

アカサングのアルギニンキナーゼ (AK1) の好冷特性と日本産宝石サングの 分岐年代の推定

安藤凌¹, 山新晃弘¹, 加納義貴¹, 宇田幸司¹, 岩崎望², 鈴木知彦¹

¹高知大学理工学部生物科学科比較生化学研究室

²立正大学地球環境科学部環境システム学科環境生態学研究室

Keywords: 宝石サング, アカサング (*Corallium japonicum*), シロサング (*Pleurocorallium konojoi*), モモイロサング (*Pleurocorallium elatius*), アルギニンキナーゼ (arginine kinase), 分岐年代

Psychrophilic nature of arginine kinase 1 (AK1) from *Corallium japonicum*, and estimation of the divergence time of the three Japanese precious corals by UPGMA method

R. Andou¹, A. Yamashin¹, Y. Kanou¹, K. Uda¹, N. Iwasaki² and T. Suzuki¹

¹Laboratory of Comparative Biochemistry, Faculty of Science and Technology, Kochi University, Kochi 780-0056, Japan

²Faculty of Geo-environment Science, Rissho University, Kumagaya 360-0194, Japan

要約

日本近海の水深 80~300 m に分布する刺胞動物の宝石サング, アカサング, シロサング, モモイロサングの RNA シーケンスの結果により, 全ての種は2種類のアルギニンキナーゼ遺伝子 (AK1, AK2) を発現していることが明らかになった. AK1 は L-アルギニンに対して強い活性を示したが, 一方, AK2 は入手可能なグアニジノ基質のいずれに対しても有意な活性を示さなかった. AK1 においては, 結晶構造が判明している *Limulus* AK のアルギニン結合に関わる 7 つのアミノ酸残基が正確に保存されていた. 一方 AK2 においては, 基質アルギニン結合部位の中でも特に重要性が高く厳密に保存されている 2 つのアミノ酸残基, 75 位の Tyr と 241 位の Glu が, それぞれ His と Gly に置換されていた. 興味深いことに, このユニークな2箇所のアミノ酸置換は, 刺胞動物 *Nematostella* や軟体動物 *Clione* の AK においても見出された. *Nematostella* AK は微弱な AK 活性を残存しているが, 241 位の Gly を正常型の Glu に変異させても AK 活性の増強は見られなかった. これらのことから, このユニークな置換を持つ AK2 は未知のグアニジノ基質に対して活性を示す可能性が示唆された.

今回の研究では, アカサング AK1 の酵素活性を広い温度範囲において測定し, この酵素が好冷特性を持つかどうかを確かめることを主たる目的とした. その結果, AK1 反応の活性化エネルギー (E_a) は 27.5 kJ/mol と決定され, また, 好冷性酵素判別パラメータ, $\Delta(\Delta H^{\ddagger})_{p-m}$ 及び $\Delta(T\Delta S^{\ddagger})_{p-m}$, はそれぞれ, -23.1, -24.8 kJ/mol と計算された. これらの値は, アカサング AK1 が好冷性酵素であることを強く示唆している.

AK1 および AK2 のアミノ酸配列に基づき, 日本産3種類の宝石サングの分岐年代を UPGMA 法によって推定した. 刺胞動物と環形動物の分岐を5億 2500 万年前と仮定すると, AK1 のアミノ酸配列からは, アカサングは 510 万年前にシロサング, モモイロサングのグループから分岐したと推定された. シロサングとモモイロサングの分岐は 340 万年前と計算された. また, AK2 配列からは, 前者の分岐は, 990 万年前と計算され. AK1 の分子進化速度とはおよそ2倍の違いが見られた. 一方, シロサングとモモイロサングの分岐は AK1 とほぼ同様の値 (330 万年前) であった.

Abstract

RNA sequencing results for the three Japanese precious corals, *Corallium japonicum*, *Pleurocorallium konojoi* and *Pleurocorallium elatius*, distributed at depths of 80 to 300 m in the waters near Japan, indicated that all species express two types of arginine kinase genes (AK1, AK2). *Corallium japonicum* AK1 showed strong activity for L-arginine, while AK2 showed no significant activity for any of the available guanidine substrates. In the AK1 sequences, seven amino acid residues associated with the substrate arginine binding, deduced from the crystal structure of *Limulus* AK, were conserved. On the other hand, in the AK2 sequences, two amino acid residues, Tyr at position 75 and Glu at position 241, that are strictly conserved in normal AKs, were replaced by His and Gly, respectively. Interestingly, these two unique substitutions were also found in the AKs of the cnidarian *Nematostella* and the mollusk *Clione*. It has been shown that *Nematostella* AK has a very weak AK activity, and that the replacement of Gly241 by normal Glu gave no enhancement of the AK activity. These results suggest that AK2 with the unique substitutions may have an activity for an unknown guanidino substrate.

