

***Streptomyces* sp. X-119-6由来 L-グルタミン酸オキシダーゼの クローニング及び発現**

有馬 二郎¹⁾, 崎川 智代¹⁾, 田村 隆¹⁾, 芦内 誠²⁾,
八木 年晴²⁾, 日下部 均³⁾, 田中英彦¹⁾, 稲垣 賢二¹⁾
(¹⁾岡山大学農学部*, ²⁾高知大学農学部**, ³⁾ヤマサ醤油株式会社***)

Cloning of an L-Glutamate Oxidase Gene from *Streptomyces* sp. X 119-6 and its Expression in *Escherichia coli*

Jiro ARIMA¹⁾, Hitoshi KUSAKABE³⁾, Makoto ASHIUCHI²⁾, Toshiharu YAGI²⁾,
Takashi TAMURA¹⁾, Hidehiko TANAKA¹⁾, and Kenji INAGAKI¹⁾

¹⁾Department of Bioresources Chemistry, Faculty of Agriculture, Okayama University,

²⁾Research Laboratories, Yamasa Shoyu Co., Ltd.,

³⁾Department of Bioresources Science, Faculty of Agriculture, Kochi University,

Summary

The gene encoding an L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6 was cloned in *Escherichia coli*. The nucleotide sequence of the L-glutamate oxidase gene revealed an open reading frame of 2,103 bp. encoding a 701-amino acid protein. The deduced primary structure shares 15.8% sequence identity with the L-amino acid oxidase, including the consensus amino acid sequence, -GXGXXG-, which is contained in β α β -fold binding the ADP at N-terminal region.

We constructed an expression plasmid (pKK-LGOX) and *E. coli* harboring pKK-LGOX was expressed the L-glutamate oxidase precursor. The molecular mass of precursor was 76 kDa and it has homodimer structure, but an enzyme from *Str.* sp. X-119-6 has $\alpha 2\beta 2\gamma 2$ subunit structure, and it has the different enzymological character with an L-glutamate oxidase from *Str.* sp. X-119-6. To improve of affinity to substrate of an L-glutamate oxidase precursor, enzyme was digested with trypsin and isolated by gel-filtration. Two fragment (58 kDa and 18 kDa) was detected by SDS-PAGE, and its K_m value is 0.2 mM, but precursor's K_m is 5 mM. It is suggested that digesting the enzyme by trypsin is separated the β subunit from precursor, and originated affinity to substrate.

はじめに

L-グルタミン酸は食品の主なうまみ成分である他、体内では脳神経細胞全般にわたり大量に存在し、興奮性の神経伝達物質として働く。また、L-グルタミン酸は接種しすぎることにより、急性神経毒性を示すことが一部で報告があり、その体内における生理活性は、摂取量と非常に密接な関係があることが明らかとなっている。よって血中及び脳内、また食品中のL-グルタミン酸の定量は、医療、食品の分野において重要であるといえる。しかしその定量には、不正確、困難、高価という問題が存在する。そこでL-グルタミン酸を確実に定量、微量検出の可能な酵素として、L-グル

*所在地：岡山市津島中1-1-1 (〒700-8530)

**所在地：高知県南国市物部乙200 (〒783-8502)

***所在地：千葉県銚子市新生町2-10-1 (〒288-0056)

タミン酸オキシダーゼが発見された¹⁾。L-グルタミン酸オキシダーゼはL-グルタミン酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する酵素であり、通常のL-アミノ酸オキシダーゼとは異なり、基質特異性が非常に高く (Table1)、温度、pHに対して安定である。現在 *Streptomyces* sp. X-119-6由来のL-グルタミン酸オキシダーゼを利用した簡便なL-グルタミン酸定量法キットが市販されている。しかし *Str.* sp. X-119-6は通常の液体培養法では本酵素の生産が確認されていない¹⁾ため、ふすま培養 (wheat brain culture) という固体培養法で生育させ、本酵素を分泌させ生産している。しかしこの方法は困難であり、生産は微量である。そこで我々は本酵素の遺伝子のクローニングに試み、遺伝子レベルからの研究を行うとともに、その大量発現系を構築することを目的とした。

Table 1. Substrate specificity of various L-Amino Acid Oxidase.

