

〈総説〉

生化学検査で活躍するフラビンアデニンジヌクレオチド結合 オキシダーゼの類似性と個性

西矢 芳昭

Similarities and individualities of flavin adenine dinucleotide- linked oxidases for diagnostic use

Yoshiaki Nishiya

Summary Various flavin adenine dinucleotide (FAD)-linked oxidases, which have a common reaction format, are utilized in liquid reagents for biochemical diagnosis. Four general FAD-linked oxidases, sarcosine oxidase, L- α -glycerophosphate oxidase, glucose oxidase, and cholesterol oxidase, which are used for diagnostic purposes, were structurally compared. Although their overall amino acid sequences and tertiary structures differed from one another, a high similarity was observed in the amino-termini containing GXGXXG motifs and specific acidic residues. The important roles of this region for FAD binding and enzyme activity were revealed by site-directed mutagenesis. Of these, only cholesterol oxidase had an individual uptake of the hydrophobic substrate dissolved in non-ionic detergents. Understanding the functions of FAD-linked oxidases will be necessary to provide information for further improvements in the functionalities of diagnostic reagents.

Key words: Oxidase, Flavin, Structure, Motif, Mutagenesis

I. はじめに

中性脂肪や各種コレステロール、クレアチニンなどの臨床検査薬、あるいは尿糖試験紙や血糖センサなどに黄色い酵素が使われているのを御存知だろうか。この黄色は酵素タンパク質そのものではなく、結合している補酵素フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD, 図1) の色である。それぞれの酵素の基質はもちろん異なるが、反応や構造上の類似性があり、一方で非常に興味深い個性を持っている。本稿では、これら臨床検査で活躍するFAD結合オキシダーゼの

特徴を、立体構造やわれわれの実験データを交えて解説する。

II. 生化学検査と FAD 結合オキシダーゼ

生化学検査の多くの項目で、酵素による酸化還元反応を利用した測定が行われている。これらは1970年代初めより測定系の開発・改良と臨床検査への応用が進み、現在では主要な項目でほぼ100%酵素利用測定法が普及している^{1),2)}。酸化還元反応を行う酵素の代表として、オキシダーゼ (酸化酵素) とデヒドロゲナーゼ (脱水

摂南大学理工学部生命科学科
〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町17番8号

Department of Life Science, Faculty of Science and
Engineering, Setsunan University.
17-8 Ikedanaka-machi, Neyagawa, Osaka 572-8508, Japan

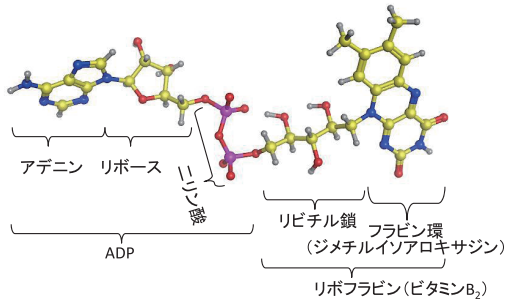


図1 フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) の構造

Ball and Stickで表す。グレー、黄、青、赤、ピンクのBallは、それぞれ水素、炭素、窒素、酸素、リン原子を示している。

素酵素)があり、前者は基質の酸化に伴い酸素を還元するが、後者は酸素以外の物質を酸化還元する。尿酸オキシダーゼ (ウリカーゼ) のように自分自身で酸化還元反応を触媒する酵素もあるが³⁾⁻⁵⁾、多くは補酵素や金属イオンなどの補因子の力を借りて酸化還元反応を行っている。中でも、FAD (図1) は補酵素の代表格で、表1に示すように主要な生化学検査項目で黄色のFAD結合オキシダーゼが利用されている。他にも、HbA1c測定に用いるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、フルクトシルペプチドオキシ

ダーゼや、リン脂質測定に用いるコリンオキシダーゼなどさまざまなFAD結合オキシダーゼを用いた酵素法が開発されている。なお、生化学検査に用いられる黄色の酸化還元酵素には、乳酸オキシダーゼやジアホラーゼなどのフラビンモノヌクレオチド [FMN, リボフラビンのリビチル鎖 (図1) にリン酸が1つ結合した化合物] 結合オキシダーゼも存在する。ここでは、FAD結合オキシダーゼのうち表1の主要4酵素について比較を行う。

