

フォスファゲンキナーゼの GS 領域のアミノ酸欠損と酵素活性発現の関連

市成秀一, 鈴木知彦

高知大学理工学部生物科学科比較生化学研究室

要約

フォスファゲンキナーゼ(PK)ファミリーに属するクレアチンキナーゼ(CK)やアルギニンキナーゼ(AK)は基質特異性が高く, それぞれ基質クレアチンやアルギニンにのみ酵素活性を示す. ところが, 環形動物に存在するロンブリシンキナーゼ(LK)は, 主基質ロンブリシンだけでなく, タウロシアミン, アルギニン, グリコシアミンに対しても酵素活性を示す. このように, LKの基質認識システムはCKやAKと比べると著しく弛緩している, 言い換えればLKには様々なグアニジノ基質に対応する「可塑性」がある. GS(guanidino specificity)領域はPKのグアニジノ基質の認識に関与しており, PKの種類ごとにGS領域内に特徴的なアミノ酸残基の欠損を示す: グリコシアミンキナーゼ(GK)は欠損なし, CKは1残基欠損, AK, LK, タウロシアミンキナーゼ(TK), ハイポタウロシアミンキナーゼ(HTK), オフェリンキナーゼ(OK)は5残基欠損を持つ.

本研究では, シマミズ LK, タマシキゴカイ TK, オウムガイ AK, ゼブラフィッシュ CK, スジホシムシモドキ HTK を材料に用い, それらのGS領域にAla残基を複数パターン挿入した変異体を作成した. CK, AK, HTKのGS領域にAlaを1残基挿入すると(1A変異体), その主活性(触媒効率: k_{cat}/K_m)は野生型の0.8%以下に劇的に低下した. これは, AK, CK, HTKでは, GS領域上での基質認識が最適化され, それぞれの酵素の基質特異性が決定されていることを示唆している. 一方, LK-1A変異体では, 主基質ロンブリシンに対して, 野生型の23%の活性が残存していた. 加えて, Alaの挿入数を4残基まで増加させても, その活性はLK-1Aと大差なかった. また, 興味深いことに, LK-1AからLK-7Aまでの7種類の変異体は, 副基質タウロシアミンに対して野生型と同程度の活性を維持していた.

Keywords: GS 領域(GS region), フォスファゲンキナーゼ(phosphagen kinase: PK), アルギニンキナーゼ(arginine kinase: AK), グリコシアミンキナーゼ(glycocyamine kinase: GK), クレアチンキナーゼ(creatine kinase: CK), タウロシアミンキナーゼ(taurocyamine kinase: TK), ハイポタウロシアミンキナーゼ(hypotaurocyamine kinase: HTK), ロンブリシンキナーゼ(lombricine kinase: LK), オフェリンキナーゼ(opheline kinase: OK)

Relationship between the amino acid deletion in the GS region of phosphagen kinase and expression of its enzyme activity

Shuichi Ichinari and Tomohiko Suzuki

Laboratory of Biochemistry, Department of Biological Sciences, Faculty of Science and Technology, Kochi University, Kochi 780-8520 Japan

Abstract

Creatine kinase (CK) and arginine kinase (AK), which belong to the phosphagen kinase (PK) family, have a high substrate specificity and show enzymatic activity only for the substrate creatine and arginine,

respectively. However, lombricine kinase (LK) present in annelids exhibits enzymatic activity not only on the main substrate lombricine but also on taurocyamine, arginine, and glycoyamine. Thus, the substrate recognition system on the GS region of LK appears to be remarkably relaxed, compared to the cases of CK, AK and HTK with high specificity. In other words, the GS region has a "plasticity" corresponding to various guanidino substrates. The GS region in PK enzyme is involved in guanidino substrate recognition, and each enzyme has a characteristic amino acid deletion: glycoyamine kinase (GK) has no deletion, CK has one deletion, and AK, LK, taurocyamine kinase (TK), hypotaurocyamine kinase (HTK), opheline kinase (OK) are deficient in 5 residues.