Substrate	L-Glu oxidase <i>Str. sp. X-119-6</i>	Snake venom	L-Amino Acid Oxidase ⁶⁾ Rat Kidney	<i>Neurospora crassa</i>
L-Glu	100	0.1	0	12
D-Glu	0	—	—	—
L-Gln	0.1	—	—	—
L-Asp	0.6	0.1	0	6
L-Asn	0.6	—	—	—
L-Ala	0	—	—	—
L-Val	0	4	28	8
L-Leu	0	92	100	100
L-Ile	0	29	71	42
L-Met	0	100	81	51
L-Trp	0	—	—	—
L-Phe	0	76	45	53
L-Pro	0	0	77	0
Gly	0	—	—	—
L-Ser	0	0	0	10
L-Thr	0	0	0	3
L-Cys	0	—	—	—
L-Tyr	0	82	40	35
L-His	0	14	9	47
L-Arg	0	7	—	—
L-Lys	0	0.2	0	18

—, not available

実験方法

- 1. 宿主・ベクター** *Str.* sp. X-119-6株はヤマサ醤油株式会社より譲渡していただいた。宿主として、大腸菌 JM109 及び大腸菌 XL1-blue MRF' を使用した。クローニングベクターとして pUC19 及び λ ZAP Express、発現ベクターとして pKK223-3 を用いた。
- 2. L-グルタミン酸オキシダーゼ遺伝子のクローニング** 本酵素精製標品について SDS-PAGE に供した後、PVDF 膜にブロッティングを行った。各サブユニットを切り出し、プロテインシークエンサーに供して、各 N 末端アミノ酸配列を決定した。αサブユニットの N 末端配列の一部 (-N-E-M-T-Y-E-Q-) 及び放線菌のコドン使用頻度を参考にし、プローブ α (5'-AACGAGATGAC (CG) TACGAGC A-3'; 20bp) をデザインした。本酵素遺伝子クローニングはゲノム DNA/BamHI、2kb 付近の断片をターゲットとし、プローブ α を用いたコロニーハイブリダイゼーション、及び得られたポジティブクローンのプラスミド挿入断片をプローブとしたブラークハイブリダイゼーションの 2 段階で行った。得られた株について、single clone excision 法^{2) 3)}で、pBK-CMV ファージミドにサブクローニングした (pGS1)。
- 3. L-グルタミン酸オキシダーゼ活性測定法** 本酵素活性は、生成する過酸化水素をペルオキシダーゼとの共役系で赤色キノイミン色素として連続的に測定する 4-アミノアンチピリン・フェノール法⁴⁾を用いた。本酵素 1U は、25℃ 1 分間に 1μmol の H₂O₂ を生成する酵素量と定義した。

4. 発現系の構築及び精製 pGS1 より本酵素 ORF 部分をプライマー U1 (5'-CCACACCGGGGCCGAATTCAT-GAACGAGAT-3') 及びプライマー L1 (5'-AGGTACTCGGCCACCCCTGCAGGTC-3') を用いて PCR 法で増幅し、その産物について pKK223-3 に組み込んだ (pKK-LGOX)。大腸菌 JM109/pKK-LGOX 由来本酵素の精製は、細胞質画分より行った。精製段階は 20-45% 硫酸分画, DEAE-Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィー, Superdex 200 FPLC ゲル濾過クロマトグラフィーの順で行った。

実験結果及び考察

1. L-グルタミン酸オキシダーゼ遺伝子のクローニング・遺伝子構造解析 *Str* sp. X-119-6 由来の L-グルタミン酸オキシダーゼは、菌体外酵素であり サブユニット構造が $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ の複雑な高次構造をとる点から、その発現や分泌機構について興味を持たれていた。各サブユニットの N 末端解析より、 α サブユニットは A-N-E-M-T-Y-E-Q-L-A-, β サブユニットは G-G-V-R-V-R-P-A-T-N-, γ サブユニットは T-W-T-G-D-L-A-I-V-T-であることが明らかとなり、それぞれの N 末端は Met でないことから、放線菌内においては発現後プロテアーゼにより修飾を受けることが示唆された。2 段階のスクリーニングによる本酵素の遺伝子クローニングに試みた結果、挿入断片 5.5 Kb を含むプラスミド pGS1 が得られ、また DNA シークエンスから 2103bp の本酵素全遺伝子の存在が明らかとなった。