Ⅲ. 反応と構造の類似性と個性

FAD結合オキシダーゼは、2段階の反応を触媒する (図2)。第1反応では、基質が酵素の酸化型FADに水素 (つまり電子と陽子) を渡し、生成物と還元型酵素ができる。続いて起こる第2反応では、還元型酵素から酸素へ水素が受け渡され、過酸化水素が生成すると共に酵素は酸化型に戻る。一般に、第1反応での基質からFADへの水素移動には仲介役がいて、FADの近くのヒスチジン (H) がその役割を果たすが、サルコシンオキシダーゼ (Sox) は基質から直接FADへ水素の移動が起これると考えられている⁶⁾。

図3Aは、4種のFAD結合オキシダーゼの立

表1 主なFAD結合オキシダーゼ

FAD結合オキシダーゼ	略号	使用検査項目
サルコシンオキシダーゼ	Sox	クレアチニン, クレアチン など
L- α -グリセロリン酸オキシダーゼ	Glpox	中性脂肪 など
グルコースオキシダーゼ	Gox	尿糖 (試験紙), 血糖センサ など
コレステロールオキシダーゼ	Chox	総コレステロール, HDL-コレステロール, LDL-コレステロール など

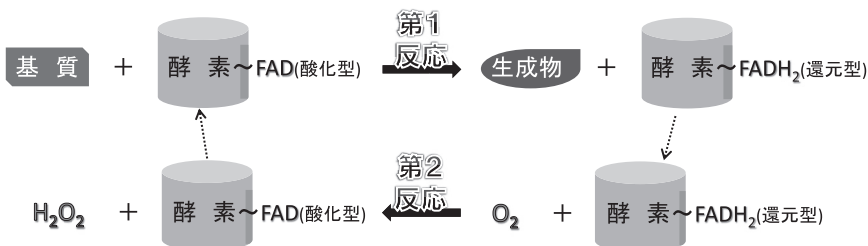


図2 FAD結合オキシダーゼの反応

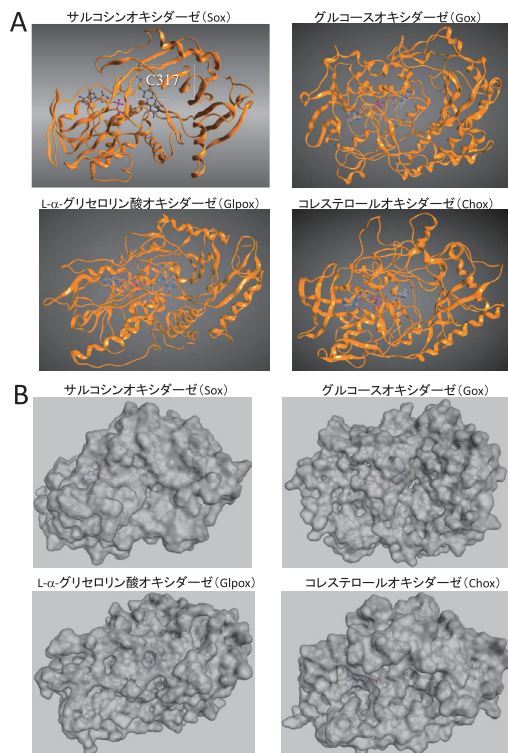


図3 FAD結合オキシダーゼの立体構造
FADの構造をBall and Stickで表す。Soxの構造は、ソフトウェアMOE (Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada) を用いたホモロジーモデリングにより*Arthrobacter*属由来サルコシンオキシダーゼ (SoxA) の立体構造を構築し、FADと共有結合するシステイン残基 (C317) を示している。Glpox、Gox、Choxの構造は、タンパク質立体構造データベースPDBより引用した (Glpox、Gox、ChoxのPDB IDは、それぞれ2RGOa、1CF3a、1N4W)。(A) 主鎖構造をリボンモデルで表す。(B) 酵素表面構造を表す。

体構造を示している。生化学検査に用いられるこれらの酵素は、すべて微生物由来である。それぞれの酵素の立体構造は異なるが、しいていえばSoxとL- α -グリセロリン酸オキシダーゼ (Glpox) の形は少し類似しており、同様にグルコースオキシダーゼ (Gox) とコレステロールオキシダーゼ (Chox) の形にも少し類似性があることがおわかりいただけるだろうか。ちなみに、SoxとGlpoxはどちらも細菌の細胞質に存在する酵素で、一方GoxとChoxはどちらも糸状菌や放線菌の菌体外分泌酵素である。また、