The purpose of this study is to measure the enzyme activity of *Corallium japonicum* AK1 over a wide temperature range and to determine whether this enzyme has psychrophilic nature or not. The activation energy (E_a) of the AK1 reaction was determined to be 27.5 kJ / mol, and the discrimination parameter for psychrophilic enzymes, $\Delta(\Delta H^{0\dagger})_{p-m}$ and $\Delta(T\Delta S^{0\dagger})_{p-m}$, was calculated to be -23.1 and -24.8 kJ / mol, respectively. These values suggest that *Corallium japonicum* AK1 is a psychrophilic enzyme.

The divergence times of the three Japanese precious corals were estimated from the amino acid sequences of AK1 and AK2 using the UPGMA method, assuming the divergence time of cnidarians and annelids to be 525 million years ago (Mya). In use of AK1 sequences, the divergence time of *Corallium japonicum* and the other two corals (*Pleurocorallium konojoi* and *Pleurocorallium elatius*) was estimated to be 5.1 Mya, and that of the latter two was 3.4 Mya. On the other hand, in use of AK2 sequences, the divergence time of *Corallium japonicum* and the other two was 9.9 Mya, and that of *P. konojoi* and *P. elatius* was 3.3 Mya.

1. 序論

AKを含むフォスファゲンキナーゼ (PK) は、ATP の高エネルギーリン酸基をグアニジノ基質に転移させ、高エネルギーリン酸化合物であるフォスファゲンを生成する一群のリン酸基転移酵素である。フォスファゲンはATPを大量に消費する筋肉繊維等で貯蔵され、ATPの再生時に速やかにリン酸基の供給源となる [1-5]。

温度依存性の観点から、酵素はその活性を有する温度帯ごとに「好熱性 (thermophilic)」、「中温性 (mesophilic)」、「好冷性 (psychrophilic)」に分類される [6-9]。通常の酵素の多くは中温性酵素であり、好熱性酵素としてはPCRに用いられるTaq DNAポリメラーゼがよく知られている。好冷性酵素は、寒冷地や深海などに生息するバクテリアに含まれることが多く、リパーゼなどにおいては工学的な応用と利用が盛んである [10]。

アルギニンキナーゼ (AK) は、主に無脊椎動物に含まれるPKの一種であり、ロブスターAKは中温性酵素として知られる [11]。最近、低温条件下でも基質アルギニンと高い親和性を示し、かつ効率的に酵素反応を触媒する好冷性酵素として、深海生物シロウリガイの2ドメイン型AK [12]や、ミナミヌマエビのAK1が報告された [13]。このような好冷性酵素は、中温性酵素に比べて活性部位の構造が柔軟であることが分かっている [14-19]。

宝石サンゴは刺胞動物に属し、日本産のものとしてはアカサンゴ: *Corallium japonicum*, シロサンゴ: *Pleurocorallium konojoi*, モモイロサンゴ: *Pleurocorallium elatius*がよく知られている。日本の珊瑚漁は、明治以降高知県で始まり、その後、長崎、鹿児島、小笠原などに漁場が広がり、珊瑚加工品は海外向けに輸出されて外貨の獲得に寄与してきた [20]。

上記3種類の日本産宝石サンゴについてはRNAシーケンスが行われており、それらは2種類のAK遺伝子、AK1と

AK2を発現していることが明らかになっている（宇田，未発表）。本研究ではアカサングのAK1及びAK2のリコンビナント酵素を発現・精製し，それらの酵素活性を測定した。その結果，AK1はL-アルギニンについて強い酵素活性を示したものの，AK2についてはL-アルギニンに活性を示さないばかりかクレアチン，グリコシアミン，タウロシアミンについても酵素活性を示さなかった。アカサングAK1について様々な温度条件で反応を行い，反応の活性化エネルギーや遷移状態の熱力学パラメーターを算出した。得られたパラメーターを，これまでに報告されている好冷性酵素や中温性酵素と比較したところ，AK1は好冷性型であることが分かった。アカサングは水深80～300mの比較的低温な環境に生息する宝石サングの一種であるので，この性質はアカサングの低温環境への適合戦略の一つとして捉えることができる。

加えてこの研究においては，日本産宝石サングのAK1とAK2のアミノ酸配列を用いて作成した系統樹からそれらの分岐年代について考察した。その結果，アカサングは，シロサング及びモモイロサングのグループと510-990万年前に分岐し，シロサングとモモイロサングの分岐は330-340万年前であると推定された。

2. 材料と方法

2-1 日本産宝石サング（アカサング，シロサング，モモイロサング）のRNAシーケンス

それぞれのtotal RNAはRNeasy Total RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて精製し，DNase (DNA-free, Ambion, Austin, TX)で処理した。RNAシーケンスのためのpaired-end cDNA libraryはtotal RNAを用いて作成し，Illumina HiSeq2500 systemによる解析を外注した。尚，方法の詳細は宇田によって別途報告予定である。

