

微生物のグアニジノブチラーゼ：結合2価金属による基質特異性の変化

荒川 憲昭, 老川 典夫, 左右田 健次

(関西大学工学部生物工学科 生体分子工学研究室*)

Bacterial Guanidinobutyrase: Variation of substrate specificity by bound divalent metal ions

Noriaki ARAKAWA, Tadao OIKAWA, Kenji SODA

Laboratory of Biomolecular Engineering, Department of Biotechnology

Faculty of Engineering, Kansai University

Guanidinobutyrase purified from *Arthrobacter* sp. does not contain Mn^{2+} , but about 1.0 mol of Zn^{2+} per mol of subunit. The enzyme was completely inactivated by 1,10-phenanthroline. The inactivated enzyme was markedly reactivated by incubation with Zn^{2+} or Co^{2+} . The replacement of Zn^{2+} by Co^{2+} resulted in significant changes in V_{max} values without any change in the K_m values for substrates, 4-guanidinobutyrate and D-arginine. The results suggest that the main function of the metal ion is not in binding of substrate to the enzyme, but is in the hydrolysis of the substrate. The reconstituted enzymes with Co^{2+} (Co^{2+} -enzyme) showed a different substrate specificity from that of Zn^{2+} -enzyme. The predicted amino acid sequence of the enzyme consists of three regions of high homology to Mn^{2+} -dependent amidinohydrolases as agmatinase of *Escherichia coli*, and arginases of *Bacillus subtilis* and rat liver.

グアニジノ化合物を尿素とアミノ化合物へ加水分解する反応を触媒するアミジン加水分解酵素は、主に Mn^{2+} で活性化することが知られており¹⁻⁷⁾、中でもL-アルギナーゼ (L-arginine amidinohydrolase, EC 3.5.3.1) は自然界に広く存在する。これらの中で種々のL-アルギナーゼやアグマチナーゼ (agmatine ureohydrolase, EC 3.5.3.11) はすでにクローニングされ、そのほとんどが Mn^{2+} 要求性アミジン加水分解酵素であり、これらの推定アミノ酸配列は各々部分的に高い相同性を示す⁸⁾。このため、これらの酵素は共通の起原から分岐し、異なる基質特異性を持って進化したと考えられている⁵⁾。現在、L-アルギナーゼ分子と反応速度論的性質に関する研究が報告され⁹⁾、さらにラット肝臓L-アルギナーゼの3次元結晶構造が明らかになり、 Mn^{2+} が関与したL-アルギニン加水分解の反応機構が予測された¹⁰⁾。

一方、グアニジノブチラーゼ (4-guanidinobutyrate amidinohydrolase, EC 3.5.3.7) については *Pseudomonas* 属細菌^{1,2)} やコリネ型細菌での存在¹¹⁾ が知られており、爬虫類や鳥類の肝臓においてもその活性が認められている⁴⁾。これらの酵素もまた、コリネ型細菌の *Brevibacterium* 由来グアニジノブチラーゼが活性に Zn^{2+} を必要とする⁷⁾ ことを除いて、 Mn^{2+} 要求性酵素である。しかし、グアニジノブチラーゼの金属イオンや一次構造については不明なままである。

我々が土壌より単離したD-アルギニン資化性菌 *Arthrobacter* sp. KUJ 6802 から精製したグアニジノブチラーゼは Mn^{2+} を要求しなかった。本研究では本酵素の一次構造を明らかにし、本酵素の触媒過程における金属イオンの役割を解明することを目的としている。

*所在地：吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

実験方法

1) 活性測定法

酵素反応は60 mM CHES-NaOH緩衝液 (pH9.0) を用いて37℃で行い、生成する尿素をチオセミカルバジド-ジアセチルモノオキシム法により定量した。

2) 1,10-フェナンスロリン処理酵素の調製

酵素を15 mM 1,10-フェナンスロリンを含んだ20 mMリン酸緩衝液 (pH6.0) 中で37℃, 70分間インキュベートした後、透析により1,10-フェナンスロリンを除去した。

3) 酵素の再構築

アポ酵素を20 μ M ZnCl₂または100 μ M CoCl₂と共に37℃で20分間インキュベートした後、遊離する金属イオンを透析によって除去した。得られた再構築酵素をそれぞれZn²⁺-酵素, Co²⁺-酵素とした。

