

環形動物グアニジノキナーゼの多様性. 多毛類 *Capitella* sp.の細胞質型タウロシアミンキナーゼの遺
伝子合成と完全な酵素パラメータ

Diversity in Annelid Guanidino Kinases. DNA Synthesis and Complete Kinetic Parameters of
Cytoplasmic Taurocyamine Kinase from the Polychaete *Capitella* sp.

八木華奈子・鈴木知彦

Kanako Yagi and Tomohiko Suzuki

〒780-8520 高知市曙町 2-5-1

高知大学理工学部比較生化学研究室

Laboratory of Comparative Biochemistry, Faculty of Science and Technology, Kochi University,
Kochi 780-8520 Japan

Key Words; guanidino kinase, phosphagen kinase, *Capitella* sp., enzyme activity, taurocyamine
kinase.

要約

多毛類 *Capitella* sp. は全ゲノムが解読されており、その情報から少なくとも2種類（細胞質型とミトコンドリア型）のグアニジノキナーゼが存在していることが分かっている。その酵素活性は同定されていないが、アミノ酸配列からはロンブリシンキナーゼ（LK）の可能性が指摘された。今回の研究では、*Capitella* のリコンビナント細胞質型酵素を用いて、その活性を明確にすることを目的にした。まず、そのアミノ酸配列に基づき28本のDNAオリゴマーを設計し、オーバーラップ・エクステンションPCR法により遺伝子を全合成した。次に、この遺伝子をプラスミドに組み込み、大腸菌内でリコンビナント酵素を発現させた。酵素はHis-tagを用いて精製した。利用できる4種類のグアニジノ基質（クレアチン、アルギニン、グリコシアミン、タウロシアミン）を用いて酵素活性測定を行ったところ、タウロシアミンについてのみ強い活性を示した。次に、異なる64点の基質濃度において酵素活性を測定し、完全な酵素パラメータ（4種類の解離定数： K_a^{Tau} , K_{ia}^{Tau} , K_a^{ATP} , K_{ia}^{ATP} , 及び k_{cat} ）を計算した。ATP存在下の酵素と基質タウロシアミンの親和性を示すパラメータ（ K_a^{Tau} ）は 1.06 ± 0.125 mM であると決定され、この値は環形動物の他のタウロシアミンキナーゼ（TK）酵素の値（0.881-4.01 mM）と同等であり、*Capitella* 酵素は主活性としてTK活性を持つことが分かった。また、タウロシアミンに対して副活性を示す *Eisenia* LK では、その K_a^{Tau} は 15.3 mM であり、*Capitella* 酵素（1.06 mM）よりも10倍以上親和性が低い。このことも、*Capitella* 酵素がLKではなくTKであることの傍証となる。今回の結果から、*Capitella* 細胞質型酵素は、アミノ酸配列から予想されていたロンブリシンキナーゼではなく、タウロシアミンキナーゼであると結論される。

Abstract

The genomic data suggest that two types of guanidino kinases, cytoplasmic form and mitochondrial form, are present in the polychaete *Capitella* sp. The derived amino acid sequences of the enzymes have a similarity with those of lombricine kinases, although the enzyme activity has not been determined. The purpose of this work is

to identify the substrate specificity of the *Capitella* cytoplasmic enzyme. In this report, we synthesized the DNA of *Capitella* cytoplasmic enzyme with overlap extension PCR, and the recombinant enzyme was expressed in *E. coli*. The purified enzyme showed activity only for taurocyamine among the four guanidino substrates, creatine, arginine, glycoamine and taurocyamine examined. Based on the measurements under 64 different substrate concentrations, full kinetic parameters (4 dissociation constants : K_a^{Tau} , K_{ia}^{Tau} , K_a^{ATP} , K_{ia}^{ATP} , and the catalytic constant: kcat) for the *Capitella* TK enzyme were determined. The K_a^{Tau} value, representing the affinity for the substrate taurocyamine in the presence of ATP, was determined to be 1.06 ± 0.125 mM, which is comparable to those (0.881–4.01 mM) of other annelid TKs from *Arenicola* and *Riftia*. On the other hand, *Eisenia* LK shows activity not only for the main substrate lombricine, but also taurocyamine. However, the K_a^{Tau} of *Eisenia* LK is reported to be 15.31 ± 0.75 mM, indicating that *Eisenia* LK has 10-fold or more weaker affinity than *Capitella* enzyme. Thus, the *Capitella* enzyme is concluded to be taurocyamine kinase (TK), but not lombricine kinase (LK) as suggested from its amino acid sequence.