In order to make clear the role of GS-region, we inserted Ala residues into the GS-regions of LK from *Eisenia foetida*, TK *Arenicola marina*, AK from *Natilus pompilius*, CK from *Danio rerio*, and HTK from *Siphonosoma cumanense*. When one Ala residue was inserted into the GS region of CK, AK and HTK, its activity (catalytic efficiency: kcat / Km) was dramatically reduced to less than 1% of that of the wild type. This shows that the GS region plays a crucial role in substrate recognition in the three enzymes, and that the GS region is optimized for the recognition of the main substrate in each enzyme. We prepared LK mutants with one to seven Ala residues insertion in GS region. The results show that irrespective of number of inserted Ala residues, the activity of the mutants was retained in about 20% of the wild-type for the substrate lombricine. Interestingly, the activities of the mutants were comparable to that of the wild-type for the substrate taurocyamine.

1. 序論

フォスファゲンキナーゼ(PK)は、 Mg^{2+} 存在下においてATPの高エネルギーリン酸基をグアニジノ化合物に転移する反応を可逆的に触媒する酵素群であり、ATPを消費する細胞等において重要な役割を果たしている[1-3].

グアニジノ化合物には、アルギニン、グリコシアミン、クレアチン、タウロシアミン、ハイポタウロシアミン、ロンブリシン、オフェリン等があり、それぞれのグアニジノ基質ごとに反応を触媒する酵素、アルギニンキナーゼ(AK)、グリコシアミンキナーゼ(GK)、クレアチンキナーゼ(CK)、タウロシアミンキナーゼ(TK)、ハイポタウロシアミンキナーゼ(HTK)、ロンブリシンキナーゼ(LK)、オフェリンキナーゼ(OK)が存在する[4-5]. 脊椎動物にはCKのみが存在するが、無脊椎動物ではCKに加えて、AK, GK, TK, HTK, LK, OKなど少なくとも6種のPKが存在している[6].

GK:	LYEKYWDKVTPNGVTLDKCIQ	TGVDNPGNKFYGKKTGC	VFGDEHSYETFKDFDRCIEE	IHH-FKPTDVHPA
CK:	MYANLRDKQTSPGFTLDDVIQ	TGVDNPGHPF-IMTVGC	VAGDEETYDVFKELLDPVIEDR	HGGYKPTDKHKT
MiTK:	IYARLRDKATPSGFTFDQAIQ	CGVDNPGYPH-TKTVGL	VAGDEESYEVFAELFDKIIDDK	HGGFKPTDKHKT
TK:	MYEKMYKRVTPNGVTVDKCIQ	PSVDYT-----GKIVGL	VAGDEESYTTFNEIFDAVLDDH	HHLGFSTTDKHPP
AK:	LFEQLKDKKTKFGGSLADCIR	SGCQNLD-----SGVGI	YACDPDAYTVFAPVLNKVIQDY	HKTSS---VSHP
HTK:	AAKFKDKKTKLGGTLAHC1K	PGAQFHH-----LHIGI	YACDPEAYVTFAEVFDKVVADY	HGVPSNQPISHP
LK:	MYERLYELRTPNGVSDIKCIQ	PSVDNT-----GRIIGL	VAGDPESYEVFKELFDAVINEK	HGGFGPTDKHPP
	30	50	70	84 90

GS-region

Fig.1 Alignment of amino acid sequences around the GS region of PK enzymes (GK, CK, MiTK, TK, AK, HTK and LK). The 84th residue shaded in yellow is the amino acid involved in the identification of the guanidino substrate [11, 20]. Although not included in this alignment, the GS region of the OK sequence has a 5-amino acid deletion, as well as those of LK and TK.

GS(guanidino specificity)領域は PK のグアニジノ基質の認識に関与しており, PK の種類ごとに GS 領域内に一定のアミノ酸欠損がある[7, 8]. すなわち, 分子量の大きなグアニジノ基質を利用する酵素(AK, TK, HTK, LK, OK)は欠損数が5と最も大きく, CK の欠損数は1, 最も小さい基質を利用する GK の欠損数は0である(Fig.1 を参照). GS 領域は, カプトガニ(*Limulus polyphemus*)AK やシビレエイ(*Torpedo californica*)CK の結晶構造から[9, 10], グアニジノ基質結合に関わる flexible loop 上に存在していることが後に判明した.

LK は環形動物やその近縁の動物にのみ存在しており, シマミズ(*Eisenia foetida*)LK は主基質ロンブリシンだけでなく, タウロシアミン, アルギニン, グリコシアミンにも酵素活性を示す[11,12]. 環形動物の TK においても, 多様なグアニジノ基質に対する活性が報告されている[13]. このように, 環形動物の LK や TK には, CK や AK には見られない基質特異性の著しい弛緩が見られる.