Fig. 1 に本酵素遺伝子配列より推定されるアミノ酸配列及び L-アミノ酸オキシダーゼとの相同性を示した。本酵素は 701 アミノ酸からなると推定され、またその配列から各サブユニットの N 末配列が見られた。このことから、本酵素は 1 本のタンパク質として発現され、放線菌内、または菌体外においてプロテアーゼによる修飾を受けることが示唆された。他にも本酵素の N 末端付近においていくつかフラボタンパク質との相同性が得られたが、全て ADP 結合に関与する $\beta\alpha\beta$ -fold の GXGXXG 配列、及びその近辺であった。しかし L-アミノ酸オキシダーゼとは、Fig. 1 に示されるよう

```

LAAO 1'      MNVFFMFSLLFLAALGSCADDRNPLAECFQENDYEEFLEI-ARNGLKATSNPKHVIVGAGMAGLSAAYVLGAGHQVTVLEA-
               *L**  NGL**** PK***IVGAG*AGL A* *L* AGH*VT*LEA
LGOX 1"      VTTDTARRHTGAERANEMTYEQALARELLLVGPAPTNECLKRLYLVDLIDNGLNPPGPPKRLIVGAGIAGLVAGDLLTRAGHDVTILEAN
               ⇨ α subunit
LAAO 83'     SERPGGRVRTY---RNEEAGW-----YANLGPMLPEKHRIVREYIRKFDLRLNEFSQENDNAWYFIKNIRKKVGEVKKDPGLLKYPVKP
               **R GGR**T*  **E * *  YA* G*MRLP* H*** * I K**L* * F
LGOX 91"     ANRVGGRIKTFHAKKGEPSPFADPAQYAEAGAMRLPSFHPLTLALIDKLGLKRLFPNVDIDPQTGNQDAPVPPVYKSPKDGKGTWTNGA
LAAO 165'    SEAGKSAGQLYEESLKGVEELKRTNCSYILNKYDTYSTKEYLIKEGDLSPGAVDMIGDLLNEDSGYVVSFIESLKHDDIFAYEKRFDEI
LGOX 181"    PSPEFKEPDKRNHTWIRTNREQVRAQYATDPSSINEGPHLTGCETRLTVSDMVNQALEPVRDYYSVKQDDGTRVNKPFKEWLAGWADV
LAAO 255'    VDGMDKLPTAMYRDIQDKVHFNAQVIKIQQNDQKVTVVYETLSKETPSV-----
LGOX 271"    RDFDGYSMGRFLREYAESDEAVEAIGTIENMTSRLHLAFFHSFLGRSDIDPRATYWEIEGGSRLPETLAKDLRDQIVMGQRMVREYY
LAAO 304"    -----TADYVIVCTTSRAVLKIFNPPLPKKAHALRSVHYRSGTKIFLTCTTKFWEDD
               T*D *IV ** ***R**K *PP* KK *A* **HV *TK**L* * **WE
LGOX 361"    DPGRDGHGELTGPGGPAVAIQTVPEGEPIAATQ TWTGDLAIVTIPFSSLRFVKVTPPFSYKKRRAVIETHYDQATKVLLEFSRRWWEFT
               ⇨ γ subunit
LAAO 358"    GIH-----GGKSTTDLPS
               GG STTD P*
LGOX 451"    EADWKRELDIAIAPGLYDYYQQWGEDDAEAAALALPQSVRNLPGLLGAHPSVDESRIQEEQVEYYRNSL RGGVVRPATNAYGGGSTTDNPN
               ⇨ β subunit
LAAO 371'    RFIYYPNHNH--TNGVGVIIAYGIGDDANFFQALDFKDCADIVFNDLSLIHQLPKKDIQSFYCY-PSVIQKWSLDKYAMGGITTFYQFQ
               RF*YYP*H  T*G V* AY* *DDA* *** F*D * * *L* * * * I* F* ** *Q*W D YA G* ***TP*Q*
LGOX 541"    RFMYYPSPHPVPTQGGVVLAAYSWSDDAARWDS--FDDAERYGY-ALENLQSVHGRRIEYFTGAGQTQSWLRDPYACGEAAVYTPHQM
LAAO 458'    HFSDDLTAQGRIFYAGEYTAQAHGWIDSTIKSGLRAARDVNLAENPSGIHLSNDNEL(15.8%)
               F ** **G**YFAGE*** H*W*****RAA *VN A* * *G*
LGOX 628"    AFHLDVVRPEGPVYFAGEHVSLEKAWIEGAVETAVRAAIAVNEAPVGTGTAAAGRRGAAAATEPMREALTS

```

Fig. 1 Deduced amino acid sequence of L-glutamate oxidase and comparison with sequence of L-amino acid oxidase. LAAO, *Calloselasma rhodostoma* L-amino acid oxidase⁵⁾, LGOX, *Streptomyces* sp. X-119-6 L-glutamate oxidase.