2-2 アカサングAK1及びAK2遺伝子のクローニング

アカサングのcDNAプールを用いて，AK1及びAK2遺伝子をPCR増幅した。増幅産物は，pGEM T-easyベクターのNde I/Hind IIIサイトに組み込んだ。配列の5'側には6 x Hisタグを付加した。増副産物は，その塩基配列を確認したのちに，発現ベクターpET30に組み換えた。

2-3 リコンビナント酵素の発現

リコンビナント酵素は，1mM IPTGの存在下で，15℃，48時間，発現誘導した。可溶化した酵素は，アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。精製された酵素の濃度は，ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)によって推定した。

2-4 酵素活性の測定

酵素活性は，AK反応（正反応）で生じるADPを，Pyruvate kinase及びLactate Dehydrogenaseを用いて連続的に変換し，最終的にNADHからNAD⁺への変化を340 nmで追跡することで測定した [21-22]。

2-5 活性化エネルギー及び遷移状態の熱力学パラメータの決定

AK反応の活性化エネルギーは，アレニウスの式: $\ln [k_{cat}^{ARG}] = -E_a/RT + c$ ，により求めた。

遷移状態の熱力学的パラメータは以下の関係式より求めた。

$$\Delta H^{\ddagger} = E_a - RT,$$

$$\Delta G^{\ddagger} = RT (\ln[k_B T/h] - \ln[k_{cat}])$$

及び

$$\Delta S^{\ddagger} = (\Delta H^{\ddagger} - \Delta G^{\ddagger})/T,$$

ここでRは気体定数 (8.3145 JK⁻¹·mol⁻¹)， k_B はボルツマン定数 (1.3807 × 10⁻²³ JK⁻¹)， h はプランク定数 (6.6261 × 10⁻³⁴ Js)， T は絶対温度である。

3. 結果と考察

3-1 アカサング AK1 と AK2 のアミノ酸配列の比較と日本産宝石サングの分子系統

アカサング AK1 のアミノ酸配列は、地中海産ベニサング: *Corallium rubrum* の AK 配列と同一であることはすでに報告した[23].

Fig. 1 は日本産宝石サング3種の AK1 及び AK2 のアミノ酸配列のアラインメントである. Fig. 1 に示したように, アカサング AK1 のアミノ酸配列は, モモイロサング及びシロサングの AK1 と, それぞれ 4 箇所及び 2 箇所異なっていた. モモイロサングとシロサングの AK1 間には, 2 箇所の違いがある.

一方, アカサング AK2 のアミノ酸配列は, モモイロサング及びシロサングの AK2 と, それぞれ 7 箇所及び 5 箇所異なっていた. モモイロサングとシロサングの AK2 間では, 2 箇所の違いが見られた.

これまで, AK の機能に関わるアミノ酸としては, *Limulus* AK の X 線結晶解析等により, 基質アルギニンの結合に関わる残基, 基質 ATP (ADP) の結合に関わる残基, 基質結合時の安定化に必要なイオンペア, グアニジノ基質の識別に関わる残基などが判明している [24-27].

日本産宝石サング3種の AK1 においては, 基質アルギニン結合に関わる 7 つのアミノ酸残基は正確に保存されていた (Fig. 1 の赤丸で示した残基). 一方 AK2 においては, 7 つのアミノ酸残基の中でも特に重要度の高い 2 つのアミノ酸残基, 75 位の Tyr 及び 241 位の Glu が, それぞれ His と Gly に置換されていた (Fig. 1 の緑の網掛け). Tyr75 及び Glu241 の側鎖は, いずれも基質アルギニンと直接水素結合して基質結合構造を安定化させており, これらの残基はほとんどの AK 酵素において保存されている. このユニークな 2 箇所の置換 (Y75H, E241G) は, 後述するように刺胞動物 *Nematostella* や軟体動物 *Clione* の AK においても見出されている.

一方, ATP (ADP) の結合に関わる 5 箇所のアルギニン残基は, AK1, AK2 の全ての配列で保存されていた (Fig. 1 の薄い青の菱形). また, グアニジノ基質の識別に関わる残基 (Fig. 1 の 96 位の緑の五角形) も, 一般的な AK 配列のアミノ酸 Tyr で保存されていた. 基質結合時の安定化に必要なイオンペアは, AK1 においては一般的な AK で見られる Asp69-Arg209 であったが, AK2 においては少数の AK で見られる Asp69-Lys209 型であった (Fig. 1 の黒の三角形).

AK1 および AK2 のアミノ酸配列に基づき, 日本産三種類の宝石サングの分岐年代を, MEGAX 中の UPGMA 法によって推定した (Fig. 2). 澄江 (チェンジャン) 動物群の発見に基づき刺胞動物と環形動物の分岐を 5 億 2500 万年前と仮定すると [28], AK1 のアミノ酸配列からは, アカサングは 510 万年前にシロサングとモモイロサングのグループと分岐したと推定された. シロサングとモモイロサングの分岐は 340 万年前と計算された. 一方, AK2 からは, それぞれ 990 万年前, 330 万年前と計算された. AK1 と AK2 では, 見かけ上, 分子進化速度におよそ 2 倍の違いが見られるが, これは今回の推定が少数のアミノ酸置換数から導出されたための誤差か, 或いは, AK1 と AK2 がオーソログ遺伝子ではないことに由来するものと思われる. アミノ酸配列の代わりに塩基配列を用いると配列間の見かけの置換数は増えるものの, 刺胞動物と環形動物の 5 億 2500 万年前の分岐年代をもとに近縁な宝石サングの分岐年代を推定する際には, より大きな誤差を生じる可能性が高い.