本研究では, AK, CK, HTK, TK, LK の GS 領域内に Ala 残基を挿入した変異体を作成した. そして, その酵素活性を追うことで, GS 領域のアミノ酸欠損数が基質認識にどのような影響を与えるかを探った. 尚, 本論文中でのアミノ酸番号はシマミズ LK のものを採用した.

2. 材料と方法

2-1 各種変異体の作製

全ての変異酵素は, pMAL ベクターにクローニングされていたそれぞれの野生型を鋳型に, KOD⁺DNA polymerase を用いた Inverse PCR 法によって作製した. 増幅された PCR 産物は DpnI 消化し, T4 DNA polymerase を用いた DNA 末端の平滑化, 及び T4 polynucleotide kinase を用いたリン酸化を行った. 回収した DNA 溶液に等量の Ligation high (TOYOBO) を加え, 16°C で 90 min 静置してセルフライゲーション反応を行った. その反応液を用いて, コンピタントセル DH5 α をトランスフォームし, アンピシリンを含む LB agar 上で 37°C, 16 h 静置培養した. 変異導入プラスミドは Cycle Sequencing 反応後, ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた配列解析により配列の確認を行った.

2-2 リコンビナントタンパク質の発現誘導と精製

各種の野生型酵素及び変異酵素は, Maltose Binding Protein (MBP) との融合タンパク質として大腸菌 TB-1 中で発現させた. 可溶化したリコンビナントタンパク質は Amylose Resin (New England Biolabs) を用いた Batch 法で精製した. Column Buffer, Elution Buffer は Amylose Resin の説明書に従い作製した. 酵素の精製度は SDS-PAGE により確認した. タンパク質濃度は, 280nm での吸光度が 0.77 のときに 1 mg protein/ml であるとして推定し, MBP (42.5 kDa) の分を差し引いて計算した.

2-3 酵素活性測定

精製酵素の活性測定は, ピルビン酸キナーゼとラクテートデヒドロキナーゼを用いた共役反応系で行った[4, 14]. この測定法では, 最終的に NADH が NAD⁺ に変化するときの 340nm 吸光度の変化を追跡する. 尚, 全ての測定は 25°C で行った.

3. 結果と考察

3-1 GS 領域内 Ala 付加変異酵素の発現と酵素活性測定

本研究ではオウムガイ(*Natilus pompilius*)AK, ゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)CK, スジホシムシモドキ(*Siphonosoma cumanense*)HTK, シマミズ(*Eisenia foetida*)LK, タマシキゴカイ(*Arenicola marina*)TK の変異酵素を作製した. 各リコンビナント酵素は, 可溶化する可能性が高いマルトース結合タンパク質(MBP)との融合タンパク質として大腸菌内で発現させ, Amylose Resin を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製した. 結果的に, 全ての変異タンパク質は 1 mM IPTG, 25°C, 20 h の発現条件で可溶化した. 変異体は, GS 領域の欠損部位(Fig.1 を参照)に Ala を 1 残基挿入した場合には 1A, 2 残基挿入した場合には 2A, 3 残基挿入した場合には 3A のように表記した.

Table 1 Kinetic parameters of wild-type and 1A mutant of AK, CK and HTK.

Source	Enzyme	Arginine			Creatine			Taurocyamine		
		kcat [1/s]	Km [mM]	kcat/Km [1/s*mM]	kcat [1/s]	Km [mM]	kcat/Km [1/s*mM]	kcat [1/s]	Km [mM]	kcat/Km [1/s*mM]
<i>Nautilus</i>	AK-WT	2.69 ± 0.04	0.45 ± 0.03	6.03 ± 0.33						
	AK-1A	0.056 ± 0.0007	n.d.	n.d.						
<i>Dario</i>	CK-WT				37.9 ± 1.71	3.43 ± 0.31	11.1 ± 0.57			
	CK-1A				5.07 ± 0.37	58.3 ± 3.80	0.087 ± 0.001			
<i>Siphonosoma</i>	HTK-WT							66.33 ± 1.57	9.00 ± 0.46	7.38 ± 0.21
	HTK-1A							1.23 ± 0.08	54.62 ± 3.59	0.023 ± 0.001

n.d., not determined.

Table 2 Kinetic parameters of wild-type and mutants of LK and TK.

