

## *Streptomyces* 属放線菌由来の 高基質特異性 L-グルタミン酸オキシダーゼに関する研究

中山 夏女・稲垣 賢二  
(農芸化学コース)

### Studies on L-Glutamate Oxidase with Strict Substrate Specificity from *Streptomyces* sp.

Natsume Nakayama and Kenji Inagaki

(Course of Agrochemical Bioscience)

L-glutamate oxidase (LGOX) from *Streptomyces* sp. is a heterohexameric flavin enzyme that catalyzes the oxidative deamination of L-glutamate to form  $\alpha$ -ketoglutarate with ammonia and hydrogen peroxide. LGOX shows strict substrate specificity for L-Glu. In addition, it is highly thermostable and pH stable. Because of these properties, LGOX is currently used as a biosensor for the trace determination of L-Glu in the food industry and clinical laboratories. The full-length cDNA is 2103 bp and is encoded by a single polypeptide chain consisting of 701 residues including subunits  $\alpha$ - $\gamma$ - $\beta$ . The LGOX gene was heterologously expressed in *Escherichia coli* JM109. The LGOX precursor expressed in *E. coli* is a homodimer with weak enzymatic activity and becomes a heterohexamer upon activation by protease treatment. X-ray crystallography and docking studies of purified recombinant LGOX suggest that the Arg305 residue is a key residue for substrate recognition. Mutant analysis showed that Arg305 is essential for substrate recognition, as the activity toward L-Glu was greatly reduced and substrate specificity was changed in some enzymes. The functional analysis of R305E-LGOX, which is an L-Arg oxidase, revealed that R305E-LGOX can be used as an enzyme biosensor for L-Arg.

**Key words :** L-glutamate oxidase, biosensor, substrate recognition, X-ray crystallography, modification of substrate specificity

#### はじめに

放線菌 *Streptomyces* sp. 由来 L-グルタミン酸オキシダーゼ (LGOX) は、L-グルタミン酸 (L-Glu) の酸化脱アミノ化反応を触媒する L-アミノ酸オキシダーゼ (LAAO) の一種であり、1 分子の L-Glu、酸素、水から 1 分子の  $\alpha$ -ケトグルタル酸、過酸化水素、アンモニアを生成する。蛇毒由来のものを代表例とする一般的な LAAO は、幅広いアミノ酸を酸化分解する低基質特異性酵素である<sup>1,2)</sup>。しかし、LGOX は当研究室で研究が進められてきた糸状菌 *Trichoderma viride* 由来の L-リシン  $\alpha$ -オキシダーゼ (LysOX)<sup>3,4)</sup> とともに、厳格な基質特異性を示す高基質特異性の LAAO である。加えて、熱安定性が高く、60℃、20 分間の熱処理後も高い残存活性を示す。さらに pH に対する安定性にも優れている<sup>5)</sup>。これらの性質から、LGOX は食品や生体試料中の L-Glu の微量定量、検出といった面で非常に有用であり、現在、食品の旨味成分の測定や医療分野で酵素センサーとして幅広く

利用されている<sup>6-8)</sup>。

ここでは、我々がこれまでの研究で明らかにしてきた、LGOX の酵素学的性質や厳格な基質特異性を示す構造的特徴、成熟化機構等、LGOX の興味深い諸性質を紹介する。さらに、LGOX を基に作成した L-アルギニンオキシダーゼ (ArgOX) を始めとする基質特異性変換酵素の有用性についても説明する。

#### LGOX の大腸菌発現系構築

元々本酵素は生産菌である放線菌をふすま培養という固体培養法で培養し、生産させていた<sup>9)</sup>。しかし、本方法では培養期間が非常に長く、生産量も微量であった。LGOX を大腸菌で発現させた例はなく、LGOX の簡便な精製法を確立するために、我々は新たに *E. coli* JM109 を用いた発現系の構築を行った<sup>5)</sup>。

