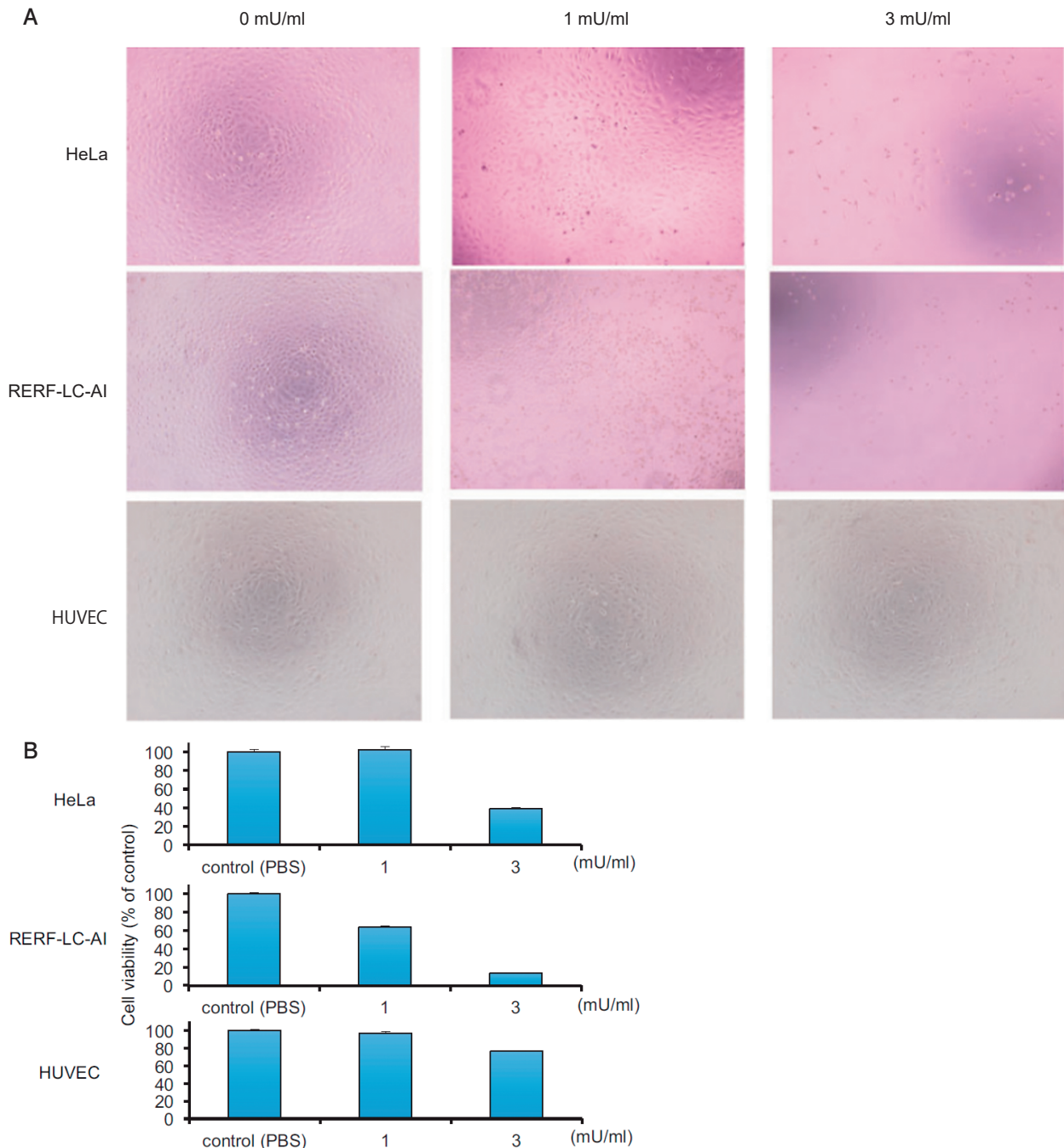


Fig. 1 Effects of LysOX on cancer cells and normal cells⁹⁾.

(A) The inhibitory effects of LysOX on proliferation of RERF-LC-AI, HeLa, and HUVEC cells. The cells were treated with 0, 1 or 3 mU/ml of LysOX. The cell images (100 × magnification) after 4 days incubation are shown. (B) The proliferation of the cells was assessed by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay. Cell proliferation is indicated as a percentage of proliferation relative to that of the control cells. The mean ± SD of quadruplicates are shown.

