

アミノ酸分析に向けたトリプトファン酸化酵素の高機能化

山口 浩輝*・高橋 一敏

はじめに

アミノ酸は生体の構成成分としてきわめて重要であり、生体内のアミノ酸濃度は健康状態の指標となり得ることから、アミノ酸濃度の分析はさまざまな分野における研究開発や臨床の現場において大きな意義を有する。たとえば、先天性アミノ酸代謝異常であるフェニルケトン尿症における血中フェニルアラニンの上昇や、肝硬変における総分岐鎖アミノ酸/チロシンモル比 (BTR) の上昇は、診断項目の一種としてすでに広く世界中で用いられている¹⁻⁵⁾。さらに近年では、アミノ酸濃度の変動と糖尿病やがんをはじめとするさまざまな疾患との関連が報告されている⁶⁻⁷⁾。

アミノ酸の分析法は1940年代のクロマトグラフィーによる分離を端緒として盛んに研究開発がなされており、1958年にはすでにアミノ酸自動分析計が開発されている⁸⁻¹⁰⁾。また近年では、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いた高感度検出法が報告されている¹¹⁾。しかしながら、これらの装置は大型かつ高価であるうえ、試料の前処理や分析結果の解析には専門知識と習熟を必要とするため、アミノ酸分析の機会是非常に限られているという課題があった。

これらの課題を解決し、アミノ酸分析を身近なものにするには、アミノ酸代謝酵素を用いたアミノ酸分析法が有用である。アミノ酸代謝酵素を用いた手法で鍵となるのは、言うまでもなく酵素の性質であり、正確性および精度の高い分析法確立のためには、特異性と安定性の優れた産業用酵素の創出が必要である。産業用酵素の創出に向けた酵素工学的・構造生物学的なアプローチを効率よく行うには、アミノ酸代謝酵素の科学的知見を蓄積することが重要となる。本稿では、必須アミノ酸の一種であり、ヒト血漿中の濃度が肥満や精神疾患と関連することが報告されている¹²⁻¹⁴⁾トリプトファン (Trp) を題材として、測定用酵素であるL体Trp酸化酵素の高機能化による安定化と、構造解析によって得られた知見を紹介する¹⁵⁾。

酵素法による Trp 分析

これまでTrpの酵素法による簡便な分析法として

*Coprinus sp.*由来のTrp酸化酵素を用いた報告例はあるものの、基質特異性が高くなく分析精度に課題があった¹⁶⁾。そこで、浅野らは*Chromobacterium violaceum*由来Trp酸化酵素 (以下VioA) に着目し、Trpとの反応によって生成する過酸化水素を検出することにより、簡便にTrpを定量できる方法を開発した¹⁷⁾。VioAは非常に高い基質特異性を有しており、血漿のような夾雑成分を多量に含む試料中のTrp濃度であっても正確に分析することができたが、安定性を向上させることが産業利用への課題であった¹⁷⁾。

酵素高機能化

VioAの保存安定性の改善を目指し、筆者らはアミノ酸変異導入によるVioAの安定化を行った。近年、Füllerら、LaiらによりVioA野生型の立体構造がそれぞれ報告されたが¹⁸⁻¹⁹⁾、筆者らが研究を開始した当初は、VioAの立体構造の報告例はなく、近縁種の構造もProtein Data Bank (PDB) へ登録されていなかったため、ホモロジーモデリングは困難であった。そこで、システインの酸化が不安定性の一因であると仮説をたて、過去の報告²⁰⁾を参考にVioAの7か所のシステイン残基すべてを、1残基ずつの点変異導入により、それぞれアラニン、バリン、スレオニンへと置換して安定性を評価した。各変異体の45°C、15分間の熱処理後の残存活性を比較したところ、VioA (C395A) は野生型と比較して3.4倍の残存活性を有し、評価した変異体の中でもっとも顕著な熱安定性の向上が見られた (図1)。融解温度は野生型が45.7°Cであるのに対しVioA (C395A) は49.3°Cであった¹⁵⁾。さらに、野生型において課題であった保存安定性をアレニウスの式を用いた加速試験で評価したところ、野生型およびVioA (C395A) の半減期はそれぞれ49日、452日であり、VioA (C395A) は野生型の約9倍の保存安定性を有することが示唆された¹⁵⁾。