まず遺伝子クローニングのため、LGOX 精製酵素標品

のN末端配列の解析結果を用いて、LGOXの $\alpha$ 、 $\gamma$ サブユニットのDNAプローブを作成した。これをT4ポリヌクレオチドキナーゼと $^{32}\text{P}$ -ATPで標識し、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。ゲノムDNAを制限酵素BamH1で処理後断片を回収し、宿主に*E. coli* JM109、ベクターにpUC19を用いたゲノムライブラリーを構築し、作製したプローブでスクリーニングを行った。2回のスクリーニングの結果得られたLGOX遺伝子全体を含む5.5 kbのインサート断片をpBK-CMVに導入し、プラスミドpGS1を作製した。pGS1のシーケンス解析を行ったところ、本酵素は2106 bp、701アミノ酸からなり、サブユニットを $\alpha$ - $\gamma$ - $\beta$ の順で含む1本のポリペプチド鎖でコードされていることがわかった。次に*E. coli* JM109でLGOXを過剰発現させるため、得られたLGOX遺伝子をベクターpKK223-3に導入し、発現プラスミドpKK-LGOXを構築した。この大腸菌形質転換体は、元酵素と比較して活性が低く不安定な前駆体酵素としてLGOXを発現していた。これを放線菌*Streptomyces griseus*由来のメタロエンドペプチダーゼ(Sgmp)で処理すると、活性と安定性が大幅に上昇した。さらに、Sgmp処理した酵素は、15% SDS-PAGEで*Streptomyces* sp.由来の野生型LGOXと同様、約40, 17, 10 kDaに相当する主要なバンドを示すことを確認した(Fig. 1)。これらのフラグメントをN末端配列解析にかけたところ、末端に開始メチオンがないことから、SgmpはサブユニットのN末端付近と内部を切断することでLGOX成熟体となり、活性化することが示された。そして、Sgmp処理後にカラム精製し、組換えLGOXの反応速度論解析と基質特異性を検討した結果、*Streptomyces* sp.由来

LGOXと同等の性質を示した。この、ペプチダーゼ切断により活性化し、耐熱性が向上することを利用した大腸菌形質転換体からの簡便な組換えLGOXの大量精製系を確立することができた事で、本酵素の産業利用と研究利用の範囲は大きく拡大した<sup>5)</sup>。

### LGOX 成熟化機構の解析

先述のように、LGOXは大腸菌において701アミノ酸から成るポリペプチドが重合したホモ二量体の活性が低い前駆体として発現する<sup>5)</sup>。そして、プロテアーゼ消化により切断されて、ヘテロ6量体構造の高活性を示す成熟体になる。LGOXの他にも、LysOX<sup>3,4)</sup>や*Pseudomonas* sp. P-501由来L-フェニルアラニンオキシダーゼ<sup>10)</sup>等、幾つかのLAAOは前駆体として発現し、その後プロテアーゼによる切断を受け活性化されるが、これらは前駆体の構造が明らかになっており、活性化機構の仕組みが考察されている<sup>11-13)</sup>。LGOXはこれらのLAAOと活性化の仕組みが異なっているため、成熟化機構の解明は、LGOXの知見を深めることにつながると考えられる。成熟化機構解明のための手段として、LGOX前駆体の構造と成熟体との構造比較を行うことが第一に必要である。我々は最近LGOX前駆体の結晶化に成功し、構造解析を試みている最中である。LGOXの成熟化機構の解明は、類似性を持つ酵素の知見を深めること、放線菌における発現調節のパターンの1つを提示することになり、非常に興味深い分野である。

### LGOXの肝機能バイオセンサーへの応用

L-グルタミン酸は食品の旨味成分であるとともに、体内では興奮性の神経伝達物質としても働くことから、L-Gluの検出、定量は食品や医療分野において大変重要である。ここで、LGOXの安定性と厳格な基質特異性を用いたL-Glu定量キットは主に食品工業での利用が進む一方、測定時に生体内の様々な成分に干渉される医療分野での応用は停滞していた。したがって、我々はLGOXを用いて血中のL-Glu濃度を簡便に測定する微量分析システムの構築を行った<sup>6)</sup>。ここで、L-グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ( $\gamma$ -GTP)及び血中L-グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)は基質によって生成物としてL-Gluを放出する酵素である。これら酵素は人体の様々な場所に存在するが、特に肝臓や心臓、骨格筋に多く含まれており<sup>14)</sup>、これら三酵素の活性は肝機能の指標とされている。こうした組織に異常が起こると三酵素が血中に大量放出されるため、酵素活性の上昇は心筋梗塞、肝炎、黄疸などの指標となる。固定化したLGOXと過酸化水素電極を用いて、反応による電流の増加量の変化から生体内のL-Gluを特異的に定量したところ、L-Glu濃度の増加を示す吸光度の増加量は酵素の活性に