序論

グアニジドキナーゼ（フォスファゲンキナーゼ）は、ATPのリン酸基をグアニジド化合物に転移させ、ADPとリン酸化された高エネルギーグアニジド化合物（フォスファゲン）を生成する反応を可逆的に触媒する酵素である。この酵素群は、ATP需要の多い組織や細胞で強く発現しており、細胞内のATP濃度を一定に保つ役割を果たしている [Watts, 1971]。グアニジノキナーゼは、使用する基質の違いにより、アルギニンキナーゼ（AK）、クレアチンキナーゼ（CK）、ロンブリンキナーゼ（LK）、タウロシアミンキナーゼ（TK）、グリコシアミンキナーゼ（GK）、ハイポタウロシアミンキナーゼ（HTK）、サラセミンキナーゼ（ThaK）、オフェリンキナーゼ（OK）等に分類される [Van Thoai, 1968; Watts, 1971; Suzuki et al., 1997; Ellington & Suzuki, 2006 and 2007]。これらの酵素の分布には大きな特徴があり、脊椎動物ではCK、節足動物や軟体動物ではAKなどほとんどの分類群が単一もしくは少数の種類の酵素を含むのに対して [Uda et al., 2006]、環形動物及びそれに近縁な動物群には上記8種類の酵素が全て含まれている。すなわち、環形動物の系統においてグアニジノキナーゼ遺伝子が著しく多様化しているのである。環形動物内でもグアニジノキナーゼの特徴的な分布が見られる。多毛類においては上記酵素のうち6種類（AK, CK, TK, GK, ThaK, OK）が分布し [Van Thoai, 1968; Watts, 1971; Uda & Suzuki, 2007; Suzuki & Furukohri, 1994; Uda et al., 2005a]、貧毛類ではLKのみ [Suzuki et al., 1997; Doumen, 2012]、一方、ヒル類ではグアニジノキナーゼの報告はない。環形動物に近縁なユムシ類ではLK [Ellington & Bush, 2002]、ホシムシ類ではHTK [Uda et al., 2005b]の分布が見られる。

多毛類の一種 *Capitella* sp. は、しばしば環境汚染を示す指標性の生物として扱われており [菊池, 1979]、そのゲノム配列も判明している。我々は以前の研究で、*Capitella* ゲノム配列から2種類のグアニジノキナーゼを抽出し、アミノ酸配列の系統樹上の位置から、それらがLKである可能性を指摘した [Tanaka et al., 2007]。この研究では、*Capitella* 細胞質型リコンビナント酵素を発現させて、実際にその基質特異性を決定することを目的とする。

材料と方法

Capitella 細胞質型グアニジノキナーゼのアミノ酸配列データを基に、Web上のプログラム(DNAWorks v3)を用いて

28本のオリゴマーを設計した。尚、オリゴマー1には NdeI 配列が、オリゴマー28には 6 x His 配列と EcoRI 配列を付加した。設計したオリゴマー（各 50 μ M）を 1 μ L ずつ混合し、各オリゴマー濃度が 625 nM になるようなオリゴマー混合液(Template)を作製した。

上記の Template を 1 μ L 用い、10x KOD⁺ Neo Buffer : 2.5 μ L, 2 mM dNTP : 2.5 μ L, 25mM MgSO₄ : 1 μ L, DMSO : 1.25 μ L, 水 : 15.75 μ L, KOD⁺ Neo DNA Polymerase : 0.5 μ L を加えて First PCR を行った。PCR の条件は前報と同じである[土居ら, 2018]。First PCR 産物 1 μ L を Template として、10x KOD⁺ Neo Buffer : 2.5 μ L, 2 mM dNTP : 2.5 μ L, 25mM MgSO₄ : 1 μ L, DMSO : 1.25 μ L, Primer-1 : 1 μ L, Primer-28 : 1 μ L, 水 : 13.75 μ L, KOD⁺ Neo DNA Polymerase : 0.5 μ L を加えて Second PCR を行った。

