

セルロモナス NT3060 株の防腐剤耐性グリセロールキナーゼの遺伝子クローニングと特性解析

曾我部 敦^{1*}・北林 雅夫¹・森島 賢一²・古川美代子²・八田 貴²・
福田 靖久³・西瀬 弘⁴・岡 正則¹・田村 隆³・稲垣 賢二³

¹東洋紡株式会社敦賀バイオ研, ²岡山理科大学工学部,
³岡山大学大学院環境生命科学研究科, ⁴甲子園大学栄養学部

(2014年2月7日受付 2014年5月23日受理)

Glycerol kinase from *Cellulomonas* sp. NT3060 which has high resistance against preservatives

Atsushi Sogabe^{1*}, Masao Kitabayashi¹, Kenichi Morishima², Miyoko Furukawa², Takashi Hatta², Yasuhisa Fukuda³, Hiroshi Nishise⁴, Masanori Oka¹, Takashi Tamura³, and Kenji Inagaki³
(*Tsuruga Institute of Biotechnology, Toyobo Co., Ltd., Osaka 530-8230*¹; *Faculty of Engineering, Okayama University of Science, Okayama 700-0005*²; *Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University, Okayama 700-8530*³; *College of Nutrition, Koshien University, Hyogo 665-0006*⁴, Japan) *Seibutsu-kogaku* **92**: 402-409, 2014.

Glycerol kinase is suitable for clinical diagnostic use in levels of neutral fat. Glycerol kinase from *Cellulomonas* sp. NT3060 shows good stability against several preservatives such as *N*-methylisothiazolone and imidazolidinylurea. We have cloned *glpK* gene from *Cellulomonas* sp. NT3060. This *glpK* gene is composed of 1,518 bp nucleotides and encodes 505 amino acid residues. The *glpK* gene was expressed in *Escherichia coli* and *Cellulomonas* sp. glycerol kinase was purified to homogeneity by column chromatography. The glycerol kinase exhibited high tolerance to various preservatives compared to other glycerol kinases. This tolerance was found to be favorable feature as diagnostic reagent for quantity of triglyceride.

[**Key words:** glycerol kinase, triglyceride measurement, preservative tolerance, *Cellulomonas*]

グリセロールキナーゼ (GK) (EC. 2. 7. 1. 30) は、グリセロールを Mg²⁺ と ATP に依存したリン酸化反応によりグリセロール 3-リン酸に変換する反応を触媒する酵素である。GK は 1937 年に Kalckar によって肝臓内に発見されて以来¹⁾、動物や微生物などから精製が報告され²⁻⁵⁾、生物全般に広く存在する事が知られている。また、多くの生物から遺伝子のクローニングが報告されており⁶⁻⁹⁾、特に大腸菌において詳細に研究されている。1967 年に Hayashi らによって精製され¹⁰⁾、1988 年に Pettigrew らにより遺伝子がクローニングされ¹¹⁾、1993 年以降 Remington らにより X 線結晶構造が明らかにされてき

ている^{12,13)}。

GK の医療分野への応用では、臨床検査薬用原料酵素として中性脂肪の測定に利用されている。測定の原理は、まず、血中の中性脂肪をリパーゼで加水分解し、生成したグリセロールを GK によってグリセロール 3-リン酸に変換する。次に、このグリセロール 3-リン酸をグリセロール 3-リン酸オキシダーゼとペルオキシダーゼを用いた比色定量することにより、血中の中性脂肪が測定できる。近年の臨床検査薬は溶液状態の検査薬が主流となっている。そのため従来の酵素に求められる高い反応性や基質特異性のような特性に加え、保存安定性、特に検査試薬

*連絡先 E-mail: Atsushi_Sogabe@toyobo.jp

液中での高い安定性も要求されるようになっている。酵素の検査試薬液中での安定性に寄与する要因として種々あげられるが、防腐剤がその一つである。一般的に液状検査薬には長期保存を可能にするために防腐剤が添加されている。しかし、この防腐剤が酵素を不安定化することがあるため、防腐剤に対して安定性が高いことは検査薬用酵素にとって、検査薬の保存期間に性能を維持するために非常に重要な項目である。

一般的に熱安定性が高い酵素は検査試薬中でも高い保存安定性を示す傾向があるため、*Bacillus stearothermophilus* や *Thermus flavus* など好熱菌由来のGKが汎用されている。しかし、これらのGKは防腐剤に対する耐性が比較的低いという問題があるため、検査試薬の防腐剤に対する耐性を高める必要性があった。予備実験で *Cellulomonas* sp. NT3060由来のGK (NT3060_GK) が好熱菌由来の酵素より防腐剤耐性が高いことを確認した。そこで、本研究ではNT3060_GK遺伝子のクローニングを行い、大腸菌中での高発現と精製、酵素の諸性質を調べるとともに、特にNT3060_GKの防腐剤に対する耐性を調べ、その一次構造との関係についても考察を行った。