3-2 アカサング AK1 と AK2 の酵素活性

今回の研究では, AK1, AK2 で, それぞれ, 1.15 mg/ml, 0.36 mg/ml の濃度のリコンビナント酵素を精製することができた. この濃度は, 酵素活性を測定するには十分である. また, SDS-PAGE の結果は, 酵素が十分に精製されていることを示していた.

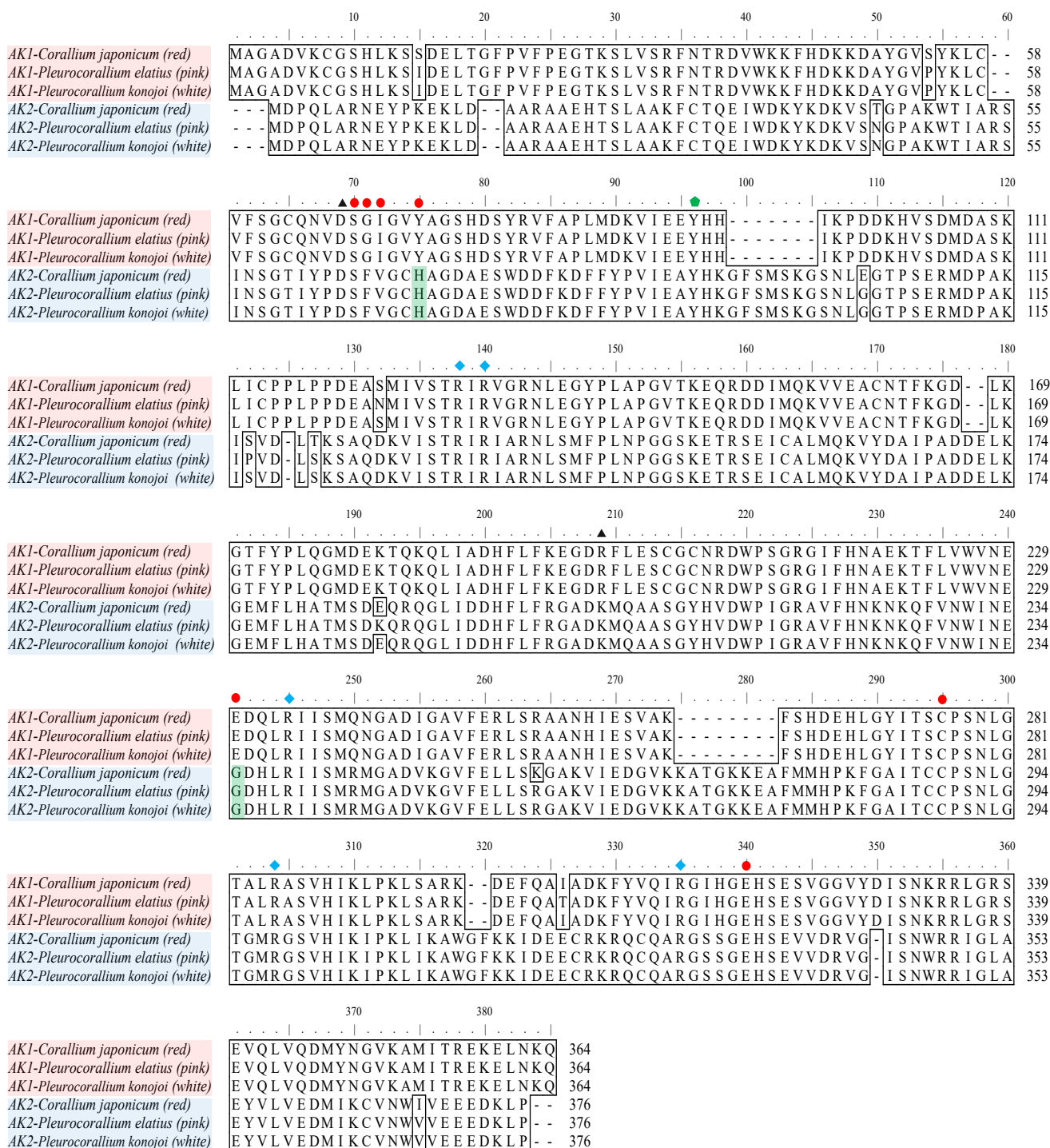


Fig. 1 Amino acid sequence alignment of AK1 and AK2 from three Japanese precious corals. The AK1 sequence is shaded in pink and the AK2 is in light blue. Amino acids conserved in each of the AK1 or AK2 sequences are boxed. The crystal structure of *Limulus* AK suggested involvements of seven amino acids in arginine binding (red circles), of five amino acids in ATP binding (light blue diamonds), of ion pairs required for stabilization in substrate-bound structure (black triangles) and of a residue involved in guanidino substrate recognition (green pentagon). Two unique amino acid mutations at positions 75 and 241 of AK2 are shaded in green.