次に、Second PCR 産物 (1,100 bp) の 3'末端に dA を付加し、pGEM-T easy ベクターに組み込んだ。塩基配列を確認した後、インサート DNA を切り出し、発現用プラスミド pET-30b の NdeI / EcoRI サイトに組み換えた。

このプラスミドで、大腸菌 BL-21 をトランスフォームし、*Capitella* リコンビナント酵素を、1 mM IPTG 存在下、18°C、24 時間発現させた。発現大腸菌は超音波により細胞を破碎し、可溶性の His-tag リコンビナント酵素は、Ni-NTA resin を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。

グアニジノキナーゼの酵素活性測定は、25°C において、反応にピルビン酸キナーゼ、乳酸脱水素酵素の反応をリンクさせ、最終的に NADH が NAD⁺ に変化する反応に置き換えて、340 nm で追跡した[Morrison & James, 1965]。

結果と考察

366 アミノ酸から構成されている *Capitella* 細胞質型グアニジノキナーゼのアミノ酸配列は、Tanaka et al. (2007) に記してある。Overlap extension PCR により、この酵素の DNA (約 1,100 bp) を合成した。First PCR 及び Second PCR の結果を Figure 1 に示した。1,100 bp の DNA を抽出して 3'末端に dA 付加を行なった後、pGEM にクローニングし、適切な塩基配列を持つクローンを選び出した。さらに、インサート DNA を pET ベクターの NdeI / HindIII サイトに組み込んだ。再度、この DNA 配列に変異が起こっていないことを確認した。

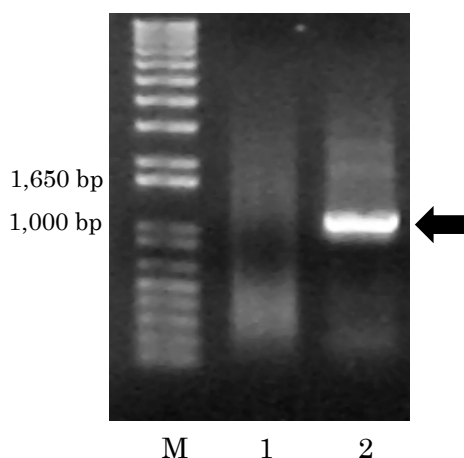


Figure 1 Overlap extension PCR の結果。M: Marker DNA, 1 : First PCR, 2 : Second PCR. 矢印は 1100 pb の DNA を示す。

pET ベクターに組み込んだ細胞質型グアニジノキナーゼ (C 末に His-tag を付加) 遺伝子を大腸菌 BL21 株中で発現さ

せた。リコンビナント酵素は、1.0 mM IPTG、18°Cで24時間の条件下で可溶性酵素が最も多く得られ、酵素は His-tag を用いたアフィニティカラムで精製した。精製のそれぞれの段階の SDS-PAGE を Figure 2 に示す。レーン5の酵素を、酵素活性測定に用いた。