Source	Enzyme	Lombrocin			Taurocyamine			Glycoocyamine		
		kcat [1/s]	Km [mM]	kcat/Km [1/s*mM]	kcat [1/s]	Km [mM]	kcat/Km [1/s*mM]	kcat [1/s]	Km [mM]	kcat/Km [1/s*mM]
<i>Eisenia</i>	LK-WT	70.55 ± 1.58	1.27 ± 0.09	55.73 ± 3.49	8.67 ± 0.20	19.33 ± 1.12	0.45 ± 0.02	0.02 ± 0.0023	n.d.	n.d.
	LK-1A	38.21 ± 0.89	2.91 ± 0.09	13.20 ± 0.15	6.99 ± 0.09	21.32 ± 1.06	0.33 ± 0.02	0.08 ± 0.0061	n.d.	n.d.
	LK-2A	25.69 ± 0.69	2.21 ± 0.12	11.67 ± 0.32	4.99 ± 0.44	13.70 ± 1.01	0.37 ± 0.05	0.10 ± 0.0047	n.d.	n.d.
	LK-3A	26.47 ± 0.93	2.13 ± 0.09	12.43 ± 0.31	6.53 ± 0.07	15.40 ± 0.33	0.42 ± 0.01	0.16 ± 0.0066	n.d.	n.d.
	LK-4A	21.78 ± 1.26	1.98 ± 0.12	10.98 ± 0.23	9.31 ± 0.51	18.84 ± 1.47	0.50 ± 0.02	0.16 ± 0.0050	n.d.	n.d.
	LK-5A				6.94 ± 0.26	19.50 ± 0.47	0.36 ± 0.01	0.17 ± 0.0142	n.d.	n.d.
	LK-6A				10.67 ± 0.33	18.12 ± 0.53	0.59 ± 0.00	0.15 ± 0.0064	n.d.	n.d.
<i>Arenicola</i>	LK-7A				4.75 ± 0.39	17.17 ± 0.90	0.28 ± 0.01	0.11 ± 0.0061	n.d.	n.d.
	TK-WT				8.24 ± 0.14	2.67 ± 0.08	3.09 ± 0.05			
	TK-1A				2.13 ± 0.127	n.d.	n.d.			
<i>Arenicola</i>	MITK-WT				16.35 ± 0.14	0.56 ± 0.01	29.24 ± 0.75	5.424 ± 0.088	n.d.	n.d.
	MITK-1A				10.52 ± 0.34	3.25 ± 0.10	3.23 ± 0.09	3.844 ± 0.175	n.d.	n.d.
	MITK-2A				11.53 ± 0.77	1.28 ± 0.02	9.01 ± 0.54	6.438 ± 0.069	n.d.	n.d.

n.d., not determined.

野生型および変異体の酵素活性は, AK, CK, HTK については, それぞれの主基質であるアルギニン, クレアチン, タウロシアミン(基質ハイポタウロシアミンが入手不能であるためタウロシアミンで代用)に対して, LK 及び TK に関してはロンブリシン, タウロシアミン, グリコシアミンに対して測定した. 本実験で用いたロンブリシンは, シーボルトミミズ (*Pheretima sieboldi*) またはユムシ (*Urechis unicinctus*) の生体から直接イオン交換クロマトグラフィーによって精製したものであり [15-17], その他の基質に対しては市販のものを用いた.

また, 変異体の活性が低く, 酵素パラメータの算出が困難な場合には, 9.52 mM グアニジノ基質及び 4.76 mM ATP 存在下での反応速度 ($V: \mu\text{mol Pi} / (\text{min} \times \text{mg of protein})$) を測定し, その *kcat* 値を算出した.

3-2 GS 領域内 Ala 付加変異体の酵素活性

(1) AK, CK, HTK 変異体

上記3種類の 1A 付加変異酵素の主基質に対する活性(触媒効率: *kcat*/Km)は, 野生型の 1%以下に激減した (Fig.2, Table 1). また, データは示していないが, 変異体は他の基質に対しても活性を示さなかった. これは, AK, CK, HTK では GS 領域上での基質認識が最適化され, それぞれの酵素の基質特異性が維持されていることを示唆している. 尚, HTK はアミノ酸配列が AK に近く, AK 遺伝子から進化した酵素であることが分かっている[18].