5種のグアニジノ基質（L-アルギニン、D-アルギニン、クレアチン、グリコシアミン、タウロシアミン）を使用し、25℃における活性を確認したところ、アカサンゴ AK1 は L-アルギニンに対してのみ、 252 ± 0.42 [$\mu\text{moles}/\text{min} \cdot \text{mg protein}$] の強い酵素活性を示した。

一方、アカサンゴ AK2 は、15℃及び25℃において、上記5種類のグアニジノ基質に対する活性を示さなかった。前述したように、AK2 は7残基の基質結合部位のうちの2箇所にユニークな変異があり（Y75H 及び E241G）、これが AK 活性を示さない主たる理由と推定される。ところで、アカサンゴと同じ刺胞動物に属する *Nematostella* においても、同様のユニークなアミノ酸置換（Y75H 及び E241G）を持つ AK 酵素が発現している。この酵素には微弱な AK 活性が残存しているが [29]、241 位の Gly を正常型の Glu に変異させても（G241E）その活性が増強されることはなく、むしろ活性は約 50%減少している（未発表データ）。

現在、我々は軟体動物クリオネ: *Clione limacina* の AK について研究を進めている。クリオネは氷温中で生活し、2種類の AK、AK1 と AK2 を発現している。そして、その AK1 はアカサンゴの AK1 と同様に、L-アルギニンについて強い活性を示し、一方、AK2 については既存のグアニジノ基質に対して活性を持たない可能性が示唆されている。加えて、クリオネ AK2 のアミノ酸配列は、前述した AK の基質結合部位で保存性の特に高い Tyr75 及び Glu241 (Fig. 1) が、アカサンゴ AK2 と同様に His 及び Gly で置き換わっていた。刺胞動物であるアカサンゴと軟体動物であるクリオネは進化的に大きな隔たりがあるが、両者でこれらのユニークなアミノ酸置換が出現していることは驚きである。ここで、*Nematostella* の微弱な AK 活性が G241E 変異体においても増強されることはなくむしろ半減したことを考え合わせると、アカサンゴ、*Nematostella* 及びクリオネの AK2 は、アルギニンに対して主たる基質特異性を示す酵素ではなく、未知のグアニジノ基質に対して反応する酵素に進化している可能性が示唆される。

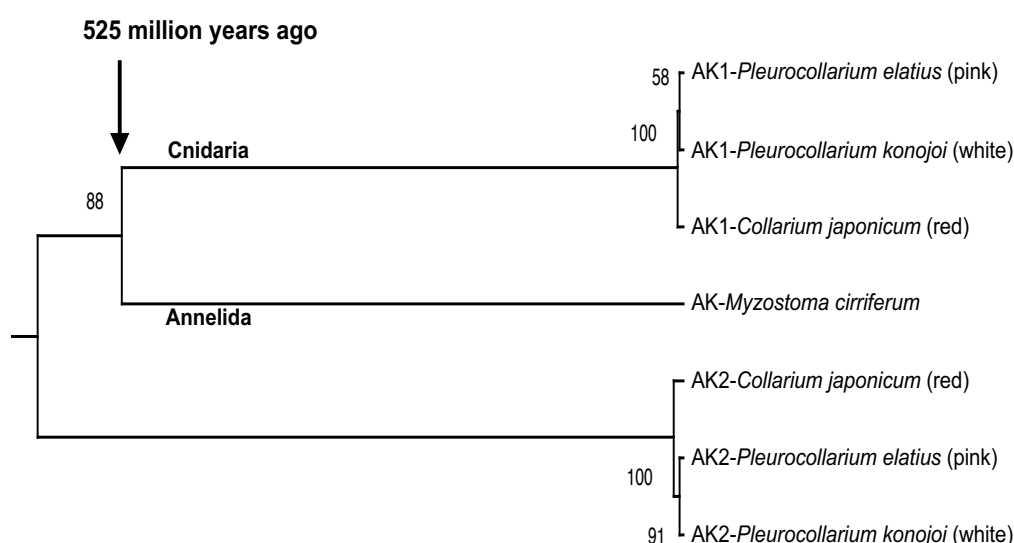


Fig. 2 Estimation of the divergence time of the three Japanese precious corals by the UPGMA method. Using the amino acid sequences in Fig. 1 and that of *Myzostoma*, a basal member of annelids [30], a phylogenetic tree was constructed by the UPGMA method. As an outer group, creatine kinase (CKs) sequences were used. Assuming the divergence time between *Myzostoma* and the *Corallium japonicum* AK1 to be 525 million years ago (Mya) (branch length in Fig.2: 0.42525), we estimated the branching time of each AK sequences from each branch lengths. The number at the branching point is the bootstrap value. The branch length and estimated divergence time of each sequence are as follows: *Corallium japonicum* AK1 (0.00414: 510 Mya), *Pleurocorallium konojoi* and *Pleurocorallium elatius* AK1 (0.00275: 340 Mya), *Corallium japonicum* AK2 (0.00804: 990 Mya), *Pleurocorallium konojoi* and *Pleurocorallium elatius* AK2 (0.00267: 330 Mya).