VioAの特徴である基質特異性を評価したところ、標準アミノ酸20種類においてTrp以外のアミノ酸 (100 μM) に対する反応性は検出されず、野生型と同等の高い基質特異性が保持されていることが確認できた¹⁵⁾。また、野生型とVioA (C395A) のTrp反応に対する速度論的パラメータを求めたところ、 K_m はそれぞれ

*著者紹介 味の素株式会社 イノベーション研究所 E-mail: hiroki_yamaguchi@ajinomoto.com

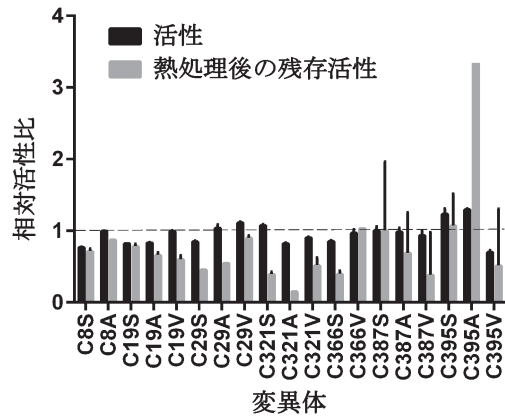


図1. VioA 変異体の評価結果. 野生型の結果を1 (点線) とした際の, 各変異体の活性 (黒色) および45°C, 15分間の熱処理後の残存活性 (灰色). ※先行文献の図¹⁵⁾を改変.

表1. ヒト血漿中のTrp濃度定量

	ヒト血漿*		
	i	ii	iii
Trp濃度 (μM)	51.2	36.9	33.6
CV (%)	0.8	3.2	1.3
乖離率 [†] (%)	0.4	0.2	2.9

* i, プール血漿, ii, 個別血漿 (男性), iii, 個別血漿 (女性)
[†] アミノ酸アナライザー定量値を真値とした際の乖離率. ※先行文献の表¹⁵⁾を改変.

109.4 μM, 93.9 μM, k_{cat}/K_m は $4.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $4.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ であり, VioA の触媒能にも大きな変化は見られなかった¹⁵⁾.

ヒト血漿中のトリプトファン濃度定量

VioA (C395A) が野生型と同様の基質特異性や触媒能を有し, 安定性も向上していることから, 野生型と同様に Trp 濃度定量に有用であると考えた. そこで筆者らは, VioA (C395A) を用いてヒト血漿中の Trp 濃度定量を行ったところ, VioA (C395A) を用いた酵素法の結果はアミノ酸アナライザーを用いた機器分析法の結果と非常に近い値を示した (表1). 本手法は除タンパク質などの前処理を行っておらず, VioA (C395A) は VioA 同様に, 血漿中に含まれる夾雑成分の影響を受けにくいことも確認できた.

VioA (C395A) の構造解析

VioA (C395A) の安定化機構の考察と, 更なる安定化に向けた知見を得るため, 筆者らは VioA (C395A) の X線結晶構造解析に取り組んだ. 種々の条件検討の結

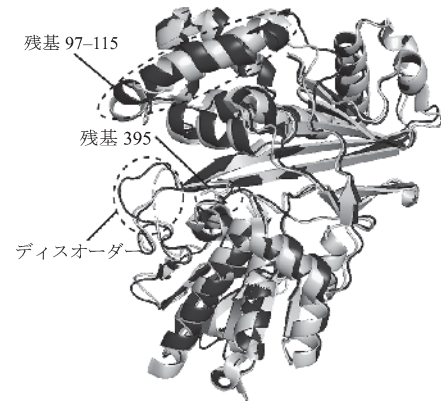


図2. VioA 野生型と VioA (C395A) の全体構造比較. VioA 野生型 (灰色), VioA (C395A) (黒色). ※先行文献の図¹⁵⁾を改変.