4) アミノ酸配列の決定

本酵素のN末端酸配列及びトリプシン消化断片のアミノ酸配列に基づいてプライマーを設計しPCRを行い、塩基配列を求めた。

結果及び考察

本酵素は、1,10-フェナンスロリンと共にインキュベートすることによって、99%以上失活したが、Zn²⁺を添加することにより活性が回復した (Table 1)。Zn²⁺の他、Co²⁺でも活性は回復し、またわずかではあるがMn²⁺, Ni²⁺によっても活性の回復が見られた。しかし、グアニジノ酪酸への反応、D-アルギニン及びL-アルギニンへの反応とで見た場合、Co²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺を添加した場合、それぞれの相対活性は大きく異なった。Zn²⁺の場合のみ各々の基質に対して

Table. 1 Effect of divalent metal ions on 1, 10-phenanthroline-treated enzyme

Metal Ion	Conc. (mM)	Relative Activity (%)		
		4-GB	D-Arg	L-Arg
Before treatment		100	100	100
None		0	0	0
ZnCl ₂	0.02	146	150	151
ZnCl ₂	0.1	51	51	49
CoCl ₂	0.1	64	320	490
MnCl ₂	0.1	28	12	10
NiCl ₂	0.1	13	83	163
FeSO ₄	0.1	0	0	0
MgCl ₂	0.1	0	0	0
CaCl ₂	0.1	0	0	0
CuCl ₂	0.1	0	0	0

The enzyme activities were measured after incubation of the 1,10-phenanthroline-treated enzyme with the various metal ions at 37℃ for 30min. GB: Guanidinobutyrate

の活性が等しいことから、本酵素は元来Zn²⁺を含んでいることが示唆された。

これを明確にするために原子吸光分析を行った。本酵素は、1サブユニットにつき約1原子のZn²⁺を含んでおり、1,10-フェナンスロリン処理によりZn²⁺を失い、かつ失活したことから、Zn²⁺は本酵素の補因子であり、1,10-フェナンスロリン処理酵素は本酵素のアポ酵素である (Table. 2)。Zn²⁺-酵素, Co²⁺-酵素として酵素を再構築すると、各々金属イオンを再び1サブユニットにつき約1原子づつ取り込み、活性も回復した。反応速度論的解析の結果、Zn²⁺-酵素, Co²⁺-酵素のグアニジノ酪酸とD-アルギニンへのK_m値はほぼ等しいがV_{max}値は大きく異なった。従って、結合金属の違いは基質との親和性に関与せず、主な役割は基質の結合ではなく、基質の加水分解にあると考えられる。

Table. 2 Effect of 1,10-phenanthroline-treatment and reconstitution of enzyme on metal content and kinetic properties

	Metal Contents (atom/subunit)	Specific Activity (U/mg)		Km (mM)		Vmax (μ mol/min/mg)	
		4-GB	D-Arg	4-GB	D-Arg	4-GB	D-Arg
Native Enzyme	0.82(Zn), <0.001 (Co)	160	8.6	2.1	22	182	17.8
o-Phe-treated Enzyme	0.0062(Zn), <0.001 (Co)	<0.1	<0.01	—	—	—	—
Zn ²⁺ -Enzyme	1.03(Zn), <0.001 (Co)	140	6.6	2.3	22	166	16.7
Co ²⁺ -Enzyme	1.12(Co), 0.0041 (Zn)	76	18	1.7	18	72.8	78.1

GB : Guanidinobutyrate, o-Phe : 1,10-Phenanthroline

Table. 3は本酵素と再構築酵素の基質特異性を調べた結果である。本酵素（野生型）はグアニジノ酪酸に最も良く働き、低い速度ながらD-アルギニン、3-グアニジノプロピオン酸にも働いた。野生型酵素とZn²⁺-酵素はほぼ同じ基質特異性を示した。この結果は野生型酵素はZn²⁺を含むことを支持している。Co²⁺-酵素は相対的に異なった基質特異性を示した。この原因は、本酵素のZn²⁺がCo²⁺に置換されると活性部位に歪みが起きて、基質特異性の変化が起きると考え

Table. 3 Substrate specificities of the native enzyme and the reconstituted enzymes

