

〈原著〉

## 酵素立体構造および反応予測に基づく 尿素窒素のダブルカイネティックアッセイの考察

西矢 芳昭

### Consideration of a double kinetic assay for urea nitrogen determination based on enzyme 3D structure and reaction prediction

Yoshiaki Nishiya

**Summary** An enzymatic kinetic assay for urea nitrogen determination using urease (EC 3.5.1.5) and leucine dehydrogenase (LeuDH, EC 1.4.1.9) is already in widespread use. Because of the extremely high  $K_m$  value of LeuDH for ammonium ions, the method has application as an automated double kinetic assay. Here, a closed 3D structure model of LeuDH was constructed by homology modeling, and subsequently compared with the open structure and with other closed forms of amino acid dehydrogenases. As a result, lowered substrate affinity of LeuDH adapted to the assay method was predicted by structural interpretation of the narrowing of the active site entrance of the closed form of LeuDH. Changes to  $K_m$  values were also predicted for enzyme-substrate complexes. The excellent suitability of LeuDH for use in diagnostic reagents, and its tolerance for changes in characteristics, were demonstrated by simple simulations of sequential enzyme reactions.

**Key words:** Urea nitrogen, Double kinetic assay, Leucine dehydrogenase, Structure model, Reaction simulation

#### I. 緒言

ダブルカイネティックアッセイ (DKA) は、まず第1試薬と試料中物質との反応時に生じる吸光度変化速度を測定し、次いで第2試薬を添加した後生じる吸光度変化速度との差分か

ら、目的とする成分の量を算定する方法である<sup>1)</sup>。尿素窒素測定の場合、試料中に含まれるアンモニア (アンモニウムイオン) による測定誤差がしばしば経験されている。この問題の解決手法として第1試薬でのアンモニア消去があるが、よりシンプルな手法としてDKAが汎用

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17-8

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

受付日：2018年3月21日

採択日：2018年4月25日

されている。DKAはアンモニアを消去するのではなく、その量をレートアッセイで測定し主反応から差し引くことで影響を回避する<sup>2)</sup>。Fig. 1に、尿素窒素のDKAの原理を示す。すなわち、第1試薬にロイシンデヒドロゲナーゼ (LeuDH) と2-ケトイソカプロン酸 (2-KIC) および NADHを使用し、試料中アンモニアとの反応で生じる紫外部吸光度減少速度を第1反応として測定する。次に、ウレアーゼを含む第2試薬を添加後、第2反応として尿素由来のアンモニアと試料中アンモニアの総計を、第1反応と同様にレートアッセイで測定する。第1反応と第2反応の差分から、自動分析装置の演算機能により試料中の尿素窒素量が算定される。

尿素窒素のDKAでは厳密なレートアッセイを要求するため、追随酵素であるLeuDHのアンモニアに対する親和性が重要なポイントとなる。基質親和性の議論には酵素の立体構造が欠かせないが、LeuDHは基質の無いオープン構造が既に決定されている<sup>3)</sup>。しかしながらクローズド構造、とりわけアンモニアと反応するLeuDH-NADH-2-KICクローズド構造の情報が無いため、アッセイに資する構造的議論がなされていない。

また、使用酵素の基質親和性に関する情報は、酵素反応シミュレーションに基づく検査反応予測へ直接貢献する。これまで、AST検査やクレアチニン検査などの反応シミュレーションと酵素機能の改良を関連づける試みが行われてきた<sup>4),5)</sup>。尿素窒素測定のDKA反応シミュレーションは、LeuDHの基質親和性に関する機能改変を考察・デザインする上で、大いに役立つだろう。

本報では、DKAによる尿素窒素測定に対し、

使用酵素LeuDHのクローズド構造モデルをホモロジーモデリングにより構築し、DKA適応性について考察した。さらに、連鎖一次反応シミュレーションにより測定反応を予測し、考察を深めたので報告する。