果, VioA (C395A) と補酵素 FAD の結晶を得ることに成功し, 最終的に分解能 1.8 Å で立体構造を決定した¹⁵⁾. 2016年に Füllerらによって報告された野生型の構造¹⁸⁾と VioA (C395A) の Cα 原子を重ね合わせると, 平均二乗偏差は 0.858 Å であり, VioA (C395A) では野生型でディスオーダーしている領域の電子密度が観察された他, αヘリックス (残基 97-115) に軽微な変化が見られた (図2). 一方で, 変異を導入した 395 番目の残基周辺における顕著な差は見られず, 変異による周辺残基への影響は少ないことが示唆された.

次に, この立体構造を用いて筆者らが評価した変異体の中で, VioA (C395A) がもっとも高い熱安定性を示した理由を考察した. 野生型の構造で, Cys395 の側鎖は, 他の6種類のシステイン残基と比較してもっとも溶媒露出領域が大きい¹⁵⁾. 一般的に溶媒露出したシステイン残基の置換が熱安定性向上に対して有効であることが知られている²¹⁾. さらに, 置換先としてアラニン残基に加え, セリン残基も効果的であることが知られている²²⁾が, VioA において C395S は野生型と比較して顕著な安定化は見られなかった (図1). この理由として Cys395 は, 基質ポケット入口に位置しており, 疎水性クラスター形成に寄与しているため, 親水性のセリン残基への置換はアラニン残基と比較して, 疎水性クラスターの構造維持に不利であると推測した.

基質認識機構

VioA は高い基質特異性を有していることから, VioA の基質認識機構を解明することは学術的な知見に加えて, 今後, 特異性の高いアミノ酸代謝酵素を創出する際に有用であると考えられる. そこで筆者らは, 基質 Trp を VioA (C395A) /FAD 複合体の結晶に短時間ソーキ

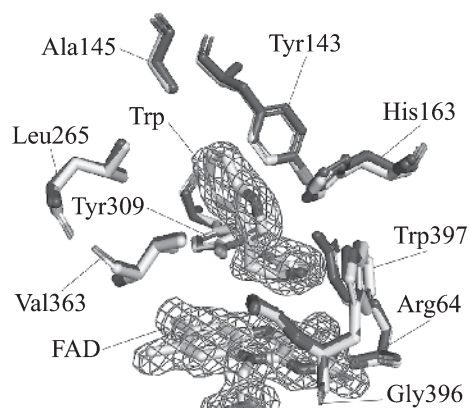


図3. TrpのVioA (C395A) への結合と周辺残基の変化. TrpおよびFADの電子密度(メッシュ), VioA (C395A) /FAD (黒色), VioA (C395A) /FAD/Trp (灰色). ※先行文献の図¹⁵⁾を改変.

ングすることで, VioA (C395A), FADおよびTrpの三者複合体構造を分解能1.8 Åで初めて決定し, VioA (C395A) に結合したTrpの電子密度を鮮明に確認することができた(図3). VioA (C395A) /FAD 2者複合体との構造比較から, 基質の結合による周辺の側鎖の構造変化はほとんど見られなかった. さらに, VioA (C395A) とTrpの相互作用解析から, 主鎖とFAD, Arg64, His163, Tyr309, Gly396およびTrp397, インドール環とTyr143, Ala145, His163, Leu265, Val363およびGly396が相互作用していた¹⁵⁾. このインドール環の厳密な認識が, VioAの高い基質特異性に寄与していることが強く示唆された.