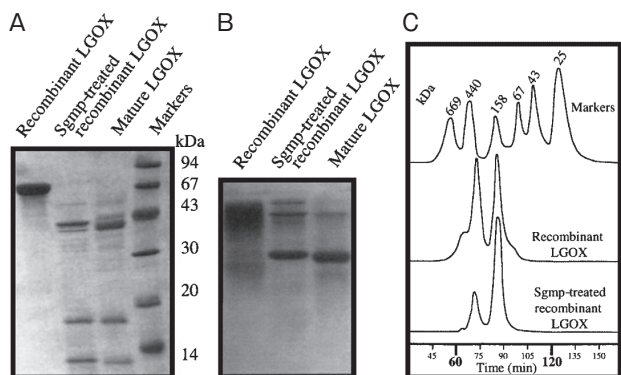


Fig. 1 Electrophoretic and chromatographic analysis of recombinant LGOX and Sgmp-treated recombinant LGOX.<sup>5)</sup>  
(A) 15% SDS-PAGE of recombinant LGOX precursor from *Streptomyces* sp X-119-6, its Sgmp digestion, and LGOX maturation. Molecular weight markers are shown on the right side of the gel. (B) 15% Native PAGE of LGOX isolated from *Streptomyces* sp X-119-6, its Sgmp digest, and LGOX mature. (C) FPLC gel filtration profiles of recombinant LGOX (2 mg/injection) and Sgmp-treated recombinant LGOX (2 mg/injection).

対して GOT で 127 U/l, GPT で 88 U/l,  $\gamma$ -GTP では 300 U/l まで直線性を示した (Fig. 2). よって, このシステムが GPT, GOT,  $\gamma$ -GTP 活性の迅速, 高感度の定量に活用でき, 簡便な肝機能センサーとして活用できることを実証できた<sup>6-8)</sup>.

### LGOX と LGOX 前駆体の生化学的諸性質

LGOX と成熟化前の LGOX 前駆体の最適 pH は, それぞれ pH 7.4 と 7.0 であり, 殆ど変わらない<sup>5)</sup>. 最適温度は LGOX 前駆体が 35°C, LGOX は 58°C と, 大きく異なる結果となった<sup>5)</sup>. また, 熱安定性を検討したところ, LGOX 前駆体は 60°C, 30 分間の熱処理で失活した. 一方, LGOX は 60°C, 30 分間の熱処理後も 80% の活性を維持していた<sup>5)</sup>. さらに L-Glu に対する速度論解析を行ったところ,  $k_{cat}/K_m$  値 (触媒効率) は LGOX 前駆体と LGOX を比較すると, LGOX が 100 倍以上高い値を示し, 成熟化により熱安定性や活性が大幅に上昇することが示された. また, 大変興味深いことに LGOX 前駆体は活性が低いものの, LGOX と同様に L-Glu に対する厳格な基質特異性を有していた.

### LGOX の X 線結晶構造解析及びドッキングスタディにより明らかとなった構造的特徴

我々は, *E. coli* JM109 で発現させた組み換え LGOX の結晶化及び X 線結晶構造解析に成功し<sup>15)</sup>, さらにドッキングスタディ<sup>16)</sup>を行ったことで, LGOX の全体構造 (Fig. 3), 活性中心構造 (Fig. 4) と厳格な基質特異性に寄与する構造的特徴を明らかにした. LGOX の 1 つのサブユニットは  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  フラグメントと FAD を 1 分子持つ. これが 2 量体を形成し, 基質結合部位は 2 量体の接地面から逆を向くように位置している. また, アミノ酸 1-17, 364-376, 387-390, 481-522, 674-701 の電子密度は確認できず, 単一ポリペプチド LGOX のおおよその切断部位が判明した. 補酵素である FAD は奥に埋められるように位置し, 多数のタンパク質残基と相互作用しており, イ