## II. 材料及び方法

### 1. LeuDH立体構造の構築

LeuDHアミノ酸配列のホモロジーサーチとマルチアライメント、およびホモロジーモデリングによるクローズド立体構造モデルの構築は、ソフトウェアMOE (Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada) を用いて行った。LeuDHの給源は、すでにオープン構造が解明されている*Lysinibacillus sphaericus* (旧名*Bacillus sphaericus*) とした<sup>3)</sup> (本LeuDHのアミノ酸残基: 364, アミノ酸配列のUniProt ID: Q7SIB4, オープン構造のPDB ID: 1LEHa)。ホモロジーモデリングのベース構造は、*Rhodococcus*属由来のフェニルアラニンデヒドロゲナーゼ (PheDH) のクローズド構造<sup>6)</sup> (PDB ID: 1C1Da) を用いた。1C1Daの分解能は1.25 Å、LeuDHとの相同性は37.3%であった。ホモロジーモデリングの中間モデル構造数は100に設定し、最終モデル構造を導いた。

LeuDHのクローズド構造モデルを改善するため、エネルギー極小化計算を行い、ラマチャンドラプロットを見たところ、アウトライアーが1アミノ酸残基のみ確認された。本残基Glu-93は活性中心から離れた反対側にあり、側鎖が表面に出ているため、活性中心の考察に直接関係しないと判断した。最終モデル構造の1C1DaとのC $\alpha$ 原子位置の平均二乗偏差 [root mean

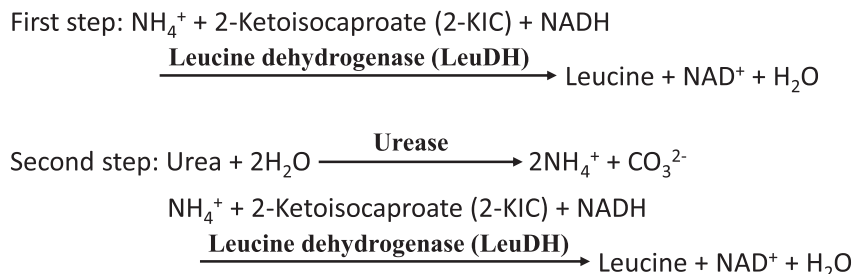


Fig. 1 DKA method for urea nitrogen determination.

square deviation for atomic  $C\alpha$  positions; RMSD( $C\alpha$ )] は、 $1.30\text{\AA} / 344$ アミノ酸残基と見積もられた。

## 2. 酵素-基質複合体の作成と比較

LeuDHクローズド構造の酵素-基質複合体は、MOEにて以下の手順にてNADHおよび2-KICをドッキングすることで作成した。ドッキングシミュレーションに使用した化合物の分子構造は、PubChemデータベース (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) より得た。

まず、NADHおよびL-フェニルアラニンの両リガンドを含む1C1Daとクローズド構造を重ね合わせた。次に、L-フェニルアラニンと2-KICをカルボン酸、 $C\alpha$ および $C\beta$ にてフィッティングし、LeuDH-NADH-2-KIC複合体を作成した。水素付加および部分電荷割り付けを行い、エネルギー極小化計算によりクローズド構造を改良した。本酵素-基質複合体の元構造とのRMSD( $C\alpha$ )は、 $1.03\text{\AA} / 346$ アミノ酸残基と見積もられ、構造中にアウトライアーは無かった。