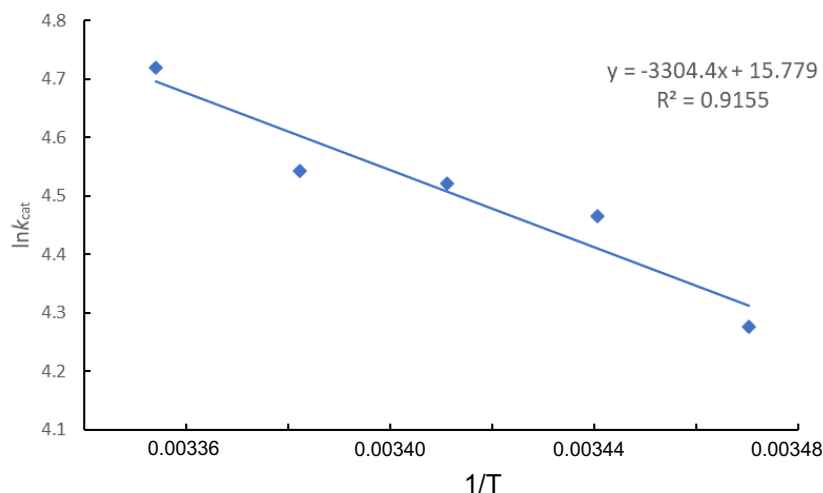


Fig. 3 Arrhenius plot for the AK1 reaction of *Corallium japonicum*. The enzyme reaction of *Corallium japonicum* AK1 was measured in the presence of 4.76 mM ATP under five different temperatures of 15, 17.5, 20, 22.5 and 25° C, and the $k_{\text{cat}}^{\text{ARG}}$ value of each reaction was obtained. Then, the activation energy (E_a) was obtained from the slope of the straight line.

3-3 アカサング AK1 反応の活性化エネルギーと遷移状態の熱力学的パラメータ

アカサング AK1 の酵素反応を、15, 17.5, 20, 22.5, 25 °C の 5 種類の温度条件で測定した。反応は 4.76 mM ATP 存在下、L-アルギニンの濃度を 8 段階に変えて基質アルギニンに対する $k_{\text{cat}}^{\text{ARG}}$ 及び K_m^{ARG} を求めた (Table 1)。4.76 mM ATP の存在下で、ATP の酵素に対する飽和度は 92-93% と推定され、温度依存的に大きく変化していなかった。この数値は、各温度における K_s^{ATP} の値として *Neocaridina* AK2 の値 [13] を用い、以下の式を用いることで計算した。

$$\text{酵素の ATP 飽和度} = [\text{ATP}] / ([\text{ATP}] + K_s^{\text{ATP}})$$

アカサングの $k_{\text{cat}}^{\text{ARG}}$ 及び K_m^{ARG} の値は温度の上昇とともに増加し、比較した他の AK と同様であった。一方、酵素の触媒効率の目安となる $k_{\text{cat}}^{\text{ARG}} / K_m^{\text{ARG}}$ 値は、アカサング AK1 では温度の上昇とともに低下していった。この傾向は、好冷性酵素である *Neocaridina* AK1 のものと似ていた (Table 1 を参照)。

Table 1 Kinetic parameters of AK reaction at different temperatures

Source	Reference	Temperature	kcat [1/s]	K_m^{ARG} [mM]	kcat/ K_m^{ARG}
<i>Corallium japonicum</i> AK1	This work	15	72 ± 0.87	0.072 ± 0.008	1000
		17.5	87 ± 2.26	0.099 ± 0.018	879
		20	92 ± 1.43	0.132 ± 0.012	697
		22.5	94 ± 2.33	0.148 ± 0.020	635
		25	112 ± 2.77	0.234 ± 0.024	479
<i>Neocaridina denticulate</i> AK1 (Psychrophilic)	Suzuki and Kanou [13]	15	170 ± 3.66	0.166 ± 0.036	1024
		17.5	183 ± 6.15	0.179 ± 0.060	1022
		20	244 ± 8.02	0.302 ± 0.061	808
		25	272 ± 7.16	0.439 ± 0.053	620
<i>Neocaridina denticulate</i> AK2 (Mesophilic)	Suzuki and Kanou [13]	15	108 ± 7.41	0.131 ± 0.077	824
		17.5	134 ± 7.66	0.196 ± 0.070	684
		20	174 ± 3.15	0.165 ± 0.021	1055
		22.5	196 ± 23.28	0.290 ± 0.161	676
		25	217 ± 12.58	0.344 ± 0.084	631