Substrate (20mM)	Relative Activity (%)		
	Native Enzyme	Zn ²⁺ -Enzyme	Co ²⁺ -Enzyme
D-Homoarginine	0.6	0.57	1.3
6-Guanidinocaproate	0.32	0.32	12
L-Homoarginine	0.26	0.21	0.50
D-Arginine	5.4	4.7	24
5-Guanidinovalerate	1.4	1.6	37
L-Arginine	0.92	0.92	14
4-Guanidinobutyrate	100 (160U/mg)	100 (140U/mg)	100 (76U/mg)
3-Guanidinopropionate	2.1	2.4	30
L-2-Amino-3-guanidinopropionate	0	0	0
Guanidinoacetate	0	0	0
L-Canavanine	0.57	0.59	5.2
Agmatine	0.70	0.83	7.4
Taurocyamine	0.48	0.48	4.5
Creatine	0	0	0

ているが、このことについてはさらに詳細な検討が必要である。

多くのアミジン加水分解酵素は、その活性にMn²⁺を要求し^{1,7)}、Mn²⁺はそれらの酵素と比較的弱く結合していると考えられる^{6,12)}。このMn²⁺要求型酵素の多くはCo²⁺やNi²⁺でも活性を示すが^{6,7)}、Zn²⁺は効果的な賦活剤とはならない^{2,3,6,7)}。本酵素*Artrobacter* sp.のグアニジノブチラーゼの他に、本菌と同じコリネ型細菌である*Brevibacterium*のグアニジノブチラーゼ¹¹⁾、*Flabobacterium*のグアニジノ酪酸アミノヒドロラーゼ¹²⁾、は活性にMn²⁺を要求せず、Zn²⁺結合型である。結合しているZn²⁺は容易に除去できず、固く結合していると考えられる。Zn²⁺結合型はMn²⁺要求型に比べ、基質特異性が比較的に広い特徴が見られる (Table 4)。

クローニングした本酵素遺伝子から推定されるアミノ酸配列は、*Streptomyces coelicolor*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*のアグマチナーゼと高い相同性 (45~77%) を示し、種々のL-アルギナーゼとの相同性は26%以下であった。1998年にラット肝臓アルギナーゼの結晶構造が解析され、Mn²⁺の結合部位が明らかになった¹⁰⁾。ラット肝臓アルギナーゼは2原子のMn²⁺が4つのアスパラギン酸と2つのヒスチジンに配位することで、完全に活性化される。そのMn²⁺結合に関与する配列は全てのアミジン加水分解酵素によく保存されており、本酵素の場合もまた、1原子のZn²⁺と結合しているにも関わらず、その配列は保存されていた (Fig. 1)。詳細はさらに検討が必要であるが、Mn²⁺とZn²⁺の選択性とその結合原子数は、結合に関わるアミノ酸残基には関係なく、直接関与していないアミノ酸残基が関

係しているのと考えている。グアニジノブチラーゼとして、そして Zn^{2+} 結合型アミジン加水分解酵素としての一次構造の報告は本研究が初めてである。

Table. 4 Comparison of substrate specificities of various amidinohydrolases

Substrate	Relative Activity (%)					
	<i>Arthrobacter</i> Zn^{2+} GBH	<i>Brevibacterium</i> Zn^{2+} GBH	<i>Pseudomonas</i> sp. Mn^{2+} GBH	<i>Pseudomonas putida</i> Mn^{2+} GBH	<i>Flavobacterium</i> Zn^{2+} GAH	<i>Pseudomonas</i> sp. Mn^{2+} GAH
6-Guanidinocaproate	0.32	0	7	6	—	—
L-Homoarginine	0.26	—	0	0	—	—
5-Guanidinovalerate	1.4	1.5	5	11	—	—
D-Arginine	5.4	2.9	0	0	—	—
L-Arginine	0.92	0.62	0	0	0	0
4-Guanidinobutyrate	100	100	100	100	9	0
3-Guanidinopropionate	2.1	0.94	0	0	19	0
L-Canvanine	0.57	1.0	0	0	—	—
Guanidinoacetate	0	0	0	0	100	100
Agmatine	0.70	0	—	—	0	0