実験方法

使用菌株およびプラスミド *Cellulomonas* sp. NT3060は研究室保存株を使用した。遺伝子の取扱いは、*Escherichia coli* JM109 {*recA1*, *endA1*, *gryA96*, *thi1*, *hsdR17* (*rk⁻mk⁺*), *e14⁻* (*mcrA⁻*), *supE44*, *relA1*, Δ (*lac-proAB*)/F' [*traD36*, *proAB⁺*, *lacIq*, *lacZ* Δ M15]} で行い、GK遺伝子の発現、精製には、GK遺伝子を欠損した大腸菌KM1株 {F' λ *glpK::kan*; Km^r (Km^r, resistance to kanamycin.)} を使用した。通常のクローニング、シーケンスにはpUCBM21 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用い、NT3060_GKの高発現に用いる発現ベクターは

GK遺伝子のクローニング NT3060_GK遺伝子クローニングは、*Cellulomonas* sp. NT3060より精製したGKのN末端アミノ酸配列 (ADYVLAIDNGTTS, Fig. 2参照) の下線部の配列よりforwardプライマー (TACGTSCTSGCSATCGACCAGGG) および *Bacillus subtilis* (GenBank: AAA22486.1), *Haemophilus influenzae* Rd KW20 (NP_438851.1), *E. coli* K12 (GenBank: M18393.1), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (GenBank: U49666.1) のアミノ酸配列より相同性の高い領域 (KNTYGTGCF, Fig. 2参照) の相補鎖から設計したreverseプライマー

(TTCTTGTGSATGCCSTGSCCSACGAAG) を用い、*Cellulomonas* sp. NT3060染色体DNAをテンプレートしてPCRを行った。PCRの条件は、ExTaqDNAポリメラーゼを用い、(98°C, 30秒–68°C, 1分) を30サイクル行った。この結果、0.8 kbpのDNA断片が増幅され、塩基配列を決定し推定されたアミノ酸配列を調べたところ、既知のGKのアミノ酸配列と有意な相同性があった。このことから、この0.8 kbpのPCR産物は、NT3060_GK遺伝子 *glpK* の断片の一部であることが明らかとなり、これをサザン解析のプローブとした。このプローブを使いECL Direct labelling and detection system (GE healthcare Japan, Tokyo, Japan) を用いたサザンプロット解析を行い、*glpK* を選択した。KpnI-NotI約6.8 kbpのDNA断片にハイブリダイズしたため、この遺伝子断片領域を切り出し、pUCBM21プラスミドにクローニングした。この遺伝子断片を持つ大腸菌クローンは、サザン解析を用いポジティブクローンとして選択した。6.8 kbpの遺伝子が挿入されていたが、この断片中のPstI-NotI 4.1 kbpのDNA断片を切り出してpUCBM21にサブクローニングし、次にNcoI-NotIで *glpK* 遺伝子を含む2.0 kbpの断片を切り出して高発現プラスミドpSE380に組み込み、得られたプラスミドをpCGK12と命名した。

glpK 遺伝子の塩基配列は、*glpK* 遺伝子を含む上記PstI-NotI 4.1 kbp断片をBig Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) を用いたサイクルシーケンシング法により決定し、4,071 bpの塩基配列を決定した。*glpK* 遺伝子を含む4,071 bpの塩基配列は、アクセッションNo. AB531502に登録されている。

GKの酵素活性測定法 (グリセロール3-リン酸オキシダーゼ法) グリセロールとATPを基質として、GK反応によって生じたグリセロール3-リン酸を、グリセロール3-リン酸オキシダーゼを用いて酸化した。この際に生じたH₂O₂とペルオキシダーゼによる共役反応で4-アミノアンチピリンとフェノールをキノン色素へ変換し、吸光度の変化量から酵素活性を定量した (OD₅₀₀での分子吸光係数 $\epsilon = 13.3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。反応組成は以下の通りである。0.1 M HEPES緩衝液 (pH 7.9) に24.6 mM 4-アミノアンチピリン水溶液0.2 ml (終濃度0.23 mM), 159 mM フェノール水溶液0.2 ml (終濃度1.5 mM), グリセロール3-リン酸オキシダーゼ200 U (東洋紡・終濃度9.5 U/ml), ペルオキシダーゼ80 U (東洋紡・終濃度3.8 U/ml), ATP·2Na 48.4 mg (終濃度4.2 mM) を加え、総量21 mlを測定原液とした。各反応はこの測定原液を3 ml分取し、0.3 Mグリセロール水溶液50 μ l, 酵素液100 μ lを添加混合し、37°Cに制御された分光光度計で

OD₅₀₀の吸光度を5分間記録した。その初期直線部分から1分間あたりの吸光度変化量を求め、GK活性を求めた。

GK遺伝子の大腸菌での発現と精製 pCGK12を保持する*E. coli* KM1を100 µg/mlのアンピシリンを含むLB培地(1% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0) 5 mlに1白金耳植菌して30°Cで1晩振とう培養した(前培養液)。Terrific Broth (1.2% polypeptone, 2.4% yeast extract, 0.5% glycerol, 0.23% KH₂PO₄, 1.25% K₂HPO₄) 1,000 mlに対し前培養液を1% 増菌し、OD₆₀₀が0.5の時にIPTGを1 mMになるように加え、さらに37°Cで16時間振とう培養した。菌体を遠心分離で集菌して50 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)(緩衝液A)で洗浄および懸濁し、フレンチプレスにより菌体を破碎した。次に、この菌体破碎液を12,000 × gで20分間、さらに105,000 × gで60分間の遠心分離を行いその上清を粗酵素液とした。(1)除核酸:粗酵素液に0.1 MとなるようNaClを溶解し、さらに0.5% ポリエチレンジミンを添加後、遠心分離によって核酸を除去した。(2) 硫酸分画:60%飽和硫酸によりGKを含む沈殿画分を遠心分離によって分離し緩衝液Aに溶解した。(3) **Hi-Trap Q FFカラムクロマトグラフィー**:硫酸分画した酵素溶液をゲル濾過カラムSephadex G-25 (GE Healthcare UK Ltd.)により脱塩後、緩衝液Aで平