要求性が高く、LysOX 反応によって培地中の L-Lys が分解されることにより増殖抑制効果が働き、さらに、酵素反応産物の過酸化水素による細胞毒性効果も加わって抗腫瘍活性を示すと考えられる。また、腫瘍細胞ではカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼ等の抗酸化酵素レベルが低いことが知られており¹⁰、これが選択毒性を強めた要因と考えられる。

LysOX 遺伝子のクローニング及び異種発現系の構築

LysOX は当初小麦ふすまを利用した *T. viride* の固体培養によって生産されてきたが⁴、培養に約 2 週間という長期間を要し、かつ酵素の生産量、回収量もごく僅かであった。そこで、筆者らは放線菌 *Streptomyces lividans* TK24 及び大腸菌 *Escherichia coli* SoluBL21 を用いた LysOX の異種発現系を構築した^{11, 12}。

まず、LysOX の完全長 cDNA を単離、解析したところ、2,119 bp から成ることがわかり、N 末端アミノ酸配列解析の結果から、本酵素は N 末端プロペプチド (Met1-Arg77) を含む前駆体として発現した後に、成熟体タンパク質 (Ala78-Ile617) となることが示唆された。この完全長 cDNA を用い、放線菌で発現しやすいようにコドンの最適化を行った遺伝子を作製した。これをインサートとして、ニトリルヒドラーゼ (H-NHase) プロモーターを有する放線菌用構成型高発現プラスミド pHSA81 を使用した結果、LysOX の異種発現系の構築に初めて成功した¹¹。この発現系では菌体外に酵素活性が見られたことから、夾雑タンパク質が少なく、非常に簡便な精製が可能となった。しかし、十分量の LysOX を得るためには菌体を 20 日程度培養しなければならないため、より短期間で培養が可能な大腸菌での発現系構築を行った。大腸菌用にコドンを最適化した LysOX 遺伝子を、低温誘導が可能なプラスミド pColdIV に導入し、組換え LysOX 発現プラスミドを構築した。大腸菌形質転換体からは酵素活性や熱安定性が低い前駆体 LysOX (prLysOX) として生産され、これをプロテアーゼで処理すると、活性と安定性が大幅に上昇した。この酵素サンプルを SDS-PAGE に供したところ、成熟体酵素と同じ 56 kDa のバンドが確認された (Fig. 2 A)。この N 末端のアミノ酸配列は、ネイティブ LysOX と同様に Ala, Glu で始まることがわかり、prLysOX はプロペプチドにより酵素活性が抑制され、それが除去されることで成熟体の LysOX となり、活性化することが示された。そして、成熟化処理後にカラム精製し、得られた精製酵素の反応速度論解析を行い基質特異性を検討したところ、ネイティブ LysOX 及び *S. lividans* 形質転換体由来の組換え LysOX と同等の性質を示した。プロテアーゼ切断により活性化し、熱安定性が向上することを利用した大腸菌形質転換体からの簡便な組換え LysOX 大量精製系を確立することができた事により、本酵素の産業利用の範囲が

大きく拡大した^{11, 13}。

LysOX 及び prLysOX の生化学的諸性質

Fig. 2 B に示したように LysOX と prLysOX の最適 pH は、それぞれ pH 7.4 と 4.0 であり、大きく異なる結果となった。pH 4.0 においては、prLysOX のプロペプチド構造の不安定化が起こることで prLysOX が成熟型の LysOX と同様の構造をとる等、prLysOX の構造に変化が生じて

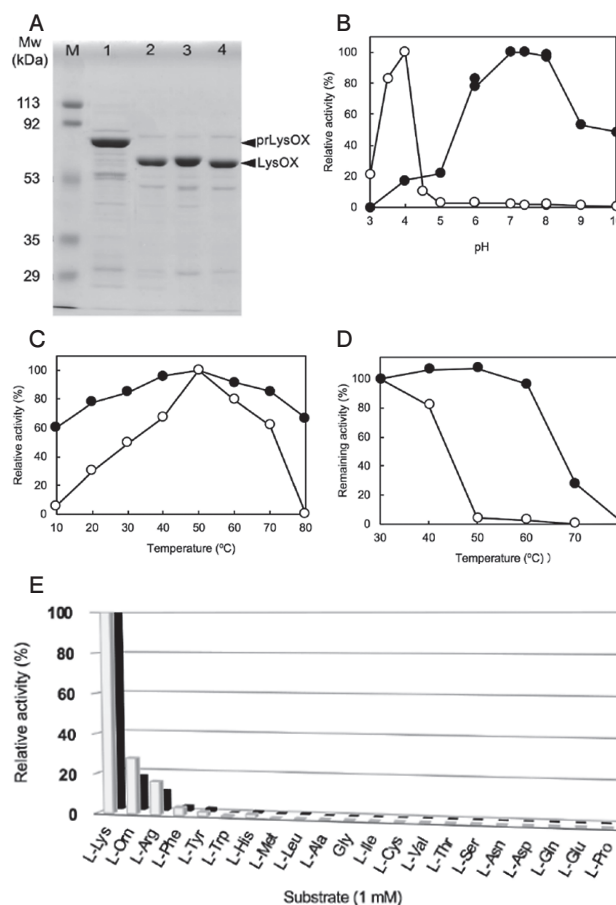


Fig. 2 Properties of prLysOX and recombinant LysOX from *E. coli* transformants¹².