GBH : Guanidinobutyrase, GAH : Guanidinoacetate amidinohydrolase

ARTHRO-GBH	¹	MEERNIEANGNLPIDSSRIPTAGATYARLP-RLDQAS-KADVTVVGVPPDGVSYRP---G	⁵⁹
STCOEL-AUH		---MN-ETPR---GVPDSSRIPTAGPATFARLP-RLDEVG-ADVAVVGVPPDGVSYRP---G	
PSAERU-AUH		-----MNDHPQLDAAEIPRFAQIPTFMRLP-AFTDPAALQVGLI-GVPWDGCTNRA---G	
ESCOLI-AUH		-----MTLGHQYDNSLVSNAPG---FLRLPMNFQPYDSADWVITGVPPDGVATSGRA---G	
BACSUB-ARG		-----MDKTISVIGMPMDLQARRGGDMG	
RATLIV-ARG		-----MSSKPKPIEIIIGAPFSKGQPRGGVEKG	
ARTHRO-GBH	⁶⁰	--A-RF-GAMEVREASRLRPYNPANDVSFFENIQ--VADAGDI--AVHFFNINEAETIQNA	¹¹⁵
STCOEL-AUH		--A-RF-GGWAIRESRLRPYNPAQDASFFALAQ--VADGGDI--AVHFFNINEAETIEAAA	
PSAERU-AUH		--A-RH-GPREVNLSLNRKVHVSR-IAPYDLVR-VGDLGDI--PVHPIID	
ESCOLI-AUH		--G-RH-GPAAIRQVSTNLAWENRFPWNFDMRERLNVVDCGDI--VYAFGDAREMSEKLQAH	
BACSUB-ARG		PSAIRYAHLEIRLSDMGYT--VEDLGD--PINREKIKNDEELKN	
RATLIV-ARG		PAALRKAGLVEKLKETEYN--VRDHGDLAFVDVFNDSPPQIVC---KN	
ARTHRO-GBH	¹¹⁶	LDLTA-----NOSKLV-TLGGDETIALLRAAAERAGEPIAML-HF-DARLDFW	¹⁶²
STCOEL-AUH		DDLIG-----TGARLM-TLGGDETIALLRSVAKKHG-PVALL-HF-DARLDFW	
PSAERU-AUH		--LLDSLRRIRGFYRQVHAAGT-LPLSVGGDE---LPFIFRALGRER--PLGM-VHF-DARSDFN	
ESCOLI-AUH		EKLLAA-----GKRML-SFGGDEPVTLFLLRAHAK-HF-GKMLVHF-DARTDFY	
BACSUB-ARG		LRSVGKANEQLAAVVAETQKNGTISVVLGGDESMATGSI SGHARVHPD-IC--VIWVDARTDIN	
RATLIV-ARG		PNSVLAGNEKLAQKVNKVIIEKKFPLV-LGGDESLAIGTLGTAH-HYDNLG--VIWVDARTDIN	
ARTHRO-GBH	¹⁶³	DTYFGAE-YTHGTFFRAVEEGIL-----DTEAISHVGTROPLYGKKDLDDHR	²¹⁰
STCOEL-AUH		DTYFGAE-YTHGTFFRAVEEGVL-----DTSALSHVGTROPLYGKKDLTDDER	
PSAERU-AUH		DRYFGDNPTHTGTFFRAIEKGLI-----DPLRTVQIGIRGSVI	
ESCOLI-AUH		ANGCEFD--HGTHTFYTAPEGLI-----DPNHSVQIGIRTEPDKDNGFTVLD	
BACSUB-ARG		TLETSPSGNIGHMPLAVSLGIGHESLVNLEGYA--PKIKPENNVIIIGAR	
RATLIV-ARG		TPLTSSSGNLGGQVAFLLKELKGFDPDVPFWSVTPCISAKDIVYIGLR	
ARTHRO-GBH	²¹¹	FGFGIVTSADEYYQ-----GVLETVAKIRDRI-G--NRPLYISVIDVDLD	²⁵²
STCOEL-AUH		MGFGIVTSADEYYR-----GADEIADQLRQRI-G--DRPLYISVIDDCLD	
PSAERU-AUH		-----SPDDDAFARECGIRVIHMEEFVEL--GVEATLAEARRVV-G--AGPTTVFSDVDLD	
ESCOLI-AUH		ACQVNDRSVDDVIAQ-VKQI-V-----G--DMFVYLFDIDCLD	
BACSUB-ARG		-----SLDEGERKYIKESGMKVYTMHEIDRLGMTKVIETLDY-LSACDG-VHLSLDLDGLD	
RATLIV-ARG		-----DVDPGEHYIIKTLGIKYFSMTEDVKLGIGKVMETFSYLLGRKKRPIHLDFDDVGLD	
ARTHRO-GBH	²⁵³	PAHAPGTGTPEAGGITS-RE-LLEIIRGFRGMVLGADVVELAFAYDHAETGVAGSHVAYELV	³⁰⁴
STCOEL-AUH		PAHAPGTGTPEAGGITS-RE-LLEIIRGLASCHLVSDVVELAFAYDHAETSVAAAS	
PSAERU-AUH		PAHAPGTGTPEIGGITS--LQAQQLVRGLRGLDLVGADVVELSPPFDVGGATALVGATMFPELL	
ESCOLI-AUH		PAHAPGTGTPEIGGITS--DRAIKLVRLKDLIVGMDVVELAFAYDQSEITALLAATLAEML	
BACSUB-ARG		PNDAPGVGTFPVGGI--SYRESHLAMENLYDAGIITSAEFVEVNFILDEKNKTOKTAVELVESLL	
RATLIV-ARG		VFVTPATGTFPVGGI--SYREGLYITEIYKTGLLSOLDIMVNETLTKTPEEVTRIVNTAV-AL	
ARTHRO-GBH	³⁰⁵	TLHADNAVEGDRHGAPNGYAQQALGARIQEVAAIGGQR-----	³⁵³
STCOEL-AUH		CLLAESAARSA-----	³⁰²
PSAERU-AUH		Y-I-QAAKGE-----	³¹⁸
ESCOLI-AUH		GKKLL-----	³⁰⁶
BACSUB-ARG		TLSCFGTKRGNHNPETDYLKPPK-----	²⁹⁶
RATLIV-ARG			³²³

