

L-グルタミン酸オキシダーゼの発見と応用開発



①

②

③

株式会社エンザイム・センサ 日下部 均 ①

ヤマサ醤油株式会社 野口 利忠 ②

岡山大学大学院環境生命科学研究科 稲垣 賢二 ③

はじめに

1980年の時点において、L-アミノ酸オキシダーゼは、その由来を問わず中性アミノ酸に対して広い基質特性を示し、L-グルタミン酸には作用しにくいことが報告されていた。一方、L-グルタミン酸に特異性の高い酵素として、L-グルタミン酸脱炭酸酵素とL-グルタミン酸脱水素酵素が古くからL-グルタミン酸測定に使われていた。しかし、脱炭酸酵素の測定系ではCO₂の測定が面倒なこと、また脱水素酵素の測定系では補酵素の吸光度変化を測定するため、いずれも煩雑な方法となっていた。高基質特異性のL-グルタミン酸オキシダーゼが発見されれば、反応物である過酸化水素の発色系を応用することが出来ることから、L-グルタミン酸測定への応用のみならず、L-グルタミン酸が関与する酵素活性の測定にも応用できることが期待されていた。

1. L-グルタミン酸オキシダーゼの発見

我々は土壌分離菌の固体培養によって生産される抗がん性物質を探索する過程で、糸状菌 *Trichoderma viride* Y-2442 が生産する高分子抗がん性物質を見出し、1980年に新酵素L-リシンα-オキシダーゼと同定した。これは、高基質特異性を示すL-アミノ酸のオキシダーゼとしては初めての例であった。この経験をもとにして、特異的なアミノ酸オキシダーゼの探索を開始し、1982年に放線菌 *Streptomyces* sp. X-119-6 の固体培養により、L-グルタミン酸だけに作用する新酵素L-グルタミン酸オキシダーゼ (LGOX) を発見した¹⁾。

2. LGOX と LGOX 前駆体の性質

LGOX は、安定性に優れたヘテロ六量体構造 ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) を有する分子量14万のフラビン酵素であった。L-グルタミン酸以外のアミノ酸に全く作用せず、これまで報告されているL-アミノ酸オキシダーゼ群の中で、最も基質特異性の厳格な酵素である。LGOX 遺伝子をクローニングして解析したところ、 α 、 β 、 γ の各サブユニットに相当する ORF は確認されず、LGOX 遺伝子は組換え大腸菌により1本のポリペプチドとして発現した。この分子量7万のポリペプチドはホモ二量体を形成し、L-グルタミン酸オキシダーゼとしての弱い活性を有していたが、元菌由来の LGOX と比較して基質親和性に劣り、熱にも不安定であった。しかし、この発現したホモ二量体酵素を、プロテアーゼ処理すると、元菌由来の LGOX と全く同じ構造となり、酵素化学的性質も同等であった²⁾。この前駆体を遺伝子組換え大腸菌で大量生産するとともに、成熟体酵素への効率的転換法を開発して、組換え LGOX の工業的製造法を確立した。

3. LGOX の X線結晶構造解析及び基質特異性変換酵素

LGOX の X線結晶構造 (図1, 2) を、低基質特異性の蛇毒由来L-アミノ酸オキシダーゼの構造と比較したところ、活性中心に特徴的な残基が確認され、それらの中で305番目のアルギニン残基が基質認識の鍵残基である事が明らかになった³⁾。そこで、このアルギニン残基を他のアミノ酸に置換した19種類の R305X 変異酵素を作製した。その中で、R305D と R305E 変異酵素は、L-グルタミン酸に作用しない、新規L-アルギニンオキシダーゼとなった。

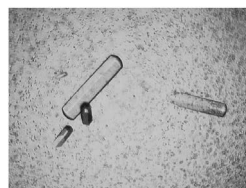


図1. LGOX の結晶

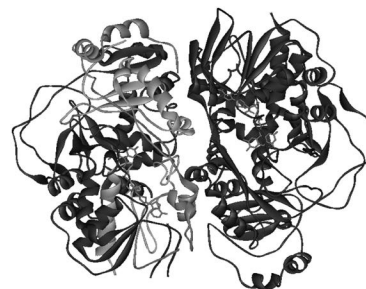


図2. LGOX の X線結晶構造

4. LGOX を応用した簡便な比色測定キットの商品化

4-1. L-グルタミン酸、L-グルタミン、GABA の測定意義

L-グルタミン酸は調味料として大量製造されているが、生体内においては様々な生理的機能を担っている普遍性の高いアミノ酸である。L-グルタミンは、血中で一番多い遊離アミノ酸であり、腸管粘膜細胞の再生や免疫機能促進などの様々な生理的機能が報告されている。γ-アミノ酪酸 (GABA) は、抑制系の神経伝達物質であり、GABA を添加した多くの機能性表示食品が商品化されている。これら三つのアミノ酸は、代謝経路においてお互いに直接的な基質と反応生成物の関係にあり (図3)、分析化学的な観点からは、同一の方法で簡便に測定することが求められている。