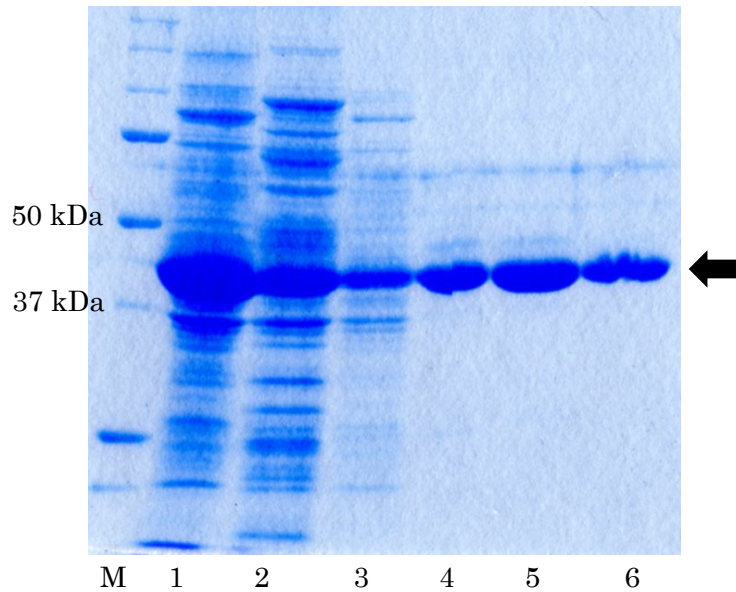


Figure 2 *Capitella* 細胞質型グアニジノキナーゼの精製過程の SDS-PAGE. 1：可溶性画分，2：不溶性画分，3：20 mM Imidazole 溶出画分，4：50 mM Imidazole 溶出画分，5：100 mM Imidazole 溶出画分（使用した酵素），6：150 mM Imidazole 溶出画分。矢印は分子量 42 kDa を示す。

精製されたリコンビナント酵素は、確認した4種類の基質（クレアチン、アルギニン、グリコシアミン、タウロシアンミン：最終濃度は 4.76 mM）のうち、タウロシアンミンにおいてのみ酵素活性を示し、それ以外に対しては全く活性を示さなかった。従って、暫定的に、*Capitella* 細胞質型グアニジノキナーゼはタウロシアンミンキナーゼ（TK）と判断した。

グアニジノキナーゼの正反応（フォスファゲン合成方向）は、二基質高速平衡ランダムオーダー反応速度論によって説明される[Morrison & James, 1965]. この反応の初速度 (v) は、2種類の基質濃度（ATP 及びグアニジノ基質（ここでは Taurocyamine））と5種類の酵素パラメータにより以下の式で表される。

$$v = \frac{V_{max}}{\frac{K_a^{ATP} \cdot K_{ia}^{Tau}}{[Tau][ATP]} + \frac{K_a^{ATP}}{[ATP]} + \frac{K_a^{Tau}}{[Tau]} + 1}$$

$$K_a^{Tau} \cdot K_{ia}^{ATP} = K_a^{ATP} \cdot K_{ia}^{Tau}$$

$$V_{max} = k_{cat}[E_0]$$

ここで、 K_a はもう一方の基質の存在下における当該基質の解離定数、 K_{ia} はもう一方の基質の非存在下における当該基質の解離定数、 k_{cat} は V_{max} から計算される触媒定数である。 E_0 は反応に用いた酵素濃度である。二基質速度論における上記5種類のパラメータ（4種類の解離定数： K_a^{Tau} 、 K_{ia}^{Tau} 、 K_a^{ATP} 、 K_{ia}^{ATP} 、及び k_{cat} ）を求めるために、64通りの異なる基質濃度において酵素反応を測定し（Figure 3）、それぞれの初速度から SigmaPlot12 を用いて、5種類のパラメータを算出した。この実験は3回繰り返す、それぞれの実験からパラメータ（Exp.1, Exp.2, Exp.3 in Table 1）を計算した。