次に、 $k_{\text{cat}}^{\text{ARG}}$ の値を使ってアレニウスプロットを作成し (Fig. 3), その傾きから活性化エネルギー (E_a) を求めた (Table 2). アカサング AK1 反応の活性化エネルギー ($E_a = 27.5$ kJ/mol) は、中温性酵素として知られる *Neocaridina* AK2 及びロブスター AK の値、それぞれ 50.6, 54.4 kJ/mol よりも著しく低く、好冷性酵素として知られる *Neocaridina* AK1 や *Calyptogen* 2 ドメイン AK のものに近かった (それぞれ 35.8, 21.2 kJ/mol). E_a の低下は、低温環境下で効率的に酵素反応を触媒するために必要な特徴とされる [14-19].

Table 2 Activation energy (E_a) and thermodynamic parameters for the transition state of AK reactions.

Sources	Method for determination of k_{cat} value	Reference	E_a (kJ/mol)	$\Delta H^{\circ\ddagger}$ (kJ/mol)	$\Delta G^{\circ\ddagger}$ (kJ/mol)	$\Delta S^{\circ\ddagger}$ (J/mol/K)	$\Delta(\Delta H^{\circ\ddagger})_{p-m}$ (kJ/mol)	$\Delta(T\Delta S^{\circ\ddagger})_{p-m}$ (kJ/mol)	Type
<i>Collarium japonicum</i> AK1	2	This work	27.5	25	61.3	-121.9	-23.1	-24.8	psychrophilic
<i>Calyptogen</i> two-domain AK	1	Suzuki et al. [12]	21.2	18.8	69.4	-170	-29.3	-39.2	psychrophilic
<i>Neocaridina</i> AK1	1	Kanou and Suzuki [13]	35.8	33.3	59.1	-86.6	-18.7	-18.4	psychrophilic
<i>Neocaridina</i> AK2	1	Kanou and Suzuki [13]	50.6	48.1	59.6	-38.6	0.0	0.0	mesophilic
Lobster AK	3	Travers et al. [11]	54.4	52	61	-25	3.9	4.1	mesophilic

1 Based on the k_{cat} of the complete two-substrate kinetic parameters

2 Based on the observed k_{cat} in the presence of 4.76 mM ATP

3 Based on the observed k_{cat} in the presence of 10 mM arginine and 5 mM ATP.

アカサング AK1 反応の E_a を用いて、熱力学パラメーターを算出した ($\Delta H^{\circ\ddagger} = 25.0$ kJ/mol, $\Delta G^{\circ\ddagger} = 61.3$ kJ/mol, $\Delta S^{\circ\ddagger} = -121.9$ J/mol/K) (Table 2). これらの値を用いて, Lonhienne et al. [17]によって提案されている好冷性酵素の判別パラメータ, $\Delta(\Delta H^{\circ\ddagger})_{p-m}$ 及び $\Delta(T\Delta S^{\circ\ddagger})_{p-m}$ を算出した. ここで, p は判定される酵素の熱力学的パラメータの値, m は中温性酵素の値を示す. これらの値が大きく負の値を取る場合は低温性酵素と判断される. アカサング AK1 のそれぞれの値は, - 23.1, - 24.8 kJ/mol と計算され, この結果を中温性や好冷性酵素のものと比較すると (Table 2), アカサング AK1 は好冷性酵素であると結論される.

結論

日本産宝石サング, アカサング, シロサング, モモイロサングは, 2 種類のア르기ニンキナーゼ遺伝子 (AK1, AK2) を発現している. このうち AK1 は L-ア르기ニンに対して強い活性を示した. AK1 反応の活性化エネルギー, 及び好冷性酵素判別パラメータ, $\Delta(\Delta H^{\circ\ddagger})_{p-m}$ 及び $\Delta(T\Delta S^{\circ\ddagger})_{p-m}$ は, アカサング AK1 が好冷性酵素であることを強く示唆している. 一方, アカサング AK2 はいずれのグアニジノ基質に対しても有意な活性を示さなかった. この理由は, 酵素の基質ア르기ニン結合部位として機能する重要度が高い 2 つのアミノ酸残基, 75 位の Tyr と 241 位の Glu が, それぞれ His と Gly に変異しているためと推定した. しかし, このユニークな 2 箇所のアミノ酸置換を持つ AK が, 刺胞動物 *Nematostella* や軟体動物 *Clione* の AK においても見いだされたことから, これらが未知のグアニジノ基質に対して活性を示す可能性を指摘した. AK1 および AK2 のアミノ酸配列に基づき, 日本産三種類の宝石サングの分岐年代を UPGMA 法によって推定した. 刺胞動物と環形動物の分岐を 5 億 2500 万年前と仮定し, アミノ酸配列からは, アカサングは 510-990 万年前にシロサング, モモイロサングのグループから分岐したと推定された. シロサングとモモイロサングの分岐は 330-340 万年前と計算された.