(A) Cleavage of the propeptide region by various proteases. The proteolysis products of prLysOX were examined by SDS-PAGE: M, molecular weight marker; lane 1, prLysOX; lane 2, after treatment with trypsin; lane 3 after treatment with chymotrypsin; lane 4, after treatment with SGMP. (B) Effect of pH on the enzyme activities of prLysOX (open circle) and recombinant LysOX (closed circle). The buffers used for the enzymatic assay are as follows: citrate buffer (pH 3.0–6.0), KPB (pH 6.0–8.0), sodium borate buffer (pH 8.0–10.0). (C) Effect of temperature on the enzyme activities of prLysOX (open circle) and recombinant LysOX (closed circle). (D) Thermal stability of prLysOX (open circle) and recombinant LysOX (closed circle). (E) Substrate specificity of prLysOX (open circle) and recombinant LysOX (closed circle).

いる可能性が示唆された。最適温度は prLysOX, LysOX ともに50°Cであった (Fig. 2C)。また、熱安定性を検討したところ、prLysOX は50°C, 30分間の熱処理で失活した。一方、LysOX は60°C, 30分間まで優れた安定性を示し (Fig. 2D), L-Lys に対する k_{cat}/K_m 値 (触媒効率) も prLysOX と比較して200倍以上高い値を示したため (Table 1), 成熟化により活性と熱安定性が大幅に上昇することが示された。Fig. 2E に示したように、組換え LysOX は、ネイティブ酵素と同様に L-Lys に対して厳格な基質特異性を示した。また prLysOX も、活性は低いものの LysOX と同様に基質特異性は厳格であった。

LysOX の X線結晶構造解析

筆者らはこれまでに、*T. viride* で発現させたネイティブ酵素及び *S. lividans* 発現の組換え LysOX-基質複合体の X線結晶構造解析に基づき、LysOX の構造的特徴を明らかにした^{9,11)}。

LysOX は非対称単位に2分子存在しており (Fig. 3A)、サブユニットは FAD 結合ドメイン、基質結合ドメイン、ヘリカルドメインの3つのドメインから構成されている

(Fig. 3B)。その構造を見ると、活性中心への入口付近における酸性残基数と塩基性残基数は、低基質特異性の *Calloselasma rhodostoma* 由来 LAAO (CrLAAO)¹⁴⁾ で7:8であり (Fig. 4A)、ほぼ同じ割合で存在していた。また、LGOX では6:8と塩基性残基が多かった (Fig. 4B)。これに対して LysOX では10:5と酸性残基が多く存在し (Fig. 4C)、入口付近に偏って分布していたことから、入口付近の電荷によって基質の選択が行われることが示唆された⁹⁾。

活性中心の構造を、低基質特異性の蛇毒由来 CrLAAO や *Rhodococcus opacus* 由来 LAAO (RoLAAO)¹⁵⁾、高基質特異性 LGOX^{6,7)} と比較したところ (Fig. 5AB)、基質 L-Lys の α -カルボキシ基や α -アミノ基と相互作用する Arg68 や Tyr369, Trp476 等の残基は、共通して存在していた。基質の ϵ 位アミノ基は、Asp212の側鎖カルボキシ基と直接、Asp315の側鎖カルボキシ基および Ala440の主鎖カルボキシ基と水分子を介して相互作用していた。また、基質が結合すると Trp371の側鎖インドール環が基質に向かって動き、活性中心への経路を塞いでいた (Fig. 6)。LGOX の活性中心にも構造的にほぼ同じ位置

Table 1 Kinetic parameters of LysOX and LysOX mutant variants for L-lysine¹¹⁾

	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ · s ⁻¹)
Recombinant LysOX from <i>S. lividans</i> transformant	1.3×10^{-2}	59.1	4.5×10^3
Recombinant LysOX from <i>E. coli</i> transformant	1.3×10^{-2}	65.5	5.0×10^3
prLysOX	0.28	6.1	22
D212A LysOX	0.56	26.4	47
D315A LysOX	0.28	24.3	87
D212A/D315A LysOX	7.6	17.0	2.2