に、3つの領域において高く保存されていた。これまでにL-アミノ酸オキシダーゼにおいて立体構造解析がされ、全ての領域における機能的役割が解明されている⁵⁾。本酵素においては、N末端以外の相同性を持つ付近の配列により活性中心が構成され、またその付近におけるイソアロキサジン環を取り巻く疎水部分を形成していることが考えられた。

2. 発現系の構築 実験方法に示すよう、シグナルペプチド部分をのぞいた形の本酵素遺伝子をtacプロモーター下流において、強制的に本酵素を発現させるシステムを構築した (pKK-LGOX)。pKK-LGOXを持つ大腸菌は、シグナルペプチドが除かれた前駆体を発現し、またその培養時の温度が22℃、1 mM IPTG誘導において生産が最大となった。部分精製品において性質検討を行った結果、基質親和性及び熱安定性に成熟酵素との異なりが見られ、SDS-PAGEにおいては分子量約76,000の位置にバンドが得られた。そしてゲル濾過による分子量測定の結果、約15万kDaであったことから、本酵素前駆体はホモダイマーの2量体を形成していることが考えられた。また大腸菌においては、発現されてからの修飾系が存在しないが、前駆体においてもいくらかの活性を保持していることが明らかとなった。

大腸菌形質転換体の生産する本酵素は、工業的に利用するに当たりほぼ十分量であるが、その酵素の基質親和性が極端に低いことから、L-グルタミン酸微量検出は不可能であった。そこで我々は本酵素の性質改善における検討を行った。本酵素は切断されて成熟型となり、また β サブユニットのN末端の一つ前の残基においてArgが存在していることから、部分精製品においてトリプシン分解を行った。トリプシン分解後SDS-PAGEに供したところ、約58,000及び、18,000の断片に分かれた。またSuperdex 200 FPLCゲル濾過クロマトグラフィーにより活性を持つペプチド断片を精製し、SDS-PAGEに供したが両断片が存在していたことから、切断後もこれらの断片は親和性が高く、サブユニット構造をしていることが考えられた。分解後における性質の変化は主に基質親和性に見られ、ほぼ成熟酵素の K_m と一致した。このことから前駆体はプロテアーゼによる切断で、基質結合部位付近の構造が変化し、親和性が増すことが考えられた。しかし熱安定性においては改善は見られなかったことから、その他のプロテアーゼによる修飾、または $\alpha 2\beta 2\gamma 2$ という構造が安定性に関連付けられると考えられる。

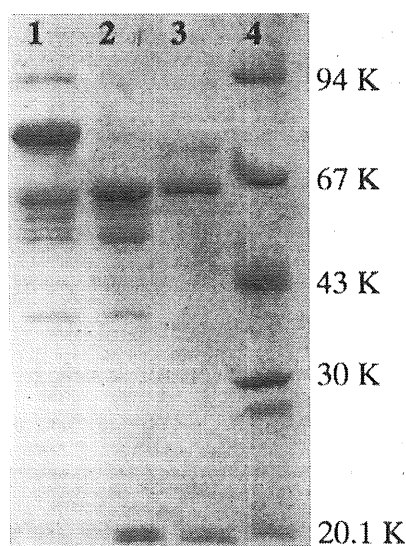


Fig. 2 SDS-PAGE analysis of L-glutamate oxidase precursor and trypsin digested precursor. Lane 1, L-glutamate oxidase precursor (76 kDa); lane 2, L-glutamate oxidase precursor digested by trypsin (58 kDa and 18 kDa); lane 3, pooled fractions obtained from Superdex 200 gel filtration; lane 4, molecular weight standards.

Table 2. Comparison of nature of each enzymes

	Mature enzyme (from <i>Str. Sp. X-119-6</i>)	precursor (from <i>E. coli</i> transformant)	Trypsin digestion
Subunit	$\alpha 2\beta 2\gamma 2$	homodimer	58 kDa + 18 kDa
Thermostability (30 min)	70	30	30
Km for L-Glutamate	0.2	5	0.2

参考文献

- 1) Kusakabe, H., Y. Midorikawa, T. Fujishima, A. Kunikawa, and H. Yoshino. 1983. Purification and properties of a new enzyme, L-glutamate oxidase, from *Streptomyces* sp. X-119-6 grown of wheat bran. *Agric. Biol. Chem.* 47 : 1323-28.
- 2) Short, J. M., J. M. Fernandez, J. A. Sorge, and W. D. Huse. 1988. Lambda ZAP : a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* 11 : 7583-600.
- 3) Short, J. M., and J. A. Sorge. 1992. In vivo excision properties of bacteriophage lambda ZAP expression vectors. *Methods Enzymol.* 216 : 495-508.
- 4) Allain, C. C., L. S. Poon, C. S. Chan, W. Richmond, and Fu PC. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* 20 : 470-5.
- 5) Peter, D. P., J. Cheah, R. Coulombe, P. Macheroux, S. Ghisla, and A. Vrielink. 2000. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. *The EMBO Journal.* 19 : 4204-15.
- 6) Meister, A. 1965. *Biochemistry of Amino acids* I, 294-314.