衡化したHi-Trap Q FFカラム (GEヘルスケア社製)にアプライした。0.2 M NaClを含む緩衝液Aで洗浄後、0.2 M–0.6 M NaClの直線濃度勾配によりGKを溶出させ、GK活性画分を回収した。(4) **Hi-Trap Phenyl FFカラムクロマトグラフィー**:GK溶出画分に20%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、20%飽和硫酸アンモニウムを含む緩衝液Aで平衡化したHi Trap Phenyl FFカラム (GE Healthcare) にアプライした。同緩衝液で洗浄後、20%–0%硫酸アンモニウム濃度の直線濃度勾配により溶出した。GK活性画分を回収し、Sephadex G-25ゲル濾過で脱塩処理を行い、精製酵素標品とした。この標品を用いてGKの各種性質を調べた。

実験結果および考察

Cellulomonas sp. NT3060由来glpK遺伝子のクローニング 実験方法に示したように*Cellulomonas sp.* NT3060の染色体DNAからGK遺伝子が含まれるPstI–NotI 4.1-kbのDNA断片をクローニングすることができた。この断片の塩基配列を決定した結果glpKが含まれており、1,518 bp、505アミノ酸残基をコードしており、55,273の分子量を持つことが明らかとなった(Fig. 1)。また、BLAST解析を行ったところ、glpKの1,074 bp上流に存在するORF1のアミノ配列は*E. coli*や*B. subtilis*

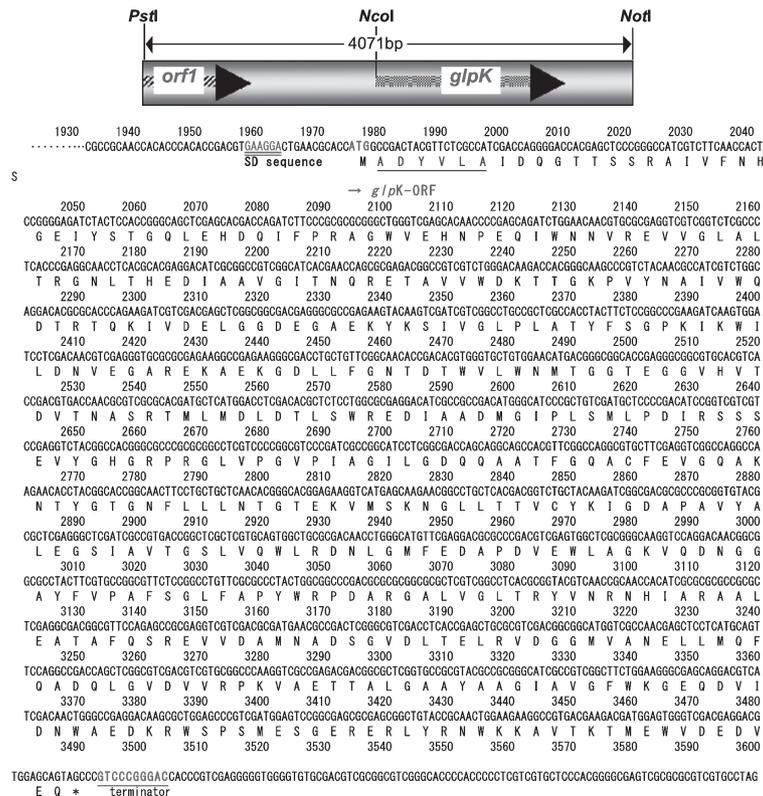


Fig. 1. Nucleotides and deduced amino acids sequence of *glpK* gene from *Cellulomonas sp.* NT3060