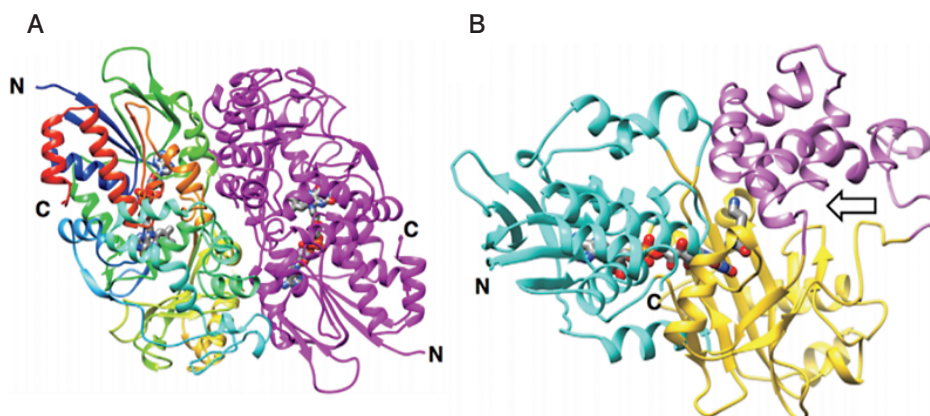


Fig. 3 Crystal structure of LysOX in complex with L-lysine (LysOX-Lys)¹¹⁾.

(A) Homodimeric structure of LysOX-Lys. (B) A single subunit structure of LysOX-Lys. The domain structure is depicted in different colors: cyan, the FAD-binding domain; yellow, the substrate-binding domain; magenta, the helical domain. FAD and the substrate L-lysine are shown in stick model.

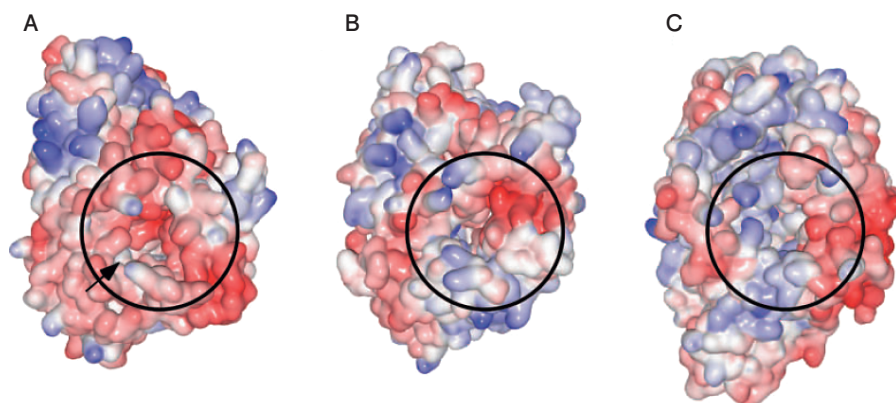


Fig. 4 Electrostatic potential surface of LysOX.⁹⁾

Electrostatic potential surface of LysOX (A), CrLAAO (PDB : 2IID) (B) and LGOX (PDB : 2E1M) (C). The surface of the entrance to the active site is indicated by the circles.

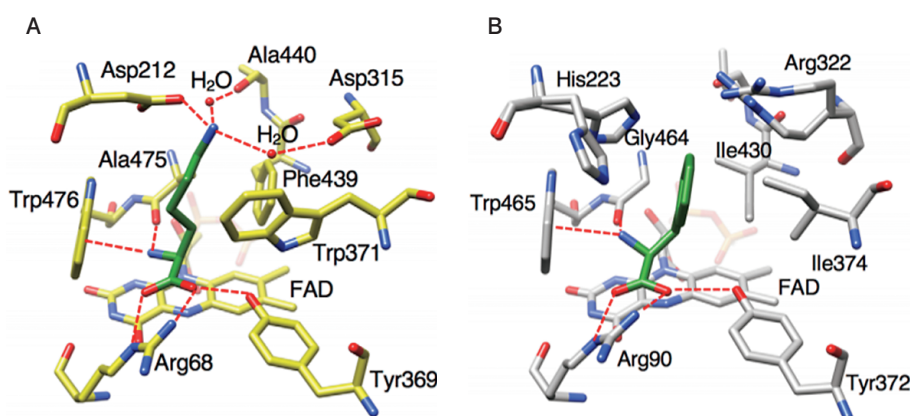


Fig. 5 Comparison of the substrate-binding site structure of LysOX with that of CrLAAO¹¹⁾.