得られたパラメータ間には、2倍程度の差異が見られた。この報告では、最も誤差の少ない酵素パラメータセット (Exp.2 in Table 1) を採用した。

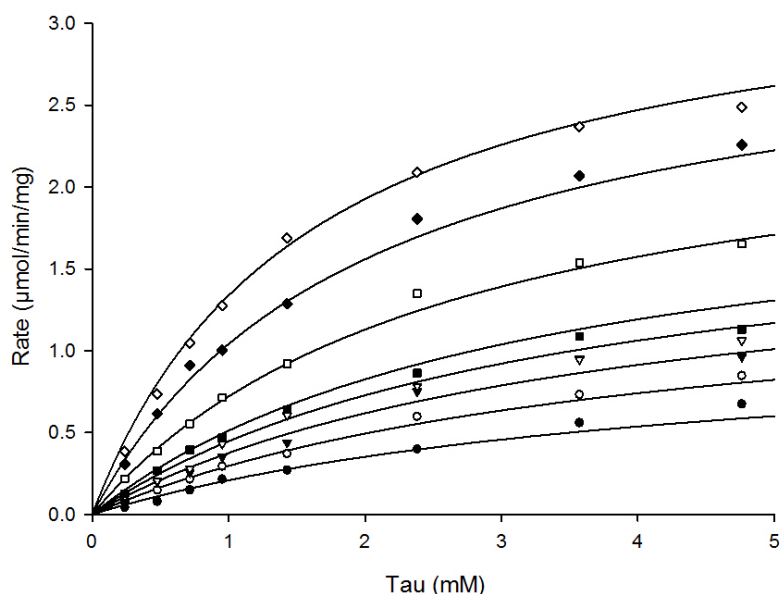


Figure 3 *Capitella* 細胞質型グアニジノキナーゼのタウロシアミンに対する酵素活性. 64 点の異なる基質濃度において酵素活性を測定した (Exp.2). 8 種類のカエリス・メンテン型酵素グラフの ATP 濃度は、上から、4.76, 2.38, 1.19, 0.714, 0.595, 0.476, 0.357, 0.238 mM である。酵素パラメータは SigmaPlot12 を使って算出した。

Table 1 に、今回の研究で決定した多毛類 *Capitella* 細胞質型 TK の酵素パラメータと、すでに報告されている多毛類 *Arenicola* TK と MiTK (細胞質型とミトコンドリア型)、深海チューブワーム *Riftia* MiTK (ミトコンドリア型)、及び貧毛類 *Eisenia* LK の基質タウロシアミンに対する酵素パラメータを比較した。尚、リコンビナント酵素の精製のために、*Capitella* TK では His-tag を、それ以外の酵素では MBP(マルトース結合タンパク質)-tag を使用している。

まず ATP 存在下におけるタウロシアミンに対する親和性 (K_a^{Tau}) を比較すると、*Capitella* TK では 1.06 mM (Exp.2 in Table 1) であり、この値は同じ多毛類の *Arenicola* MiTK (0.881 mM) と同等とみなすことができる。また、*Arenicola* 細胞質型 TK や *Riftia* MiTK の値は、タウロシアミンに対してより低い親和性 (それぞれ 4.01 mM 及び 2.12 mM) を示していることから、*Capitella* 酵素は明瞭にタウロシアミンキナーゼ (TK) であると結論できる。

また、タウロシアミンに対して副活性を示す *Eisenia* LK では、その K_a^{Tau} は 15.3 mM であり、*Capitella* 酵素 (1.06 mM) よりも 10 倍以上親和性が低い (Table 1)。このことも、*Capitella* 酵素が TK であることの傍証となる。

Table 1 タウロシアミンに対して活性を示すグアニジノキナーゼの酵素パラメータの比較. MiTK: ミトコンドリア型TK, それ以外の酵素は細胞質型.

Sources	Reference	Enzyme Tag	k_{cat} (1/s)	K_a^{Tau} (mM)	K_{ia}^{Tau} (mM)	K_a^{ATP} (mM)	K_{ia}^{ATP} (mM)	K_{ia}/K_a		
Polychaete	<i>Capitella</i> sp. TK	This work	Exp.1	6xHis	1.23 ± 0.026	0.64 ± 0.058	7.93 ± 1.37	0.23 ± 0.034	2.84 ± 0.31	12.39
			Exp.2	6xHis	2.57 ± 0.093	1.06 ± 0.125	5.83 ± 1.02	0.57 ± 0.085	3.16 ± 0.44	5.50
			Exp.3	6xHis	1.34 ± 0.062	1.06 ± 0.169	9.31 ± 3.32	0.27 ± 0.085	2.38 ± 0.45	8.78
	<i>Riftia pachyptila</i> MiTK	Uda et al. (2005c)	MBP		2.12 ± 0.459					
	<i>Arenicola brasiliensis</i> TK	Uda et al. (2005c)	MBP		4.01 ± 0.418					
	<i>Arenicola brasiliensis</i> MiTK	Tanaka et al. (2011)	MBP		0.881 ± 0.085					
Oligochete	<i>Eisenia foetida</i> LK	Tanaka et al. (2004)	MBP	7.28 ± 0.45	15.31 ± 0.75	81.79 ± 7.97	0.29 ± 0.056	1.67 ± 0.33	5.34	