## 3. DKAのシミュレーション

ウレアーゼおよびLeuDHを用いた尿素窒素のレートアッセイは、マイクロソフトエクセルを使用してシミュレーションした。具体的には、ミカエリス-メンテン速度式に基づき、NADH量の減少を0.1秒毎に計算し、グラフ化した。アッセイ条件は、検体液量15  $\mu\text{L}$ 、第1試薬 (LeuDH: 6 U/mL, 2-KIC: 3 mM, NADH: 0.2 mM) 300  $\mu\text{L}$ 、第2試薬 (ウレアーゼ: 100 U/mL, LeuDH: 14 U/mL, 2-KIC: 3 mM, NADH: 0.2 mM) 100  $\mu\text{L}$ とした<sup>2),7)</sup>。ウレアーゼの尿素に対する $K_m$ 値、LeuDHのアンモニア、2-KICおよびNADHに対する $K_m$ 値は、それぞれ10.5、100-800、0.31および0.035 mMとした (Toyobo biochemical department/Enzyme product list, [http://www.toyobo-global.com/seihin/xr/enzyme/e\\_top.html](http://www.toyobo-global.com/seihin/xr/enzyme/e_top.html))。

## III. 結果及び考察

### 1. 尿素窒素のDKAとLeuDH立体構造

構築した*L. sphaericus*由来LeuDH-NADH-2-KICクローズド構造複合体を、*L. sphaericus*由

来LeuDHオープン構造 (1LEHa) と重ね合わせたところ、RMSD( $C\alpha$ )は $4.47\text{\AA} / 346$ アミノ酸残基と大きな値が見積もられた。Fig. 2に示す通り、LeuDHはクローズド構造への移行で活性中心を支点とする領域が大きく狭まった。さらに、各アミノ酸残基の $C\alpha$ 原子についてオープン構造とクローズド構造とでRMSDを比較したところ (Fig. 3)、末端を除いてRMSDが9

以上の残基を6箇所確認した (Glu-21, Ala-89, Asp-90, Gly-141, Ser-142, ならびにSer-168)。これらは、いずれもターン構造の頂部に位置しており、酵素構造が閉じる際の支点を中心とした最外殻付近に存在すると考えられる。

尿素窒素のDKAにとっては、LeuDHクローズド構造のアンモニアに対する親和性が重要である。そこで、クローズド構造の活性中心周辺の表面構造を見たところ、アンモニア分子が触媒部位に近づくためのエンタランスは極めて狭

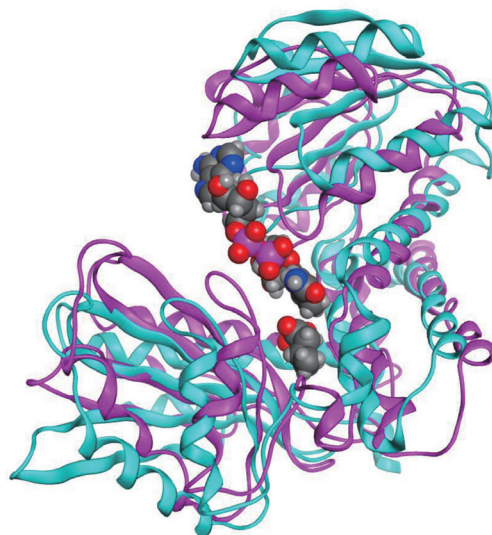


Fig. 2 Superposition of model structures of the *L. sphaericus* LeuDH. The superposition of open and closed forms, which are colored cyan and magenta, respectively, was performed using the MOE software. NADH and 2-KIC are represented as space-filling structures. Hydrogen, carbon, nitrogen, oxygen, and phosphorus atoms are shown in light grey, dark grey, blue, red, and pink, respectively.