(A) The substrate-binding site structure of LysOX-Lys. (B) The substrate-binding site structure of CrLAAO-Phe (PDB : 2IID). Possible hydrogen bonds are indicated by red broken lines.

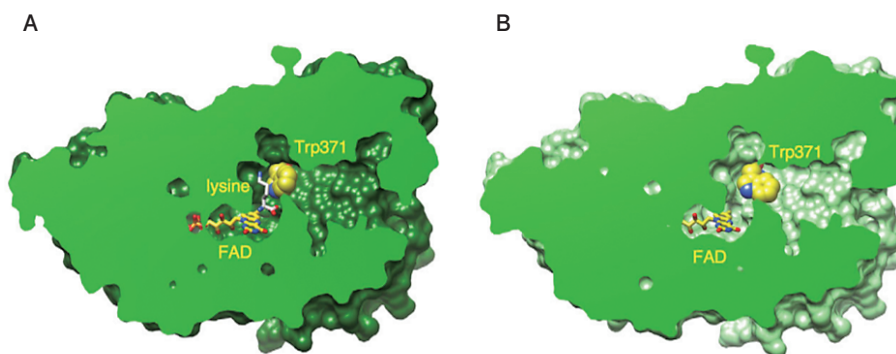


Fig. 6 Structural change induced by the substrate binding¹¹⁾.

(A) Vertical section of the LysOX-Lys surface model. Trp371 blocks the path to the active site. (B) Vertical section of the ligand-free LysOX surface model.

に存在する Trp 残基を始めとして、高基質特異性の LysOX や LGOX では、低基質特異性 LAAO とは異なり、疎水的で嵩高い側鎖を持つ残基が活性中心に多く存在していた。

LysOX の成熟化機構の解析

先に述べた通り、LysOX は大腸菌において617残基から成る活性の低い前駆体として発現し、プロテアーゼに

よりN末端側77残基 (Met1-Arg77) が切断されると高活性を示す成熟体になる。LysOX の他にも、LGOX や *Pseudomonas* sp. P-501 由来 L-フェニルアラニンオキシダーゼ等、幾つかの LAAO は前駆体として発現し、その後プロテアーゼによる切断を受け活性化されるが^{5,16,17,18}、その分子機構については不明な点が多い。そこで、prLysOX のプロペプチドによる活性阻害と切断による活性化機構を明らかにするため、LysOX 前駆体の X線結晶構造解析を行った (Fig. 7)¹²。

その結果、LysOX 前駆体ではプロペプチド部分がヘリックス構造を形成し (Fig. 7 AB)、基質認識に重要な Asp289 (成熟体では Asp212) 残基を含むヘリックスの位置が移動することで、Asp289は活性中心から離れた位置に存在していた (Fig. 7 BC, Fig. 8)。Asn273-Phe283 のループ構造に含まれる Thr276は、基質 L-Lys の ϵ 位アミノ基と Asp392 (成熟体では Asp315) との相互作用を介する水分子が存在する位置に存在していた (Fig. 8)。このように、プロペプチドが間接的に活性中心の構造形