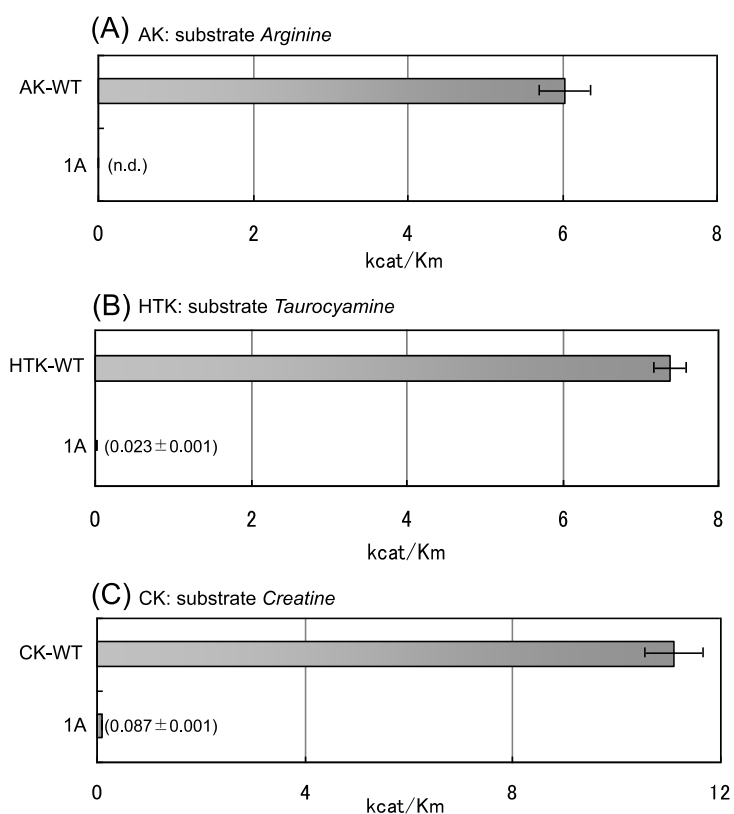


Fig.2 Comparison of enzyme activity (catalytic efficiency: *kcat*/Km) of wild-type and 1A mutant of *Nautilus* AK, *Siphonosoma* HTK and *Danio* CK. (A) Activity of AK wild-type and mutant for the substrate arginine (n.d., not determined), (B) Activity of HTK wild-type and mutant for the substrate taurocyamine, (C) Activity of CK wild-type and mutant for the substrate creatine.

(2) LK 変異体

主基質であるロンブリシンに対して, LK-1A 変異体の活性(*kcat*/Km)は野生型の 23.7%に低下した (Fig.3(A), Table 2). さらに, LK-2A, -3A, -4A 変異体の活性も野生型の 20%程度の活性を維持しており, GS 領域内への Ala4

残基までの挿入の影響は一定であり限定的であった。このように、LK の GS 領域への Ala 挿入変異体は、GS 領域に 1 アミノ酸残基挿入によりその活性が著しく低下した AK, HTK, CK (Fig. 2) とは全く異なる挙動を示した。

ロンブリシンは現在判明している PK の基質としては最も質量の大きい分子であるので、前述した基質分子の大きさと GS 領域のアミノ酸欠損数の関連性から判断すると、GS 領域の伸長 (Ala の挿入) はその活性を大きく低下させると予想された。ところが実際は、LK-1A から-4A の変異体は野生型の 2 割程度の活性を維持しており、LK の場合には、GS 領域のみでは基質認識が最適化されていないと推定できる。

一方、基質タウロシアミンに対しては、興味深いことに、LK-1A から LA-7A までの 7 種類の変異体の全てが野生型と同程度の活性を維持していた (Fig.3(B), Table 2)。これは、LK の GS 領域以外にタウロシアミンの認識に関わる部位が存在することを示唆している。実際に、タウロシアミンを基質として用いる TK 酵素は、これまでに少なくとも 3 回、原生物 (GS 領域のアミノ酸欠損数 5)、扁形動物 (欠損数 6)、環形動物 (欠損数 5) で生じている [19]。一方、基質グリコシアミンに対しては、LK 変異体は野生型より僅かに高い活性を示した (Table 2)。