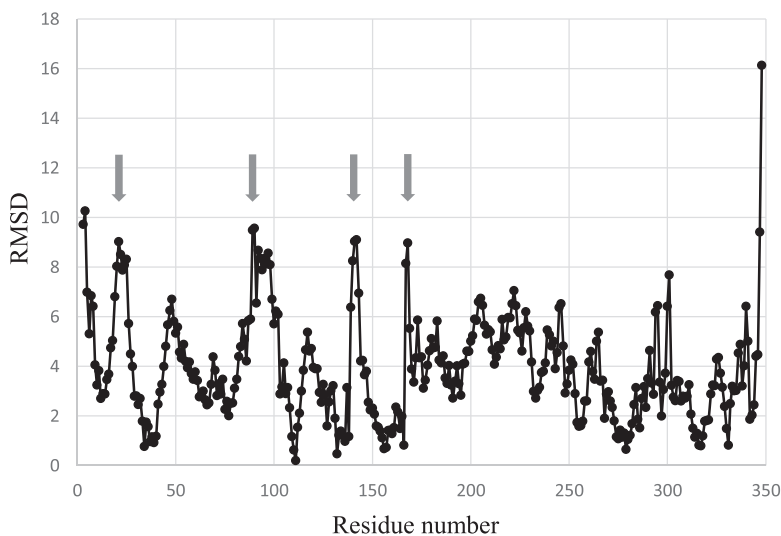


Fig. 3 Distribution of RMSD between open and closed structures. Residues in which RMSD are 9 or more are shown by arrows.

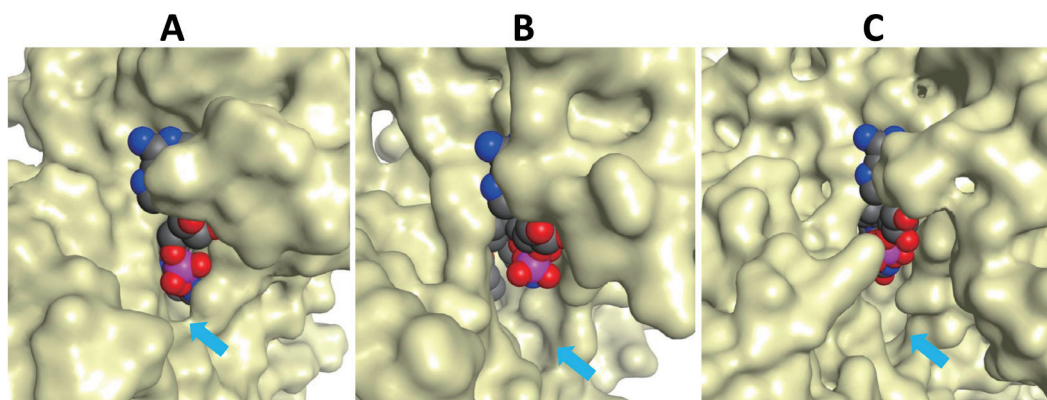


Fig. 4 Comparison of active site surface structures of three closed forms (A: LeuDh, B: PheDh, C: GluDH). Substrates are represented as space-filling structures. Carbon, nitrogen, oxygen, and phosphorus atoms are shown in grey, blue, red, and pink, respectively. The active site entrances are shown by arrows.

いことが分かった (Fig. 4A)。このエントランスの状態が、本酵素のアンモニアに対する親和性の低さ<sup>2),8)</sup> ( $K_m$ 値: 200-500 mM) の原因と考えられた。

## 2. 種々のアミノ酸脱水素酵素クローズド構造の比較

アンモニア反応性と構造との相関を明らかにするため、LeuDhのクローズド構造を他のアミノ酸脱水素酵素のクローズド構造と比較した

(Fig. 4)。結果として、エントランスの様子とアンモニア親和性は明確な関連を示した。*Rhodococcus*属由来PheDHのアンモニアに対する $K_m$ 値は約47 mM<sup>9)</sup>で、そのクローズド構造のエントランスはLeuDhより拡がっていた (Fig. 4B)。一方、牛由来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GluDH) のクローズド構造<sup>9)</sup> (PDB ID: 3JD1) のエントランスもLeuDhより拡がりがあったが、PheDHと比較すると狭くなった (Fig. 4C)。牛由来GluDHのアンモニアに対する $K_m$ 値

は3.2-18 mM (Enzyme database BRENDA, <http://www.brenda-enzymes.org>) で、PheDHとの比較ではエントランスの拡がりと親和性とが対応しない。これは、すでにクロズド構造に結合している基質2-オキソグルタル酸がカルボン酸を2つ有しており、その高いマイナス電荷がプラス電荷のアンモニウムイオンに対する親和性向上に寄与したと考えられる。