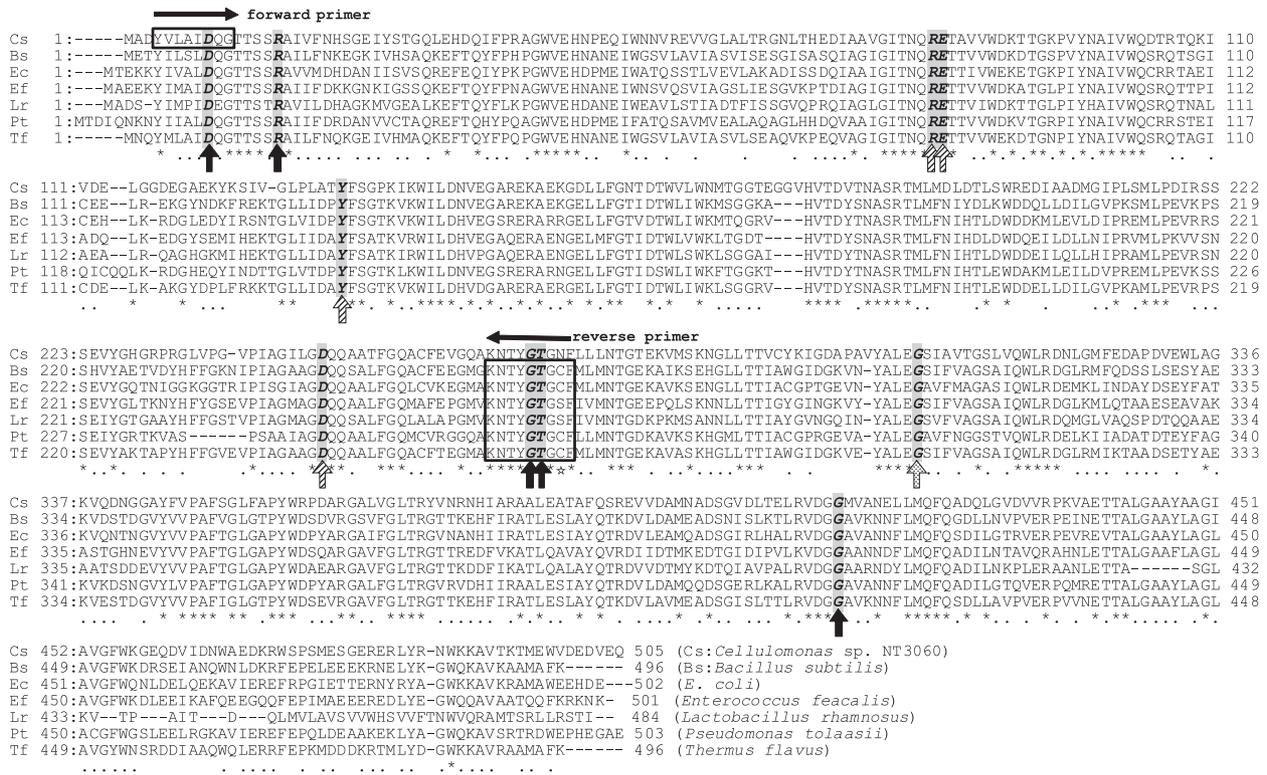


Fig. 2. Alignment of amino acid sequences of various glycerol kinases. Solid line arrow shows glycerol binding site, and oblique line arrow shows ADP binding site, and dotted line arrow shows catalytic, regulator residue. Star mark (☆) shows Asn270 residue as possible binding site of preservative.

由来のFADを補酵素とするグリセロール3-リン酸デヒドロゲナーゼと有意な相同性があり、*glpA*と推定された。

遺伝子配列より推定されるNT3060_GKのアミノ酸配列と他微生物由来のGK配列とのアライメントを作製した (Fig. 2)。その結果、グリセロール結合部位、ATP結合部位は他微生物由来のグリセロールキナーゼと同様に保存されており、他微生物由来のGKと同一の触媒機構でグリセロールのリン酸化が行われることが示唆された。しかしNT3060_GKではATP結合部位の一つであるGly413⁹⁾に隣接して保存性の高いAla414がMetに置換されていた。

NT3060_GKの高発現系の構築と酵素の精製

NT3060_GKの発現は、宿主由来のGKの混在を避けるため、*glpK*欠損株の*E. coli* KM1を宿主として用いた。NT3060_GKを高発現した菌体を超音波破碎した後のGK活性は、6.8 U/mlであった。後述するNT3060_GKの比活性より、本条件での酵素タンパクの生産性は約0.16 g/Lと推定された。硫酸分画、Hi-Trap Q FFカラムクロマトグラフィー、およびHi Trap Phenyl FFカラムクロマトグラフィーの組合せにより精製された組換えGK標品は電気泳動的にほぼ均一なバンドに精製された (Fig. 3)。最終的に本酵素は約15倍に精製され、1 Lの

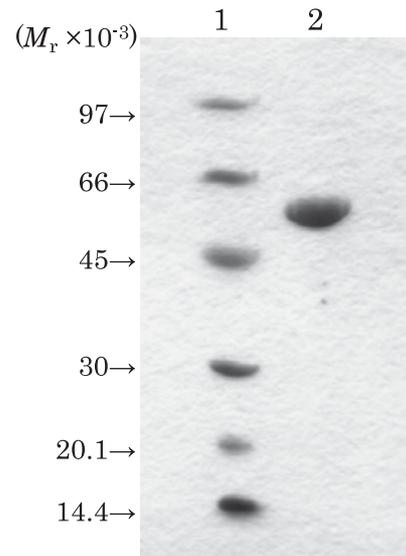


Fig. 3. SDS-PAGE of purified glycerol kinase from *Cellulomonas* sp. NT3060. Lane 1, marker proteins; phosphorylase (M_r 97,000), albumin (M_r 66,000), ovalbumin (M_r 45,000), carbonic anhydrase (M_r 30,000), trypsin inhibitor (M_r 20,100), alpha-lactalbumin (M_r 14,400). lane 2, purified 20 μ g glycerol kinase was applied.