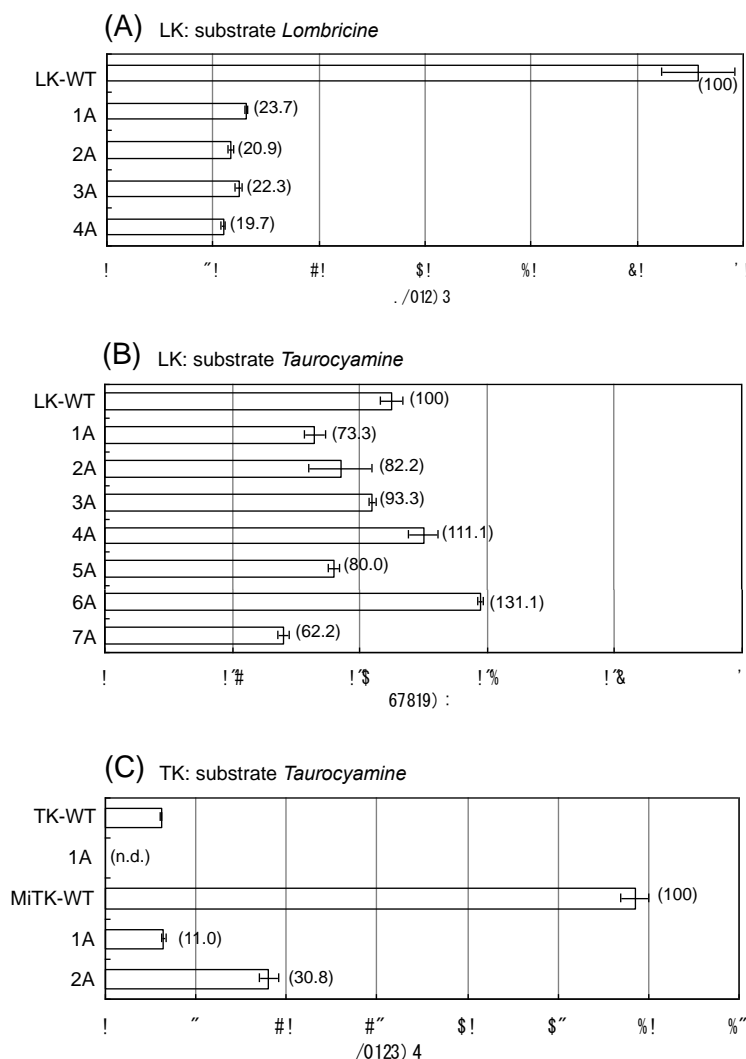


Fig.3 Comparison of enzyme activity (catalytic efficiency: kcat/Km) of wild-type and mutants of *Eisenia* LK and *Arenicola* TK and MiTK. (A) Activity of LK wild-type and mutants for the substrate lombricine, (B) Activity of LK wild-type and mutants for the substrate taurocyamine, (C) Activity of TK and MiTK wild-type and mutants for the substrate taurocyamine.

(3) TK 変異体

タマシキゴカイには 2 種類の TK(細胞質型及びミトコンドリア型)が存在し、細胞質型 TK(TK)の GS 領域のアミノ酸欠損数は5で LK と同じであるが、ミトコンドリア型 TK(MiTK)の欠損数は CK と同じ1である(Fig. 1). MiTK の欠損数1は、この遺伝子がミトコンドリア型 CK(MiCK)から進化したことを示す証拠でもある[19]. TK のアミノ酸配列は LK との高い一致率を示し(TK-LK 間で 70%, MiTK-LK 間で 60%), また、TK はロンブリシンに対しても活性を示すことから[12], 両者の基質認識機構は相互に類似している可能性がある。そこで、TK においても GS 領域内の Ala 付加変異体を作成した。

TK-1A 変異体は構造が不安定で失活が非常に早く、正確な酵素活性パラメータを決定することはできなかった。しかし、この変異体の反応速度は、少なくとも $k_{cat} = 2.13$ (1/s)以上と見積もられ(Table 2), 野生型(8.24)の 25%に相当した。この割合を LK-1A のもの(54%)と比較すると、TK-1A における Ala 挿入の影響は LK-1 に近く、劇的な活性低下をもたらした AK-1A, HTK-1A, CK-1A とは明らかに異なる。

一方、MiTK の 1A 及び 2A 変異体の活性(k_{cat}/K_m)は、野生型のそれぞれ 11%及び 31%に減少した。この減少率も、LK 変異体のものに近い。

また、MiCK 遺伝子由来である MiTK は、野生型及び変異体においてグリコシアミンに対してもある程度の活性を示す(Table 2)。これは、CK や MiCK は基質特異性の高い酵素であるものの、その野生型がグリコシアミンに対しては僅かな活性を示すことに由来している[21]。