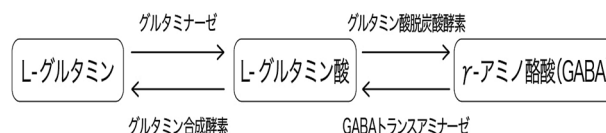


図3. L-グルタミン酸とL-グルタミン、GABA の関係

4.2. L-グルタミン酸測定キットと「うまミエール」

LGOXを応用して、L-グルタミン酸から生成する過酸化水素の発色系によるL-グルタミン酸測定キットを1986年に発売した。その後、組換えLGOXを使用して、常温で安定な二つの試薬溶液で構成したL-グルタミン酸測定キットを開発し、凍結乾燥試薬を用いる上記のキットに替えて販売している。さらに、専用LED比色計付のL-グルタミン酸測定セット「うまミエール」(図4)を製品化した。測定に必要な機器と器具が全て揃っており、これだけで、誰でも簡単に、L-グルタミン酸を色の濃さで測ることができる。

4.3. L-グルタミン酸測定キット

LGOX, グルタミンナーゼ及びパーオキシダーゼ(POD)の同時反応による、AとBの二つの安定な試薬溶液で構成した、新しいL-グルタミン酸測定キットを発売した。このキットは、試料にL-グルタミン酸やビタミンCが共存しているも、L-グルタミン酸だけを正確に定量することができる。

4.4. GABA測定キットと「GABAミエール」

GABAトランスアミナーゼ反応、LGOX反応及びPOD反応をカップリングして酵素サイクルを回し、エンドポイント法による新しいGABA測定キットを開発した⁴⁾。LED比色計付測定セット「GABAミエール」(図5)として近日中に発売予定である。

5. LGOXのバイオセンサーへの応用

5-1. LGOXのバイオセンサーへの応用研究

1982年、LGOXを酸素電極へ固定化したバイオセンサーを構築し、1984年に欧州バイオテクノロジー会議で発表した。その後、大学及びセンサーメーカーとの共同開発で、醤油分析用の卓上型L-グルタミン酸センサー及び肝機能測定センサーチップの研究開発を行った。特に肝機能測定センサーによるGOT/GPT測定値は、市販診断薬キットの測定値と高い相関性を示し、今後のさらなる開発が期待される。

5-2. LGOXを使用した国内外各社のセンサー製品

LGOXを長年にわたり市場へ供給したことにより、国内外の会社が、L-グルタミン酸センサー及びL-グルタミン酸センサーに応用した多項目センサー分析機を商品化した。食品分析のみならず、抗体医薬品の細胞培養による生産工程管理に広く使わ

れている。また、マウスやラットの脳内へ挿入する、無線の*in vivo*実験用L-グルタミン酸センサーにもLGOXが使用されている。今後、精神神経疾患の基礎研究あるいは新薬開発においても、LGOXによる脳内のL-グルタミン酸測定が大いに寄与すると期待される。また、LGOXから創製した部位特異的変換酵素L-アルギニンオキシダーゼを応用したL-アルギニンセンサーをセンサーメーカーと共同開発した。

おわりに

LGOXは、L-グルタミン酸が関与する数多くの酵素の活性測定に応用が可能である。例えば、醤油麹のグルタミンナーゼ活性は、醤油醸造の重要な指標となっているが、LGOXによって酵素活性の測定が大幅に簡便化されている。

また、L-グルタミン酸測定セット「うまミエール」のために開発した、安価で小型の専用LED比色計は、同一の波長と手順で測定する糖類の測定キットにも応用することができる。L-グルタミン酸・グルコース・ショ糖・果糖の各測定キットと専用LED比色計又は色見本のセットにより、小学生から大学生まで、うま味と甘味を目で確認しながら測定することができる。やさしい食品分析あるいは酵素の学習に、理科実験教材としての利用が期待される。

(引用文献)

- 1) Kusakabe, H., Midorikawa, Y., Fujishima, T., Kuni-naka, A., Yoshino, H., Purification and properties of a new enzyme, L-glutamate oxidase, from *Streptomyces* sp. X-119-6 grown on wheat bran, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1323-1328 (1983)
- 2) Arima, J., Tamura, T., Kusakabe, H., Ashiuchi, M., Yagi, T., Tanaka, H., Inagaki, K., Recombinant expression, biochemical characterization and stabilization through proteolysis of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6, *J. Biochem.*, **134**, 805-812 (2003)
- 3) Utsumi, T., Arima, J., Sakaguchi, C., Tamura, T., Sasaki, C., Kusakabe, H., Sugo, S., Inagaki, K., Arg305 of *Streptomyces* L-glutamate oxidase plays a crucial role for substrate recognition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 951-955 (2012)
- 4) Nishiyama, T., Woro, T.S., Ueda, T., Kusakabe, H., GABA enzymatic assay kit, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **84**, 118-125 (2020)

謝辞 本賞にご推薦頂きました筑波大学小林達彦教授に深く感謝いたします。本研究を共に遂行して頂きましたヤマサ醤油株式会社、株式会社エンザイム・センサ及び岡山大学微生物遺伝子化学研究室の皆様へ深く感謝いたします。筑波大学鈴木博章教授、筑波大学橋本義輝准教授、日本大学上田賢志教授及び日本大学西山辰也博士他の共同研究者の皆様へ厚くお礼申し上げます。また、ご指導頂きました京都大学左右田健次名誉教授及びヤマサ醤油株式会社故国中明博士に深く感謝いたします。



図4. 「うまミエール」



図5. 「GABAミエール」