培地で発現された大腸菌から5,200 Uの精製酵素が回収され、回収率は76.4%であった。また、精製酵素標品の比活性は41.2 U/mgであった (Table 1)。

Table 1. Purification of *Cellulomonas* glycerol kinase from *E. coli* KM1 harboring pCGK12

	Total activity (KU)	Specific activity (U/mg-protein)	Recovery (%)	Purification (fold)
cell free extract	6.80	—	100.0	—
polyethyleneimine treatment	7.30	2.76	107.3	1.0
ammonium sulfate precipitation (60%)	7.10	8.51	104.4	3.08
Sephadex G-25	5.10	7.85	75.0	2.84
Hi-Trap Q FF	4.85	25.7	71.3	9.31
Hi-Trap Phenyl FF	5.30	41.2	77.9	14.9
Sephadex G-25	5.20	41.2	76.4	14.9

Enzyme activity was measured at 37°C for 5 min in 50 mM HEPES (pH 7.9).

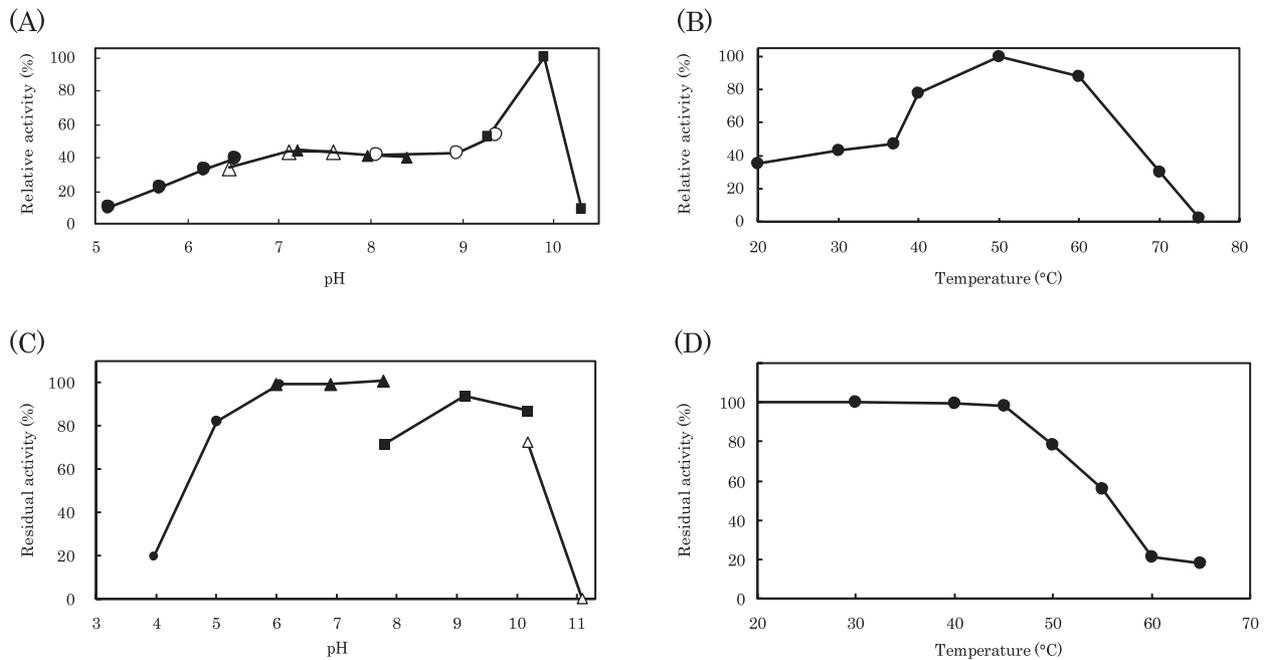


Fig. 4. Effect of pH and temperature on *Cellulomonas* glycerol kinase activity and stability. Effect of pH on glycerol kinase activity (4A). The enzyme activity was measured at 37°C for 5 min. The buffer systems (50 mM) used were MES (pH 5.0–6.5; circles), HEPES (pH 6.5–7.5; open triangles), TAPS (pH 7.2–8.3; triangles), CHES (pH 8.0–9.3; open circles), Glycine-NaOH (pH 9.2–10.2; squares). Effect of temperature on glycerol kinase activity (4B). The enzyme activity was measured for 5 min in 50 mM HEPES buffer, pH 7.9. Effect of pH on glycerol kinase stability (4C). The enzyme preparations were incubated at 25°C for 20 h under various pH conditions indicated in figure. The buffer systems (50 mM) used were acetate buffer (pH 4.0–6.0; circles), potassium phosphate buffer (pH 6.0–7.8; triangles), CHES buffer (pH 7.8–10.0; squares), CHAPS buffer (pH 10.0–11.0; open triangles). Effect of temperature on glycerol kinase stability (4D). The enzyme dissolved in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 was incubated for 15 min at various temperatures, and the residual activity was measured of residual activity.