結論

今回のデータは、LK や TK の GS 領域周辺の基質認識機構が AK や CK に比べると著しく弛緩している、言い換えれば LK や TK の GS 領域には様々なグアニジノ基質に対応する「可塑性」があることを示すものである。これは、環形動物内で 4 種の PK 酵素(GK, TK, LK, OK)が独自に進化・多様化した結果 [6], 基質特異性の完成度が低い LK や TK 等の酵素が生じたことを想起させるものである。

引用文献

- [1] Morrison, J.F., 1973. Arginine kinase and other invertebrate guanidine kinases. In: Boyer, P.C. (Ed.) The Enzymes, Academic Press, New York pp. 457-486.
- [2] Kenyon, G.L., Reed, G.H., 1983. Creatine kinase: structure-activity relationships. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 54, 367-426.
- [3] Wyss, M., Kaddurah-Daouk, R., 2000. Creatine and creatinine metabolism. Physiol. Rev. 80, 1107-1213.
- [4] Ellington, W.R., 2001. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. Ann. Rev. Physiol. 63, 289-325.
- [5] Ellington, W.R., Suzuki, T., 2006. Evolution and divergence of creatine kinase genes. In: Vial, C. (Ed.), Molecular Anatomy and Physiology of Proteins: Creatine Kinase. Nova Science, New York, pp. 1-27.
- [6] Yano, D., Uda, K., Nara, M., Suzuki, T., 2022. Diversity of phosphagen kinases in annelids: The first sequence report for a putative opheline kinase. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 257, 110662.
- [7] Suzuki, T., Kawasaki, Y., Furukohri, T., and 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, 1348, 152-159.
- [8] Yano, D., Uda, K., Nara, M., Suzuki, T., 2022. Diversity of phosphagen kinases in annelids: The first sequence report for a putative opheline kinase. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 257, 110662.
- [9] Zhou, G., Somasundaram, T., Blanc, E., Parthasarathy, G., Ellington, W.R. and Chapman, M., 1998. Transition state structure of arginine kinase: Implications for catalysis of bimolecular reactions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95, 8449-8454

- [10] Lahiri, S.D., Wang, P.F., Babbitt, P.C., McLeish, M.J., Kenyon, G.L. and Allen, K.N., 2002. The 2.1 Å Structure of *Torpedo californica* Creatine kinase Complexed with the ADP-Mg²⁺-NO₃⁻-Creatine Transition-State Analogue Complex. *Biochemistry*, 41, 13861-13867.
- [11] 市成秀一, 2006. フォスファージェンキナーゼ GS 領域の重要性について. 高知大学理学研究科修士論文.
- [12] Tanaka, K. and Suzuki, T., 2004. Role of amino acid residue 95 in substrate specificity of phosphagen kinases. *FEBS Lett.* 573, 78-82.
- [13] Tanaka K., Matsumoto T. and 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
- [14] Morrison, J.F., James, E., 1965. The mechanism of the reaction catalyzed by adenosine triphosphate-creatine phosphotransferase. *Biochem. J.* 97, 37-52.
- [15] 緒方宏昭, 1986. シーボルトミミズからのロンブリシンの分離. 高知大学理学部生物学科卒業論文.
- [16] 川端由紀, 1996. シーボルトミミズからのロンブリシンの分離法の確立. 高知大学理学部生物学科卒業論文.
- [17] 田中久美子, 2002. ロンブリシキナーゼの基質認識機構. 高知大学理学研究科修士論文.
- [18] Uda, K., Iwai, A., Suzuki, T., 2005. Hypotaurocyamine kinase evolved from a gene for arginine kinase. *FEBS Lett.* 579: 6756–6762.
- [19] Yano, D., Suzuki, T., 2022. Phosphagen kinases from five groups of eukaryotic protists (Choanomonada, Alveolate, Stramenopiles, Haptophyta, and Cryptophyta): Diverse enzyme activities and phylogenetic relationship with metazoan enzymes. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 257, January 2022, 110663.
- [20] Tanaka, K., Uda, K., Shimada, M., Takahashi, K., Gamou, S., Ellington, W.R., and Suzuki, T., 2007. Evolution of cytoplasmic and mitochondrial phosphagen kinases unique to annelid groups. *J. Mol. Evol.* 65, 616-625.
- [21] Edmiston, P.L., Schavolt, K.L., Kersteen, E.A., Moore, N.R., Borders, C.L., 2001. Creatine kinase: a role for arginine-95 in creatine binding and active site organization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1546, 291-298.