3. アンモニア親和性とDKAシミュレーション  
 「材料及び方法」記載の条件にて作成したDKAシミュレーターを用いて、LeuDhのアンモニアに対する $K_m$ 値と反応タイムコースとの関係をシミュレーションした (Fig. 5)。 $K_m$ 値が100、200、400および800 mMの際のタイムコースを比較したところ、血清中尿素窒素の基準値

上限 (21 mg/dL) に近い20 mg/dL濃度検体の測定では、 $K_m$ 値の影響は見られなかった (Fig. 5A)。しかしながら、高度上昇値である尿素窒素60 mg/dL濃度検体の測定では、 $K_m$ 値100および200 mMの場合は第2反応 (第2試薬添加後の反応) において良好なタイムコースを得ることができなかった (Fig. 5B)。一方、第1反応 (検体と第1試薬でのアンモニア測定反応) では、アンモニア高度上昇検体でも $K_m$ 値の影響が全く認められなかった (Fig. 5C)。

このように、もしLeuDhの $K_m$ 値を人為的に適当な値に変換できれば、DKAの希望する性能 (測定感度やダイナミックレンジなど) への適合に繋がると考えられる。酵素の立体構造に基づく変異体のデザインにより、プロテイン・

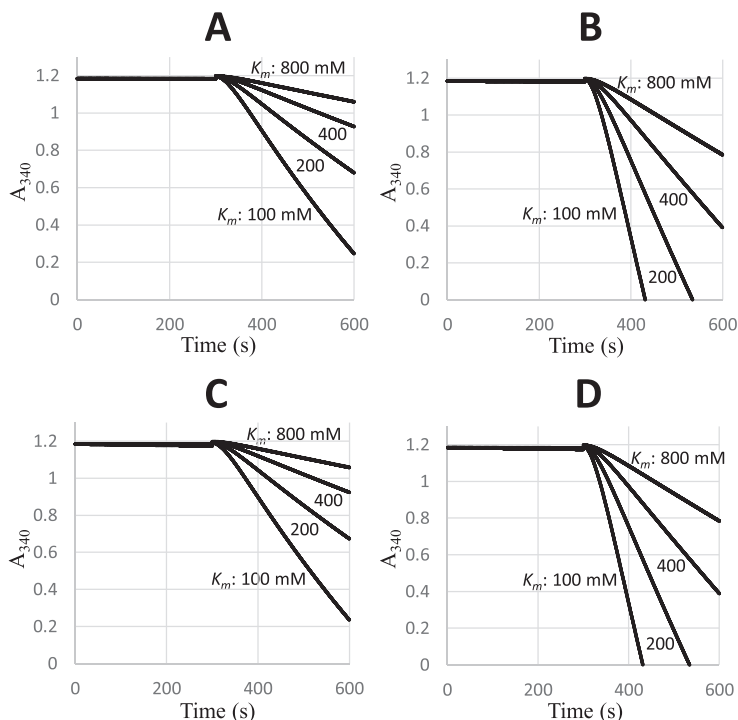


Fig. 5 Simulation of DKA assays. It was assumed that the assay reagent 1 (300  $\mu$ L) and sample (15 $\mu$ L) were mixed and incubated at 37 $^{\circ}$ C for 5 min, and then the assay reagent 2 (100 $\mu$ L) was added and incubated at 37 $^{\circ}$ C for 5 min. Time courses of the reactions were compared when the  $K_m$  values of LeuDh for ammonia were 100-800 mM. The assumed concentrations of urea nitrogen and ammonia in the samples were altered (A: 20 and 0.08 mg/dL, B: 60 and 0.08 mg/dL, C: 20 and 0.24 mg/dL, and D: 60 and 0.24 mg/dL, respectively).