NT3060_GKの各諸性質 NT3060_GKのネイティブの分子質量はTSK G3000 SW (東ソー (株) 製) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより測定した。その結果、ネイティブ酵素の分子質量は約128,000であった。一方、SDS-PAGEによるサブユニットの分子質量は約56,000であり、推定アミノ酸配列から求められる分子質量は55,273と算出され (Genetyx-Win), SDS-PAGEから算出された分子質量とよく一致した。 *Neurospora crassa* 由来GKの分子質量は約140,000¹⁴⁾, *E. coli* 由来で

は約127,000¹⁵⁾で、2量体構造を形成していることが報告されている。よって、他種由来GK同様にNT3060_GKも2量体構造を形成していると考えられた。

NT3060_GKの至適反応条件について検討した。反応最適pHは約10であった (Fig. 4A)。他種由来のGKの最適pHはpH 7~10程度のもが多く、 *Trypanosoma brucei* ではpH 8¹⁶⁾, *Debaryomyces hansenii* ではpH 7¹⁷⁾を示し、最適pHが一番高い *Epidermophyton floccosum* はpH 10.5¹⁸⁾と報告されている。NT3060_GK同様に最

適pHを約10に示すものには *Culex pipiens fatigans*¹⁹⁾, *Gallus gallus*²⁰⁾, *E. coli*¹⁰⁾ 由来のGKがあげられる。

NT3060_GKの最適温度の検討は、酵素を各温度で反応させることで求めた (Fig. 4B)。温度に対する活性への影響は、最適温度は50°Cであるが、診断薬で汎用される37°Cでの反応性も約50%と良好であった。他種由来のGKでは、NT3060_GKと同じ50°C程度を示すのは好熱菌の *T. flavus* のGK⁵⁾ で、*Cellulomonas* sp. と同じ常温菌の *E. coli*²¹⁾ や *Candida mycoderma*⁴⁾ のGKの最適温度は25°Cである。これらのことから、*Cellulomonas* sp. 由来GKの最適温度は中温菌としてはかなり高い温度であった。

GKのpHに対する安定性は、pH 4.0–11.0において25°C、20時間の処理の後に活性を測定することで求めた (Fig. 4C)。pH 6以下の酸性領域では酵素失活が確認された、しかしながらもっとも酸性であるpH 3.0でも酵素が完全に失活することはなく、20%程度の酵素活性が残存した。アルカリ条件下ではpH 10以上で酵素の失活が見られ、pH 11では完全に活性が失われた。また、この実験で80%以上の活性を保持した範囲はpH 5–10であり、約100%の活性を保持した範囲はpH 6–8であった。他種由来GKのpH安定性は、*E. coli* 由来のGKの場合0°C、24時間保存で活性を示すpHの範囲は5–8であり、*Rattus norvegicus* のGKの場合pH 9.8において25°C、6.5分で活性は半減する。*Columba* sp. のGKにおいては0°C、6時間、pH 7の処理で90%が失活する¹⁹⁾。NT3060_GKは他種由来のものとは比べ広範囲のpHに耐性があることが明らかとなった。

GKの熱に対する安定性は、保温時間15分間の条件下で残存活性を測定することで求めた。GKは40°Cまではほとんど失活を起こさないが、それ以上の温度では失活が温度依存的に確認され、60°Cでは完全に失活していた (Fig. 4D)。熱処理15分後に90%以上の活性を示すのは約45°Cまでで、熱処理後活性が半分となるのは約55°Cであった。他種GKについては同条件で活性が半減する温度は、好熱菌の *T. flavus* のGKでは68°C、*Pyrococcus kodakaraensis* のGKでは100°Cである²²⁾。熱安定性としては他の好熱菌由来のGKに劣るものの、診断薬の測定温度である37°Cでの反応性が良く、40°Cまで安定な本酵素は診断薬用酵素として実用上十分な性能を有していると考えられた。

速度論解析 NT3060_GKの各基質に対する速度論解析をラインウィーバーバークプロットから算出した。NT3060_GKのグリセロールに対するKm値は6.9 μMであった。他起源由来のGKでは *C. mycoderma* ; 10 μM²³⁾, *Rattus norvegicus* ; 20 μM²⁴⁾, *T. flavus* ; 162 μMなどの

報告があるが、グリセロールに対するKm値は最小のグループであり、グリセロールを検出する中性脂肪測定診断酵素として優れた親和性を有していた。一方、ATPに対するKm値は110 μMであった。他微生物由来のGKでは *Flavobacterium meningosepticum* で30 μM²⁵⁾, *T. brucei* で190 μM²⁶⁾, *H. influenzae* では2.5 mM²⁷⁾ の報告がある。微生物由来のGKの中ではATPに対するKm値は中程度のグループに入る。前述した通りNT3060_GKのATP結合部位に隣接して保存性の高いAla414がMetに置換されているため、このアミノ酸置換が基質結合時の立体障害となりATPへの親和性を弱めている可能性が推測される。しかしATPは診断薬の構成成分として添加されるため、実用上の問題は少ないと考えられる。なおプリミティブな検討であるが、NT3060_GKがADPによる反応阻害を受けにくい傾向が示された (非公開データ)。GKを利用した中性脂肪測定用診断薬では反応生成物としてADPが生成され、ADPが多く存在する場合はGKの触媒反応を阻害して測定精度が低下する事が問題になる。しかし、NT3060_GKでは補酵素に対する親和性が低くADPの阻害影響も小さいため診断薬用酵素として優れた特性をもつと考えられる。