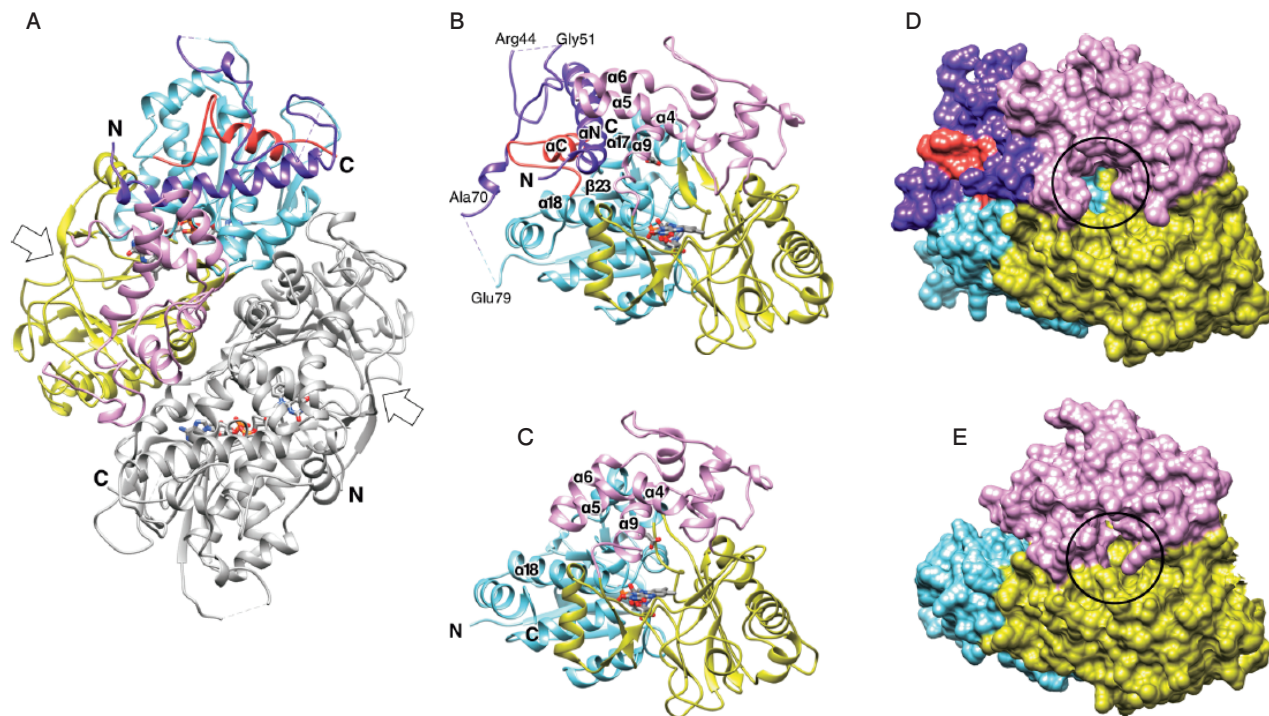


Fig. 7 Crystal structure of prLysOX¹².

(A) Ribbon representation of the prLysOX dimer. (B) Ribbon diagrams of a single subunit of prLysOX. (C) Ribbon diagrams of a single subunit of LysOX. (D) Surface representations of a single subunit of prLysOX. (E) Surface representations of a single subunit of LysOX. FAD and Asp289 are shown by stick in (B) and (C). The domain structure is depicted in different colors: cyan, the FAD-binding domain; yellow, the substrate-binding domain; magenta, the helical domain; purple, the propeptide region; red, the C-terminal region. The entrance of the funnel is shown by white arrow in (A) and black circle in (D) and (E).

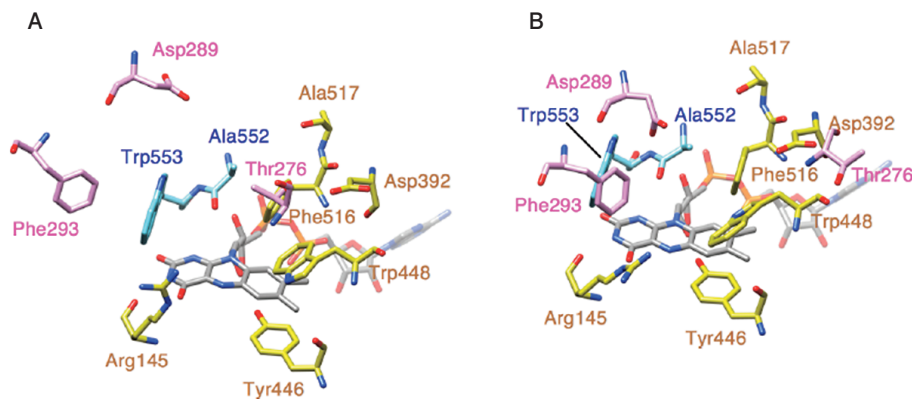


Fig. 8 Structural comparison of substrate-binding site of prLysOX (A) and LysOX (B)¹².

成に関与するという、酵素活性の抑制及び成熟化機構が明らかとなった。また、プロペプチドをコードする遺伝子領域を除いて LysOX の組換え発現を試みたが、いずれも活性型タンパク質として発現させることができなかった。しかし、完全長の LysOX 遺伝子を導入した場合は発現に成功しており^{9,11)}、LysOX のプロペプチドは分子内シャペロンとして機能し、適切なフォールディングを補助する役割を果たしている可能性が高いことが分かった。

LysOX の基質認識機構の解析

基質複合体の X 線結晶構造解析で明らかになった活性中心構造 (Fig. 5) に存在する Asp212 及び Asp315 残基の基質認識への寄与を検討するため、確立した大腸菌発現系を用いて、D212A, D315A, D212A/D315A の変異酵素を作製し、諸性質を検討した。