Fig. 1 Comparison of amino acid sequence of the enzyme (ARTHRO-GBH) with those of *Streptomyces coelicolor* agmatinase (STCOEL-AUH), *Pseudomonas aeruginosa* agmatinase (PSAERU-AUH), *Escherichia coli* agmatinase (ESCOLI-AUH), *Bacillus subtilis* arginase (BACSUB-ARG), and Rat liver arginase (RATLIV-ARG). Gaps were introduced to increase the similarities; matching amino acids are boldface; similar sequence are boxed; asterisk indicates assumed Mn^{2+} binding residue; G indicates assumed guanidino group binding residue.

参考文献

- 1) Chi-Su Chou and Victor W. Rodwell (1972) J. Biol. Chem. 247 : 4486 - 4490.
- 2) Takamitsu Yorifuji, Masashi Kato, Tohru Kobayashi, Sinzo Ozaki and Shigenori Ueno (1980) Agric. Biol. Chem. 44 : 1127 - 1134.
- 3) Takamitsu Yorifuji, Hiroko Tamai and Hideaki Usami (1977) Agric. Biol. Chem. 41 : 959 - 966.
- 4) J. Mora, Rebeca Tarrab, J. Martuscelli and G. Soberon (1965) Biochem. J. 96 : 588 - 594.
- 5) Nelson Carvajal, Vasthi Lopez, Monica Salas, Elena Urive, Paula Herrera, and Juan Cerpa (1999) Biochem. Biophys. Res. Com. 258 : 808 - 811.
- 6) Susan M. Green, Ann Ginsburg, Marc S. Lewis and Preston Hensley (1991) J. Biol. Chem. 266 : 21474 - 21481.
- 7) Kumiko W. Shimotohno, Junko Iida, Naomi Takizawa, and Toyoshige Endo (1994) Biosci. Biotech. Biochem. 58 : 1045 - 1049.
- 8) Christopher P. Jenkinson, Wayne W. Grody and Stephen D. Cederbaum (1996) Comp. Biochem. I 114B : 107 - 132.
- 9) Nelson Carvajal, Elena Urive, Paula Herrera and Claudio Torres (1994) Comp. Biochem. Physiol. 109B : 683 - 689.
- 10) Sergei V. Khangulov, Thomas M. Sossong, Jr., David E. Ash, and G. Charles Dismukes (1998) Biochemistry 37 : 8539 - 8550.
- 11) Takamitsu Yorifuji, Eiichi Shimizu, Hiroshi Hirata, Kan Imada, Toshiaki Katsumi and Shin'ichi Sawamura (1992) Biosci. Biotech. Biochem. 56 : 773 - 777.
- 12) Takamitsu Yorifuji, Nobuo Komaki, Kiyoshi Oketani and Etszo Entani (1979) Agric. Biol. Chem. 43 : 55 - 62.