防腐剤に対する耐性 NT3060_GKの防腐剤耐性測定は、4°Cまたは25°Cの条件下で防腐剤と酵素を混合し、1週間後の残存活性を測定した (Fig. 5)。*T. flavus*, *Streptomyces canus*, *E. coli*, *B. stearothermophilus* 由来GKはプロクリンの影響を大きく受け、*S. canus* と *E. coli* は *N*-methylisothiazolone (MIT) でも活性の減少が見られた。Imidazolidinylurea (IZU) による影響では各酵素が比較的影響を受けなかったが、*E. coli* では約50%の減少が見られた。これに対しNT3060_GKは今回検討した防腐剤によってほとんど影響を受けず、4°Cで保存した場合はほぼ100%、25°Cで保存した場合も90%以上の活性を維持していた。NT3060_GKは補酵素結合部位近傍で、他微生物由来のGKで保存性の高い約270番目のCys残基がAsnに置換されていた。防腐剤耐性のない *T. flavus*, *E. coli*, *B. subtilis* のGKはこの位置がすべてCys残基であった (Fig. 2)。

西矢らのサルコシンオキシダーゼ (SOX) の研究において、チオール基の置換による酵素の安定化が報告されている²⁸⁾。SOX内のCysをSerに置換 (C265S) した変異酵素ではAg⁺やHg²⁺や *N*-エチルマレイミドに対する耐性が向上することが報告されている。また、筆者らは、NT3060_GKの270番目のAsnに相当する *T. flavus* のGKのCysをSerまたはAsnのような他のアミノ酸に置換する事で防腐剤に対する耐性が著しく向上する事を見いだしている²⁹⁾。以上の事から、NT3060_GKはこの

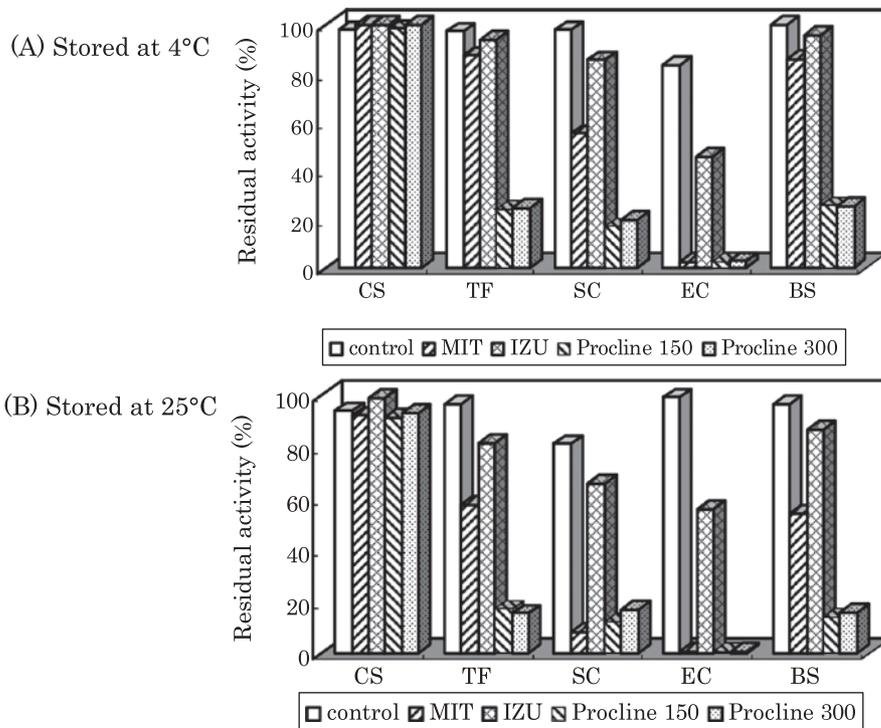


Fig. 5. Liquid stability of *Cellulomonas* glycerol kinase to various preservatives. Glycerol kinases were incubated at 4°C or 25°C for 1 week in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) with various preservatives. Used preservative were 2-methyl-4-isothiazolin-3-one: MIT (100 mg/L, left slash), imidazolidinylurea: IZU (500 mg/L, crosswire), procline 150 (0.8 ml/L, right slash), procline 300 (0.3 ml/L, sketch) and water for control (white blank). And glycerol kinase were from *Cellulomonas* sp. NT3060 (CS), *Thermus flavus* (TF), *Streptomyces canus* (SC), *Escherichia coli* (EC) and *Bacillus stearothermophilus* (BS).

アミノ酸置換効果により他種由来酵素にない高い防腐剤耐性を持つ可能性が示唆されており、本酵素の大きな特長と考えられる。

要 約

グリセロールキナーゼは、中性脂肪測定用臨床検査薬用原料として利用されている。臨床検査薬は、近年溶液状態の検査薬が主流になり、長期間の保存を可能にするため、防腐剤を添加する事が一般的である。しかし、これらの防腐剤は酵素の安定性へ悪影響を及ぼす事もあり、臨床検査薬用原料酵素には溶液中の安定性に加え、これらの防腐剤への耐性も求められるようになっていく。我々は *Cellulomonas* sp. NT3060 由来グリセロールキナーゼが *N*-methylisothiazolone や imidazolidinylurea のような防腐剤に対し優れた安定性を示す事を見だし、その酵素学的性質を明らかにした。

Cellulomonas sp. NT3060 由来のグリセロールキナーゼは、1,518塩基にコードされ、505アミノ酸より構成されていた。さらに、本遺伝子を導入した大腸菌により発現された *Cellulomonas* sp. NT3060 由来グリセロールキナーゼを各種カラムクロマトグラフィーにより均一に精製し、その酵素学的特性を明らかにした。本グリセロー