Table 1 に示した通り、D212A, D315A 変異 LysOX

の L-Lys に対する K_m 値は 1 桁上昇し、 k_{cat} 値は 2 分の 1 以下の値を示したことに伴い触媒効率は 2 桁低下したが、基質特異性に大きな影響は無かった (Fig. 9)。一方で、D212A/D315A 二重変異 LysOX では、触媒効率が 2,000 分の 1 程度に減少した (Table 1)。基質特異性に関しては、L-Lys に対する相対活性が激減し、大変興味深いことに、新たに芳香族アミノ酸類に対して高い活性を獲得していた (Fig. 9)¹¹⁾。

この要因を探るため、D212A/D315A 二重変異 LysOX と基質 L-Tyr 複合体の X 線結晶構造解析を行った。その活性中心構造をみると (Fig. 10)、Asp212 と Asp315 を Ala に置換したことで活性中心の空間が広がっていた。そのため、高側鎖を持つ芳香族アミノ酸が入りやすくなったと考えられる。また、基質 L-Tyr の芳香環と Ala475 のメチル基が CH/ π 相互作用できる距離に位置しており、これが芳香族アミノ酸に対する活性の獲得に関与することが示唆された¹¹⁾。

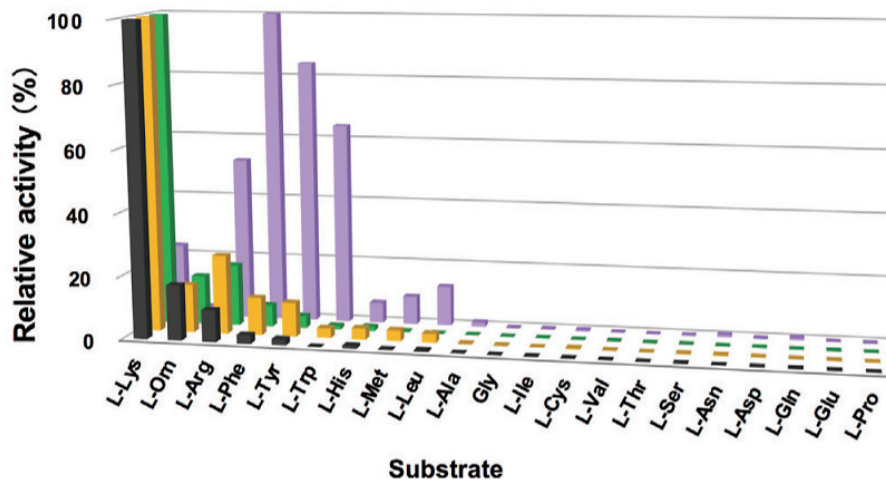


Fig. 9 Comparison of substrate specificity profiles of LysOX and its variants¹¹⁾.

Relative activities of LysOX, D212A, D315A, and D212A/D315A LysOX are indicated in black, yellow, green, and purple bars, respectively. The substrate that showed the highest activity was set as 100% relative activity. Enzyme activities were measured with 1 mM substrates at 40°C and pH 7.4.

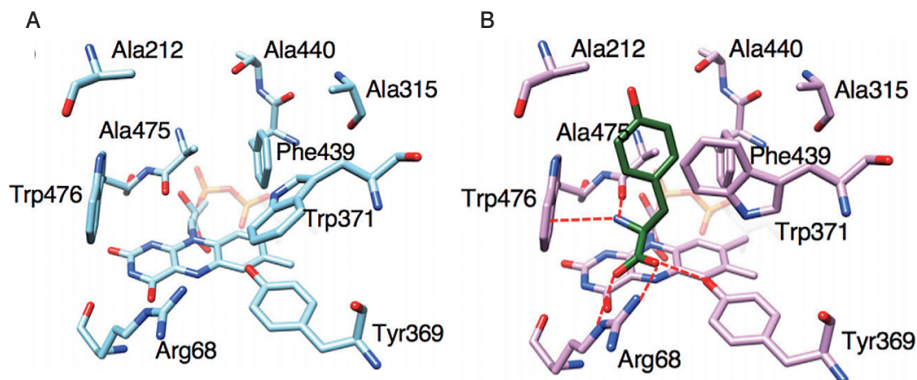


Fig. 10 Structures of substrate-binding site of D212A/D315A LysOX (A) and its L-Tyr complex (B)¹¹⁾.

以上に示した通り, LysOX の X 線結晶構造解析と Asp212, Asp315両残基への変異導入実験により, 活性中心への入口の酸性環境と, 活性中心において疎水性残基により形成された狭い隙間, Asp212, Asp315, Ala440 と 2つの水分子により基質の ϵ 位アミノ基との間で形成される水素結合ネットワークが LysOX の高い触媒効率と厳格な基質特異性に寄与している事が明らかとなった¹¹⁾. また, D212A/D315A 二重変異 LysOX が芳香族アミノ酸オキシダーゼと言える酵素に変化した構造的な要因も判明したことから, 基質特異性を人為的に改変した LysOX の作製が可能であることが明らかとなった.