図3Bは、それぞれの酵素の表面を示している。ほぼ中央に活性中心とフラビン環を置いているが、表面構造の形状・凹凸はそれぞれの酵素の基質に応じて異なっている。

FADと酵素の結合は非共有結合性のものが多いが、SoxはFADのフラビン環のメチル基と酵素のシステイン (C) [*Arthrobacter*属細菌の酵素 (SoxA) の場合にはアミノ末端から317番目のシステイン (C317)] とが共有結合している (図3A)。この共有結合はSoxのFAD保持に重要である。われわれのSoxAの研究では、C317をセリン (S) に置換し共有結合できないようにすると酵素とFADの結合が弱まり、FADが無い環境では酵素活性が極端に減少する (後述するが不活性になる訳ではない⁷⁾)。しかし、FADの濃度上昇と共に変異酵素の活性は回復し、FAD濃度と酵素活性は飽和曲線となる。この変異酵素におけるFADの解離定数は $1.6 \mu\text{mol/L}$ と算出されたが、野生型酵素ではFADは共有結合しているので当然ながら解離しない。FADと非共有結合性のオキシダーゼでも、例外があるものの通常はFADが酵素から解離することはない。FADを持たないアポ酵素は、人為的な実験条件でのみ作成できる。また、無細胞タンパク質合成を行えば、FAD結合オキシダーゼのアポ酵素が簡単に作成できる。無細胞タンパク質合成とは、タンパク質をコードするDNAから転写・翻訳を行う最低限の物質の混合物でタンパク質合成を行う方法で、試薬キットが既に市販されている。この試薬キットの中にはFADが含まれないので、FAD結合オキシダーゼのDNAを加えて合成できるのはアポ酵素のみである。実際に、SoxAのアポ酵素合成事例が報告されている⁸⁾。

IV. FAD 結合の類似性と個性

実は、異なるFAD結合オキシダーゼ間の全体的なアミノ酸配列に類似性はほとんど見られない。今回比較している4種についても、アミノ酸配列の相同性は全く無い。しかしながら、アミノ末端のアミノ酸配列には、類似した部分がある (図4A)。いわゆるGXGXXGモチーフ (Gはグリシン、Xは他のアミノ酸) と呼ばれる共通配列、そしてその直前4アミノ酸はアラニン

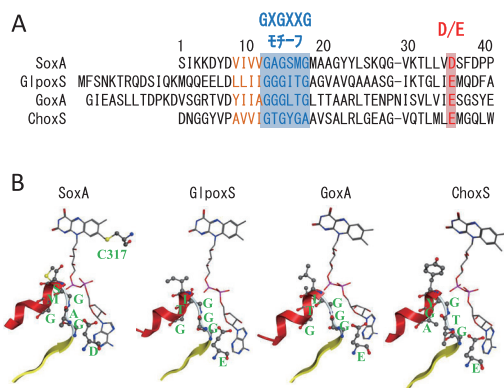


図4 FAD結合オキシダーゼのアミノ末端における共通構造
SoxA, GlpoxS, GoxA, ChoxSは、それぞれ *Arthrobacter*, *Streptococcus*, *Aspergillus*, *Streptomyces* 由来の酵素を示している。(A) アミノ末端のアミノ酸配列の比較を表す。青、オレンジ、赤のアミノ酸は、それぞれ GXGXXGモチーフおよび直前の疎水性アミノ酸配列、モチーフ後位の酸性アミノ酸を示している。(B) アミノ末端構造とFADとの相互作用を表す。関連するアミノ酸の構造をBall and Stickで、FADの構造をStickで示している。

(A) やバリン (V)、ロイシン (L)、イソロイシン (I)、チロシン (Y) といった疎水性のアミノ酸、モチーフの後ろには17~18アミノ酸をはさんで酸性アミノ酸のアスパラギン酸 (D) かグルタミン酸 (E)、といった形が全てに見られる [*Streptomyces*属放線菌由来Chox (ChoxS)のみGXGXXGモチーフが完全一致ではない]。この部分は立体構造も極めて類似しており (図4B)、モチーフを中央に前半がβシート、後半

がαヘリックスとなっている。図4Bに示すように、それぞれの酵素はここでFADのADP部分 (図1) を根元から支える状態になっていて、活性中心のフラビン環とは遠く離れているがFADと酵素との結合に重要な役割を果たすと予想される。

このアミノ末端類似領域のアミノ酸の変異を系統的に作成し調査した研究は意外と見当たらないが、われわれはSoxAにて変異解析を行った (表2)。結果として、活性中心から離れているGXGXXGモチーフやD/Eの変異が、予想通り酵素活性に大きな影響を及ぼすことを確認した⁹⁾。モチーフの最初のGおよび二番目のGをAに変えただけで酵素活性は失われ、三番目のGをAに変えると相対活性はわずかに約0.4%残るのみであった。Gの間のアミノ酸についても同様に活性の大幅な低下や失活が見られ、モチーフの構造維持が酵素内におけるFADの有効な結合に極めて重要であることが分かった。ちなみにわれわれは、これらの変異の一部については塩素イオンなどのハロゲンイオンを添加すれば活性がほとんど回復することを発見した^{9),10)}。また、NaClのサルコシンオキシダーゼ安定化効果についても、詳細に研究し報告した^{11),12)}。その後、サルコシンオキシダーゼのX線構造解析が進み、立体構造のすべてにおいて酵素とFADの間に塩素イオンが見出されたことから、FADの安定化効果を納得した次第である¹³⁾。現在では、NaClはサルコシンオキシダーゼおよびクレアチニン測定試薬の安定化剤として広く活用されている。