ルキナーゼの安定性は好熱性細菌由来のグリセロールキナーゼと比較すると不安定であるが、37°C付近の実用温度では十分安定であり、弱酸性領域から弱アルカリ領域まで幅広いpH領域で安定であった。また、基質であるグリセロールに対して K_m 値は $6.9 \mu\text{M}$ と高い親和性を示した。さらに、他起源のグリセロールキナーゼと比較して複数の防腐剤に対して高い耐性を示した。以上の性質より、本グリセロールキナーゼは臨床診断薬用原料として総合的に優れた性質を有した酵素である事が示唆された。

文 献

- 1) Kalckar, H.: *Enzymologia*, **2**, 47–52 (1937).
- 2) Bublitz, C. and Kennedy, E. P.: *J. Biol. Chem.*, **211**, 951–961 (1954).
- 3) Kennedy, E. P.: *Methods Enzymol.*, **5**, 486–488 (1962).
- 4) Bergmeyer, H. U., Holf, G., Kauder, E. M., Möllering, H., and Wieland, O.: *Biochem. Z.*, **333**, 471–480 (1961).
- 5) Huang, H. S., Yoshida, T., Meng, Y., Kabashima, T., Ito, K., Nishiya, Y., Kawamura, Y., and Yoshimoto, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 328–332 (1997).
- 6) Sargent, C. A., Young, C., Marsh, S., Ferguson-Smith, M. A., and Affara, N. A.: *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 1317–1324 (1994).

- 7) Holmberg, C., Beijer, L., Rutberg, B., and Rutberg, L.: *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 2367–2375 (1990).
- 8) Pavlik, P., Simon, M., Schuster, T., and Ruis, H.: *Curr. Genet.*, **24**, 21–25 (1993).
- 9) Huang, H. S., Kabashima, T., Ito, K., Yin, C. H., Nishiya, Y., Kawamura, Y., and Yoshimoto, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1382**, 186–190 (1998).
- 10) Hayashi, S. and Lin, E. C. C.: *J. Biol. Chem.*, **242**, 1030–1035 (1967).
- 11) Pettigrew, D. W., Ma, D. P., Conrad, C. A., and Johnson, J. R.: *J. Biol. Chem.*, **263**, 135–139 (1988).
- 12) Hurlley, J. H., Faber, H. R., Worthylake, D., Meadow, N. D., Roseman, S., Pettigrew, D. W., and Remington, S. J.: *Science*, **259**, 673–677 (1993).
- 13) Feese, M. D., Faber, H. R., Bystrom, C. E., Pettigrew, D. W., and Remington, S. J.: *Structure*, **6**, 1407–1418 (1998).
- 14) Thorner, J. W. and Paulus, H.: *The Enzymes*, 3rd ed. (Boyer, P. D., ed.) **8**, p.487–508, Academic Press, New York (1973).
- 15) Anderson, M. J., DeLabarre, B., Raghunathan, A., Palsson, B. O., Brunger, A. T., and Quake, S. R.: *Biochemistry*, **46**, 5722–5731 (2007).
- 16) Kralova, I., Rigden, D. J., Opperdoes, F. R., and Michels, P. A.: *Eur. J. Biochem.*, **267**, 2323–2333 (2000).
- 17) Nilsson, A., Thomson, K. S., and Adler, L.: *Biochim. Biophys. Acta*, **991**, 296–302 (1989).
- 18) Kasinathan, C. and Khuller, G. K.: *Lipids*, **19**, 289–293 (1984).
- 19) Ramabrahmam, P. and Subrahmanyam, D.: *Insect Biochem.*, **13**, 523–528 (1983).
- 20) Rao, D. R. and Kou, A. Y.: *Int. J. Biochem.*, **8**, 295–298 (1977).
- 21) Thorner, J. W.: *Methods in Enzymol.*, **42C**, p.148–156, Academic Press, New York (1975).
- 22) Koga, Y., Morikawa, M., Haruki, M., Nakamura, H., Imanaka, T., and Kanaya, S.: *Protein Eng.*, **11**, 1219–1227 (1998).
- 23) Knight, W. B. and Cleland, W. W.: *Biochemistry*, **28**, 5728–5734 (1989).
- 24) Barrera, L. A. and Ho, R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**, 145–152 (1979).
- 25) Sakasegawa, S. I., Takehara, H., Yoshioka, I., Takahashi, M., Kagimoto, Y., Misaki, H., Sakuraba, H., and Ohshima, T.: *Protein Eng.*, **14**, 663–667 (2001).
- 26) Krakow, J. L. and Wang, C. C.: *Mol. Biochem. Parasitol.*, **43**, 17–25 (1990).
- 27) Pawlyk, A. C. and Pettigrew, D. W.: *Protein Expr. Purif.*, **22**, 52–59 (2001).
- 28) Nishiya, Y., Zuihara, S., and Imanaka, T.: *Appl. Env. Microbiol.*, **61**, 367–370 (1995).
- 29) 岸本高英, 曾我部敦, 八田 貴, 稲垣賢二: 特許公開 2007-195453 (2007).