おわりに

上述のように, 筆者らは LysOX の多面的な性質と立体構造の特徴を明らかにした. 今後は, 遺伝子工学的手法を用いて更なる基質特異性改変酵素の創製を行うとともに, 反応速度論的性質を改変, 制御してユニークな触媒機能を持つ新しい酵素の創出にも挑戦したい.

文 献

- Pollegioni L, Piubelli L, Sacchi S, Pilone MS and Molla G : Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans. *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**, 1373-1394 (2007)
- Izidoro LFM, Sobrinho JC, Mendes MM, Costa TR, Grabner AN, Rodrigues VM, Saulo L. da Silva, Zanchi FB, Zuliani JP, Fernandes CFC, Calderon LA, Stábeli RG and Soares AM : Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. *BioMed. Res. Int.*, doi.org/10.1155/2014/196754 (2014)
- Pollegioni L, Motta P and Molla G : L-Amino acid oxidase as biocatalyst: a dream too far? *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 9323-9341 (2013)
- Kusakabe H, Kodama K, Kuminaka A, Yoshino H, Misono H and Soda K : A new antitumor enzyme, L-lysine α -oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties. *J. Biol. Chem.*, **255**, 976-981 (1980)
- Arima J, Tamura T, Kusakabe H, Ashiuchi M, Yagi T, Tanaka H and Inagaki K : Recombinant expression, biochemical characterization and stabilization through proteolysis of an L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. *J. Biochem.*, **134**, 805-812 (2003)
- Arima J, Sasaki C, Sakaguchi C, Mizuno H, Tamura T, Kashima A, Kusakabe H, Sugio S and Inagaki K : Structural characterization of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. *FEBS. J.*, **276**, 3894-3903 (2009)
- Utsumi T, Arima J, Sakaguchi C, Tamura T, Sasaki C, Kusakabe H, Sugio S and Inagaki K : Arg305 of *Streptomyces* L-glutamate oxidase plays a crucial role for substrate recognition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 951-955 (2012)
- Kusakabe H, Kodama K, Kuminaka A, Yoshino H and Soda K : Effect of L-lysine α -oxidase on growth of mouse leukemic cells. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 387-392 (1980)
- Amano M, Mizuguchi H, Sano T, Kondo H, Shinyashiki K, Inagaki J, Tamura T, Kawaguchi T, Kusakabe H, Imada K and Inagaki K : Recombinant expression, molecular characterization and crystal structure of antitumor enzyme, L-lysine α -oxidase from *Trichoderma viride*. *J. Biochem.*, **157**, 549-559 (2015)
- Fung J, Seki T and Maeda H : Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **61**, 290-302 (2009)
- Kondo H, Kitagawa M, Matsumoto Y, Saito M, Amano M, Sugiyama S, Tamura T, Kusakabe H, Inagaki K and Imada K : Structural basis of strict substrate recognition of L-lysine α -oxidase from *Trichoderma viride*. *Protein Sci.*, **84**, 927-935 (2020)
- Kitagawa M, Ito N, Matsumoto Y, Saito M, Tamura T, Kusakabe H, Inagaki K and Katsumi Imada : Structural basis of enzyme activity regulation by the propeptide of L-lysine α -oxidase precursor from *Trichoderma viride*. *J. Struct. Biol. X.*, **5**, 100044 (2021)
- 稲垣賢二, 日下部均, L-リシン α -オキシダーゼの製造方法, 特許第6821155号, 2021-01-08.
- Moustafa IM, Foster S, Lyubimov AY and Vrieland A : Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: insights into structure and mechanism. *J. Mol. Biol.*, **364**, 991-1002 (2006)
- Faust A, Niefind K, Hummel W and Schomburg D : The structure of a bacterial L-amino acid oxidase from *Rhodococcus opacus* gives new evidence for the hydride mechanism for dehydrogenation. *J. Mol. Biol.*, **367**, 234-248 (2007)
- Ullah A : Structure-function studies and mechanism of action of snake venom L-amino acid oxidases. *Front. Pharmacol.*, **11**, 110 (2020)
- Takatsuka H, Sakurai Y, Yoshioka A, Kokubo T, Usami Y, Suzuki M, Matsui T, Titani K, Yagi H, Matsumoto M and Fujimura Y : Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1544**, 267-277 (2001)
- Geueke B and Hummel W : A new bacterial L-amino acid oxidase with a broad substrate specificity: purification and characterization. *Enzyme. Microb. Technol.*, **31**, 77-87 (2002)