高速平衡ランダム機構の二基質酵素反応における K_{ia}/K_a 値は、一方の基質の結合によって他方の基質結合が影響される度合い（基質結合の相乗効果）を表す。グアニジノキナーゼにおいては、通常、この値は1より大きく、最初の基質の結合が他方の基質結合を促進することを示している。*Capitella* TK 酵素においては、この値は5.50 (Exp.2 in Table 1) であり、強い相乗効果が推測される。

以前の研究で私たちは、アミノ酸配列の系統樹上で *Capitella* 酵素が *Arenicola* TK や *Riftia* TK のクラスターではなく *Eisenia* LK などが含まれるクラスターに含まれていたことを根拠に、この酵素はロンブリシンキナーゼ (LK) の可能性が高いと論じた[Tanaka et al., 2007]。また、グアニジノキナーゼの基質認識には、GS 領域と 95 位のグアニジノ基質認識アミノ酸が重要であることがわかっているが[Suzuki et al., 1997; Tanaka & Suzuki, 2004]、今回、*Capitella* 酵素のアミノ酸配列を詳細に検討した結果、GS 領域及び 95 位のアミノ酸は LK 型（それぞれ、5 残基欠損型及び Lys）であった。しかしながら、今回の研究で明らかになったように、*Capitella* 酵素は、他の TK 酵素と同様なタウロシアミンに対する強い親和性 ($K_a^{Tau} = 1.06$ mM) を持っている (Table 1)。*Capitella* 酵素については、現時点で、基質ロンブリシンの入手が難しいためにその K_a 測定に至っていない。しかし、*Eisenia* LK の主基質ロンブリシン及び副基質タウロシアミンの K_a 値（それぞれ、5.33 mM 及び 15.31 mM）[Tanaka et al., 2004]から判断すると、*Capitella* 酵素が、タウロシアミン (1.06 mM) を超える強い親和性をロンブリシンに対して示す可能性は限りなく低い。

Capitella 酵素のアミノ酸配列が LK に最も類似しているのに、主活性はタウロシアミンであろうことはおそらく確実である。これは、LK と TK 間のグアニジノ基質認識がごくわずかなアミノ酸残基の置換によって変換しうることを示唆している。また、TK 酵素は、環形動物以外でも原生生物[Uda et al., 2013; Palmer et al., 2013]や扁形動物[Jarilla et al., 2009]において独立に出現していることを考慮すると、グアニジノキナーゼ酵素群においては、タウロシアミンに対する基質特異性の獲得ルートが多様であると思われる。

謝辞

この研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金の助成（基盤 (C) 15K07151）により行われた。