また, VioAによる触媒反応の過程で脱離するTrpの α 位のH原子は補酵素FADのN5原子によって π - σ 相互作用で認識されており, 2者の距離は2.47 Åであった. これはVioAが属するmonoamine oxidase familyの反応機構として従来提唱されているhydride transfer mechanismに矛盾するものでないが, 最近では理論計算によって新規反応機構: hydrogen-atom-coupled electron-transfer (HACET) も提唱されている²³⁻²⁴⁾. 本研究で得られた構造は盛んに議論されているmonoamine oxidase familyの反応機構解明に寄与することが期待できる.

おわりに

本研究において, 筆者らはVioAの保存安定性の向上を目指して酵素改変を行い, 野生型に対して約9倍の保存安定性を有するVioA (C395A) を見いだした. VioA (C395A) は基質特異性, 触媒能ともに野生型とほとん

ど同等の性質を有しており, ヒト血漿中のTrp濃度を高い正確性と精度で定量可能であり, 産業应用到十分な性質を備えていることを確認した. さらに安定化機構の解明のため, VioA (C395A) の立体構造をX線結晶構造解析によって決定した. 設計した変異体の中でVioA (C395A) がもっとも高い安定性を示した理由として, 高い溶媒露出領域を有するC395の置換に加え, 疎水性クラスターを形成するC395の置換先としてアラニンが最適であったことが構造情報から示唆された. さらに, 基質であるTrpとの複合体構造から, 基質のインドール環はVioAによって厳密に認識されており, VioAの高い基質特異性を理解するうえで有益な情報が得られた. 本知見は, VioAだけではなく他のアミノ酸代謝酵素の研究開発や産業应用到きわめて重要な基盤情報であり, 酵素法によるアミノ酸分析法の発展に大きく寄与するものであると言える.

文 献

- 1) Campollo, O. *et al.*: *Rev. Invest. Clin.*, **44**, 513 (1992).
- 2) Huang, T. *et al.*: *Anal. Chem.*, **70**, 991 (1998).
- 3) Nakamura, K. *et al.*: *Anal. Biochem.*, **234**, 19 (1996).
- 4) Rivero, A. *et al.*: *Clin. Chem. Lab. Med.*, **38**, 773 (2000).
- 5) Suzuki, K. *et al.*: *Hepatol. Res.*, **38**, 267 (2008).
- 6) Lanza, I. R. *et al.*: *PLoS One*, **5**, e10538 (2010).
- 7) Miyagi, Y. *et al.*: *PLoS One*, **6**, e24143 (2011).
- 8) Conden, R. *et al.*: *Biochem. J.*, **38**, 224 (1944).
- 9) Martin, A. J. and Synge, R. L. *Biochem. J.*, **35**, 1358 (1941).
- 10) Spackman, D. H. *et al.*: *Anal. Chem.*, **30**, 1190 (1958).
- 11) Shimbo, K. *et al.*: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, 1483 (2009).
- 12) Mangge, H. *et al.*: *Obesity (Silver Spring)*, **22**, 195 (2014).
- 13) Yamakado, M. *et al.*: *Clin. Obes.*, **2**, 29 (2012).
- 14) Coppen, A. *et al.*: *Lancet*, **2**, 60 (1973).
- 15) Yamaguchi, H. *et al.*: *J. Biochem.*, DOI: <https://doi.org/10.1093/jb/mvy065>.
- 16) Furuya, Y. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1486 (2000).
- 17) Kameya, M. *et al.*: *Anal. Biochem.*, **438**, 124 (2013).
- 18) Fuller, J. J. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **291**, 20068 (2016).
- 19) Lai, H.-E. *et al.*: *bioRxiv*, (2017). DOI: <https://doi.org/10.1101/202523>
- 20) Nakaniwa, T. *et al.*: *Biochemistry*, **51**, 8410 (2012).
- 21) Patel, S. B. *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta*, **1696**, 67 (2004).
- 22) Xia, X. *et al.*: *J. Pharm. Sci.*, **104**, 566 (2015).
- 23) Abe, Y. *et al.*: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **19**, 9811 (2017).
- 24) Ralph, E. C. *et al.*: *Biochemistry*, **45**, 15844 (2006).