モチーフ後方のDは、アスパラギン (N) に変えただけで相対活性が約1/100となり、この位置の負電荷の重要性が示された。また、

表2 FAD結合に関わるアミノ酸残基の変異効果 (SoxA)

変異	ポジション	モチーフ	相対活性 (%)	変異	ポジション	モチーフ	相対活性 (%)
—	—	GAGSMG	100	アラニン→ロイシン	13	GKGSMD	0
グリシン→アラニン	12	AAGSMG	0	グリシン→アラニン	14	GAASMD	0
アラニン→バリン	13	GVGSMG	78	グリシン→アラニン	17	GAGSMA	0.39
アラニン→ロイシン	13	GLGSMG	4.7	アスパラギン酸→アスパラギン	35	GAGSMG	1.1
アラニン→チロシン	13	GYGSMG	2.5	アスパラギン酸→アラニン	35	GAGSMG	0
アラニン→グルタミン酸	13	GDGSMG	0	システイン→セリン	317	GAGSMG	0.28

C317のSへの置換は相対活性を約0.3%へと大幅減少させてしまう(表2)。これは前述の通り、C317とFADとの共有結合を無くしたため酵素とFADの結合が脆弱となったことに起因する。

V. 基質における個性

FAD結合に関する類似性を有するこれらの酵素の基質は、当然のことながら全く異なる。ただ、Sox、Glpox、Goxの基質はどれも水によく溶けるが、Choxのみ基質のコレステロールは疎水性で水になかなか溶けない。したがって、Choxの活性を測定する際にはコレステロールを非イオン性界面活性剤やアルコールと共に水溶解する。Choxには活性中心を蓋のように覆う大きな疎水性のループ構造が存在する(図5A)。ここには、V、L、フェニルアラニン(F)、トリプトファン(W)といった疎水性の高いアミノ酸が集まっている。われわれの検討では、コレステロールを溶解する界面活性剤の疎水性が高まると酵素活性が減少した(図5B)¹⁴⁾。さらに、疎水性ループ構造のVをAに変えただけで界面活性剤で溶解したコレステロールに対する反応性が低下し、一方アルコールに溶解したコレステロールに対する反応性は変化しなかった¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。つまり、疎水性ループ構造が界面活性剤のミセルに存在するコレステロールを酵素へと取り込む役割を果たし、ループの疎水性の低下は酵素機能の低下に繋がることを示唆している。

VI. おわりに

生化学検査薬にとって酵素は主成分であり、それぞれが応用を考える上で非常に興味深い類似性と個性を有している。本稿はFAD結合オキシダーゼについて解説したが、さまざまな酵素グループの類似性と個性を理解することで、生化学検査の理解が深まり、さらなる改良も進むであろう。酵素は他の成分と異なり、反応温度やpH、保存温度や水溶液の塩濃度などさまざまな環境要因の小さな変化によって状態が変化し、反応触媒能力も変化する。非常にデリケートで、完全に使いこなすにはまだまだ人知に不足があり、今後共基礎的研究の成果を速やかに

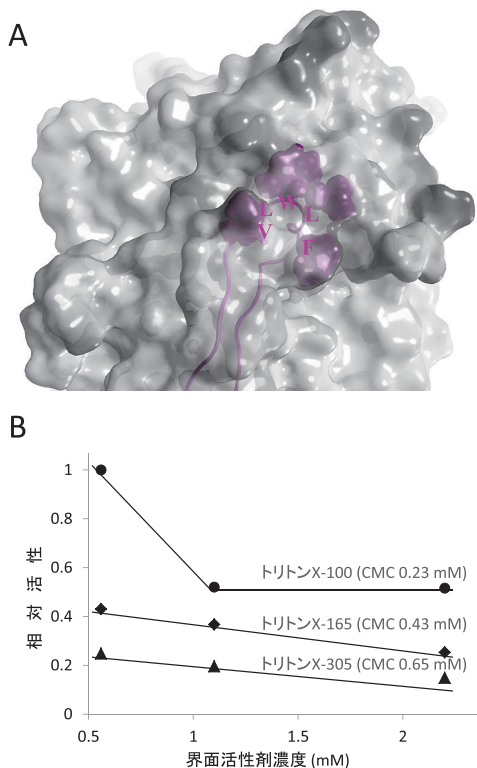


図5 疎水性基質と酵素との反応 (ChoxS)
(A) ChoxSの活性中心付近の表面構造を表す。最前面には、基質取り込みに重要な役割を果たす大きな疎水性ループ構造を示している。ループ構造先端の疎水性アミノ酸の位置も表記している。(B) 基質溶解に必要な界面活性剤の反応液中濃度と、酵素の相対活性との関係を示している。