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] Somero, G.N., 1995. Proteins and temperature. *Annu Rev Physiol.* 57, 43-68.
- [7] Hochachka, P. W., Somero, G. N., 2002. *Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution*; Oxford University Press, 466 pp. ISBN 0-195-11702-6.
- [8] Somero, G.N., 2004. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies". *Comp. Biochem. Physiol. B* 139, 321-333.
- [9] Arcus, V.L., Mulholland, A.J., 2020. Temperature, Dynamics, and Enzyme-Catalyzed Reaction Rates. *Annu Rev Biophys.* 2020, 49:163-180.
- [10] Ramle, Z., Rahim, R.A., 2016. Psychrophilic Lipase from Arctic Bacterium. *Trop Life Sci Res.* 27(suppl), 151-157.
- [11] Travers, F., Bertrand, R., Roseau, G., van Thoai, N., 1978. Cryoenzymologic studies on arginine kinase: solvent, temperature and pH effects on the overall reaction. *Eur. J. Biochem.* 88, 523-528.
- [12] Suzuki, T., Yamamoto, K., Tada, H., Uda, K., 2012. Cold-adapted features of arginine kinase from the deep-sea clam *Calymene* *kaikoi*. *Marine Biotechnol.* 14, 294-303.
- [13] Suzuki, T., Kanou, Y., 2014. Two distinct arginine kinases in *Neocaridina denticulata*: psychrophilic and mesophilic enzymes. *Int J Biol Macromol.* 67, 433-438.
- [14] Gerday, C., Aittaleb, M., Arpigny, J.L., Baise, E., Chessa, J.P., Garsoux, G., Petrescu, I., Feller, G., 1997. Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochim. Biophys. Acta* 1342, 119-131.
- [15] Feller, G., Gerday, C., 1997. Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cell. Mol. Life Sci.* 53, 830-841.
- [16] Smalas, A.O., Leiros, H.K., Os, V., Willassen, N.P., 2000. Cold adapted enzymes. *Biotechnol. Annu. Rev.* 6, 1-57.
- [17] Lonhienne, T., Gerday, C., Feller, G., 2000. Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. *Biochim. Biophys. Acta* 1543, 1-10.
- [18] D'Amico, S., Claverie, P., Collins, T., Georlette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Meuwis, M.A., Feller, G., Gerday, C., 2002. Molecular basis of cold adaptation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 357, 917-925.
- [19] Siddiqui, K.S., Cavicchioli, R., 2006. Cold-adapted enzymes. *Annu. Rev Biochem.* 75, 403-433.
- [20] 岩崎 望, 2017. 宝石サンゴの持続的利用. *生物の科学 遺伝* 73, 214-220.
- [21] Ellington, W.R., 2001. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Ann. Rev. Physiol.* 63, 289-325.
- [22] Morrison, J.F., James, E., 1965. The mechanism of the reaction catalyzed by adenosine triphosphate-creatine phosphotransferase. *Biochem. J.* 97, 37-52.
- [23] Matsuo, T., Yano, D., Uda, K., Iwasaki, N., Suzuki, T., 2017. Arginine Kinases from the Precious Corals *Corallium rubrum* and *Paracorallium japonicum*: Presence of Two Distinct Arginine Kinase Gene Lineages in Cnidarians. *Protein J.* 36, 502-512.
- [24] Zhou, G., Somasundaram, T., Blanc, E., Parthasarathy, G., Ellington, W.R., Chapman, M.S., 1998. Transition state structure of arginine kinase: implications for catalysis of bimolecular reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8449-8454.
- [25] Suzuki, T., Fukuta, H., Nagato, H., Umekawa, M., 2000. Arginine kinase from *Nautilus pompilius*, a living fossil. Site-directed mutagenesis studies on the role of amino acid residues in the guanidino specificity region. *J. Biol. Chem.* 275, 23884-23890.
- [26] 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.
- [27] Tanaka, K., Suzuki, T., 2004. Role of amino-acid residue 95 in substrate specificity of phosphagen kinases. *FEBS Lett.* 573, 78-82.

- [28] Xianguang, H., Bergström, J., 2003. The Chengjiang fauna -- the oldest preserved animal community. *Paleontol. Res.* 7, 55–70.
- [29] Uda, K., Ellington, W.R., Suzuki, T., 2012. A diverse array of creatine kinase and arginine kinase isoform genes is present in the starlet sea anemone *Nematostella vectensis*, a cnidarian model system for studying developmental evolution. *Gene*. 497, 214-227.
- [30] Yano, D., Mimura, S., Uda, K., Suzuki, T., 2016. Arginine kinase from *Myzostoma cirriferum*, a basal member of annelids. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 198, 73-78.