引用文献

- Doumen, C. (2012) Variable intron/exon structure in the oligochaete lombricine kinase gene. *Gene* 505: 276-282.
- Ellington, W.R., Bush, J. (2002) Cloning and expression of a lombricine kinase from an echiuroid worm: insights into structural correlates of substrate specificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 939-944.
- Ellington, W.R., Suzuki, T. (2006). Evolution and divergence of creatine kinases. In *Molecular Anatomy and Physiology of Proteins – Creatine Kinase* (ed. C. Vial). New York: NovaScience pp.1-26. ISBN: 1-59454-715-7
- Ellington, W.R., Suzuki, T. (2007) Early Evolution of the Creatine Kinase Gene Family and the Capacity for Creatine Biosynthesis and Membrane Transport. In *Creatine and Creatine Kinase in Health and Disease* (Edited by Salomons, G. and Wyss, M.) pp.17-26. Springer: ISBN: 978-1-4020-6485-2
- Jarilla, B.R., Tokuhira, S., Nagataki, M., Hong, S-J., Uda, K., Suzuki, T., Agatsuma, T. (2009) Molecular characterization and kinetic properties of a novel two-domain taurocyamine kinase from the lung fluke *Paragonimus westermani*. *FEBS Lett.* 583: 2218-2224.
- Morrison, J. F., James, E. (1965) The mechanism of the reaction catalyzed by adenosine triphosphate-creatine phosphotransferase. *Biochem. J.* 97: 37-52.
- Palmer, A., Begres, B.N., Van Houten, J.M., Snider, M.J., Fraga, D. (2013) Characterization of a putative oomycete taurocyamine kinase: Implications for the evolution of the phosphagen kinase family. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 166: 173-181.
- Suzuki, T., Kawasaki, Y., Furukohri, T., Ellington, W.R. (1997) Evolution of Phosphagen Kinase VI. Isolation, characterization and cDNA-derived amino acid sequence of lombricine kinase from the earthworm *Eisenia foetida*, and identification of a possible candidate for the guanidine substrate recognition site. *Biochim. Biophys. Acta* 1343: 152-159.
- Suzuki, T., Furukohri, T. (1994) Evolution of phosphagen kinase. Primary structure of glycoamine kinase and arginine kinase from invertebrates. *J. Mol. Biol.* 237: 353-357.
- Tanaka, K., Matsumoto, T., Suzuki T. (2011) Identification of amino acid residues responsible for taurocyamine binding in mitochondrial taurocyamine kinase from *Arenicola brasiliensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1814: 1219-1225.
- Tanaka, K., Suzuki, T. (2004) Role of amino acid residue 95 in substrate specificity of phosphagen kinases. *FEBS Lett.* 573: 78-82.
- Tanaka, K., Uda, K., Shimada, M., Takahashi, K., Gamou, S., Ellington, W.R., Suzuki, T. (2007) Evolution of Cytoplasmic and Mitochondrial Phosphagen Kinases Unique to Annelid Groups. *J. Mol. Evol.* 65: 616-625.
- Uda, K., Fujimoto, N., Akiyama, Y., Mizuta, K., Tanaka, K., Ellington, W. R., Suzuki, T. (2006) Evolution of the arginine kinase gene family. *Comp. Biochem. Physiol. D Genomics and Proteomics* 1: 209-218.
- Uda, K., Hoshijima, M., Suzuki, T. (2013) A novel taurocyamine kinase found in the protist *Phytophthora infestans*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 165: 42-48.
- Uda, K., Saishoji, N., Ichinari, S., Ellington, W. R., Suzuki, T. (2005a) Origin and properties of cytoplasmic and mitochondrial isoforms of taurocyamine kinase. *FEBS J.* 272: 3521-3530.
- Uda, K., Iwai, A., Suzuki, T. (2005b) Hypotaurocyamine kinase evolved from a gene for arginine kinase. *FEBS Lett.* 579: 6756-6762.
- Uda, K., Tanaka, K., Bailly, X., Zal, F., Suzuki, T. (2005c) Phosphagen kinase of the giant tubeworm *Riftia pachyptila*. Cloning and expression of cytoplasmic and mitochondrial isoforms of taurocyamine kinase. *Int. J. Biol. Macromol.* 37: 54-60.
- Uda, K., Suzuki, T. (2007) A novel arginine kinase with substrate specificity toward D-arginine. *The Protein J.* 26: 281-291.
- Van Thoai, N. (1968) Homologous phosphagen phosphokinases In: *Homologous Enzymes and Biochemical Evolution* (van Thoai, N., Roche, J. (Eds.)). Gordon and Breach, New York, pp. 199-299.
- Watts, D.C. (1971) Evolution of phosphagen kinases. In: *Biochemical evolution and the origin of life* (Schoffeniels, E. (ed)). North-Holland, Amsterdam, pp. 150-173.
- 菊池 泰二 (1979) 多毛類 *Capitella capitata* の生態、生活史: “汚染指標種”の生態的特性をめぐって(総合抄録) 日本ベントス研究会連絡誌 No. 17-18 P 33-51.
- 土居 真侑子・丁野 可愛・鈴木 知彦 (2018) アメリカムラサキウニのアルギニンキナーゼの酵素活性と無細胞タンパク質合成/Enzyme activity and cell-free protein synthesis of arginine kinase from *Stongylocentrotus purpuratus*. *Scientific and Educational Reports of the Faculty of Science and Technology, Kochi University* Vol. 1 (2018), No. 1