検査薬に活用する必要がある。

【文献】

- 1) 今中忠行監修：微生物利用の大展開 (分担執筆) 西矢芳昭：酵素を用いる生体成分分析と診断薬としての利用－酵素的測定法, 1046-1051, エヌ・ティー・エス, 東京, 2002.
- 2) 西矢芳昭、山本和巳、川村良久、愛水重典：臨床検査薬用酵素の実用化技術の展開：クレアチニン分解酵素群の開発. 日本農芸化学会誌, 75: 857-862, 2001.
- 3) Nishiya Y, Hibi T, and Oda J: The full DNA sequence of the gene encoding the diagnostic enzyme *Bacillus* uricase. J Anal Bio-Sci, 23: 443-446, 2000.
- 4) Hibi T, Hayashi Y, Fukada H, Itoh T, Nago T, and

- Nishiya Y: Intersubunit salt bridges with a sulfate anion control subunit dissociation and thermal stabilization of *Bacillus* sp. TB-90 urate oxidase. *Biochemistry*, 53: 3879-3888, 2014.
- 5) Hibi T, Kume A, Kawamura A, Itoh T, Fukada H, and Nishiya Y: Hyperstabilization of tetrameric *Bacillus* sp. TB-90 urate oxidase by introducing disulfide bonds through structural plasticity. *Biochemistry*, 55: 724-732, 2016.
 - 6) Zhao G, Song H, Chen Z, Mathews FS, and Jorns MS: Monomeric sarcosine oxidase: Role of histidine 269 in catalysis. *Biochemistry*, 41: 9751-9764, 2002.
 - 7) Nishiya Y: A mutant sarcosine oxidase in which activity depends on flavin adenine dinucleotide. *Prot Exp Pur*, 20: 95-97, 2000.
 - 8) Sawasaki T, Hasegawa Y, Tsuchimochi M, Kamura N, Ogasawara T, Kuroita T, Endo Y: A bilayer cell-free protein synthesis system for high-throughput screening of gene products. *FEBS lett*, 514: 102-105, 2002.
 - 9) Nishiya Y and Imanaka T: Analysis of interaction between the *Arthrobacter* sarcosine oxidase and the coenzyme flavin adenine dinucleotide by site-directed mutagenesis. *Appl Environ Microbiol*, 62: 2405-2410, 1996.
 - 10) Nishiya Y, Kawamura Y, and Imanaka T: Enzymatic assay for chloride ion with chloride-dependent sarcosine oxidase created by site-directed mutagenesis. *Anal Biochem*, 245: 127-132, 1997.
 - 11) Nishiya Y and Kawamura Y: Effects of chloride ion on activity and stability of sarcosine oxidase. *J Anal Bio-Sc*, 20: 375-377, 1997.
 - 12) Sugimoto H, Nishiya Y, Miyake H, and Tanaka A: Stabilization mechanism of chloride ion on thermal denaturation of *Arthrobacter* sarcosine oxidase. *Netsu Sokutei*, 35: 76-80, 2008.
 - 13) Trickey P, Wagner MA, Jorns MS, and Mathews FS: Monomeric sarcosine oxidase: structure of a covalently flavinylated amine oxidizing enzyme. *Structure*, 7: 331-345, 1999.
 - 14) Nishiya Y, Yamashita M, Murooka Y, Fujii I, and Hirayama N: Effect of non-ionic detergents on apparent enzyme mechanism: V121A mutant of *Streptomyces* cholesterol oxidase endowed with enhanced sensitivity towards detergents. *Prot Eng*, 11: 609-611, 1998.
 - 15) 西矢芳昭、室岡義勝：機能改変コレステロールオキシダーゼの開発と応用（〈特集〉実用的酵素の創製）。*生物工学会誌*, 77: 429-432, 1999.
 - 16) 小宮山眞監修：酵素利用技術体系（分担執筆）西矢芳昭、川上文清：コレステロール測定試薬とコレステロールオキシダーゼ, 593-596, エヌ・ティー・エス, 東京, 2010.