エンジニアリングで臨床検査用酵素の機能を目的の方向に改変することが可能となりつつある。

LeuDHにおいても、本研究にて構築したクローズド構造モデルに基づく最適なアンモニア親和性を有する変異体のデザインが可能になった。例えば、クローズド構造のエントランスを形成するGlu-114やAsn-183を適当なアミノ酸に変更することで、エントランスの拡がりが大きく変化しアンモニア親和性の改変に繋がると予想される (Fig. 6)。本論文で行った臨床検査用酵素の構造予測と検査反応のシミュレーション、これら両面からの考察は新たな酵素開発の戦略となり得るだろう。

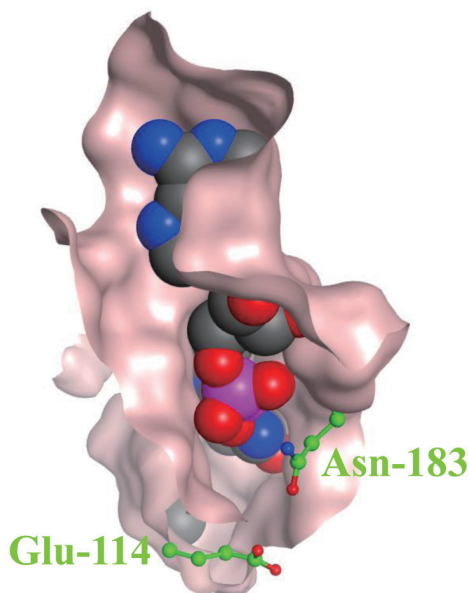


Fig. 6 Close-up views of the active site regions of LeuDH surface structure. NADH and 2-KIC are represented as space-filling structures. The Glu-114 and Asn-183 residues are represented as ball and stick structures.

#### 文献

- 1) Abe A, Nishimura T, Noma A, and Hamano K: Automated measurement of amylase isoenzymes by a double kinetic assay with "blocked" p-2-chloro-4-nitrophenyl maltopentaoside as substrate and with wheat germ inhibitor. *Clin Chem*, 37: 1345-1349, 1991.
- 2) Morishita Y, Nakane K, Fukatsu Y, Nakashima N, Tsuji K, Soya Y, Yoneda K, Asano S, and Kawamura Y: Kinetic assay of serum and urine for urea with use of urease and leucine dehydrogenase. *Clin Chem*, 43: 1932-1936, 1997.
- 3) Baker, PJ, Turnbull, AP, Sedelnikova, SE, Stillman, TJ, and Rice, DW: A role for quaternary structure in the substrate specificity of leucine dehydrogenase. *Structure*, 3: 693-705, 1995.
- 4) Nishiya, Y and Shimozawa, Y: Properties of *Geobacillus stearothermophilus* malate dehydrogenase used as a diagnostic reagent and its characterization by molecular modeling. *Int. J. Anal. Bio-Sci.*, 4: 21-27, 2016.
- 5) Nishiya, Y, Yamamoto, M, Takemoto, J, Kano, S, and Nakano, S: Monomeric sarcosine oxidase exhibiting high substrate affinity and thermostability. *Int. J. Anal. Bio-Sci.*, 4: 55-62, 2016.
- 6) Brunhuber, NM, Thoden, JB, Blanchard, JS, Vanhooke, JL: *Rhodococcus* L-phenylalanine dehydrogenase: kinetics, mechanism, and structural basis for catalytic specificity. *Biochemistry*, 39: 9174-9187, 2000.
- 7) 特許第4016296号.
- 8) Ohshima, T, Misono, H, and Soda, K: Properties of crystalline leucine dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*. *J Biol Chem*, 253: 5719-5725, 1978.
- 9) Borgnia, MJ, Banerjee, S, Merk, A, Matthies, D, Bartesaghi, A, Rao, P, Pierson, J, Earl, LA, Falconieri, V, Subramaniam, S, Milne, JL: Using Cryo-EM to Map Small Ligands on Dynamic Metabolic Enzymes: Studies with Glutamate Dehydrogenase. *Mol Pharmacol*, 89: 645-651, 2016.