Fig. 3 Overall structure of the LGOX mature.<sup>15)</sup> Functional hexamer with two protomers ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ). On the left side of the protomer, the  $\alpha$ -fragment,  $\beta$ -fragment, and  $\gamma$ -fragment are color-coded orange, green, and blue, respectively; FAD is shown in the CPK color scheme; the N terminus of the  $\beta$ -fragments and  $\gamma$ -fragments and the C terminus of the  $\alpha$ -fragments and  $\gamma$ -fragments are indicated by arrows.

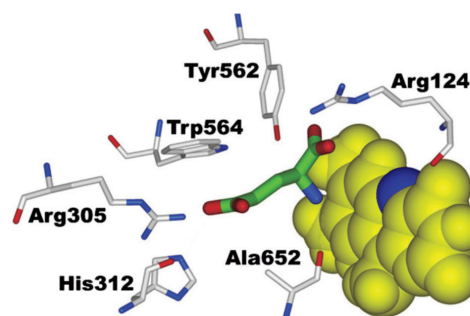


Fig. 4 Proposed docking study model for L-glutamate binding at the active site of LGOX.<sup>16)</sup> The residues associated with the L-glutamate binding are indicated as sticks with color according to the atom type. The isoalloxazine ring of FAD is shown in yellow for CPK, and N5 is shown in blue.

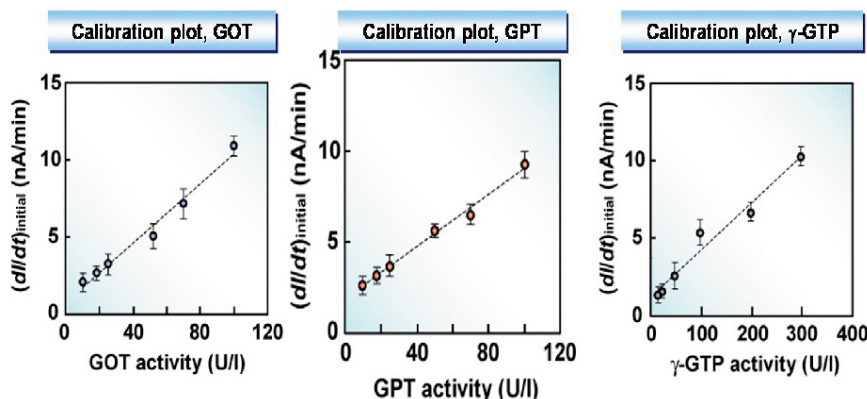


Fig. 2 Measurement of liver function values (GOT, GPT,  $\gamma$ -GTP) in serum using LGOX and hydrogen peroxide electrode.<sup>8)</sup>

Reactions were performed in 100 mM potassium phosphate buffer containing 100 mM KCl, and 10  $\mu$ l of serum sample was used.



ソアロキサジン環は、FAD 結合ドメインと基質結合ドメインとの界面に位置していた。多くのフラビン酵素の特徴であるタンパク質の表面から内部に伸びる2つの漏斗状のくぼみがFADに近い活性部位で終端していた。この構造をLAAOと比較したところ、LGOXの漏斗形状はLAAOよりも狭く、複雑であったため、活性ポケットに侵入できる基質を制限する要因になると考えられた。ドッキングスタディシミュレーションからは活性中心の基質L-グルタミン酸の結合に関連する残基が明らかとなった。モデルでは、Arg305の側鎖がL-グルタミン酸の側鎖と水素結合を生じると考えられ、またTrp564は空間を狭めることで重要であると示唆された。そこで、鍵残基であると推測されたArg305の基質認識への寄与を明らかにするため、飽和変異導入を行い、計19種類の変異体解析を行った<sup>16)</sup>。その結果、R305変異LGOXはL-Gluへの活性をほとんど消失し、触媒効率も低下していた (Fig. 5)。基質特異性に関しては厳格さが崩れ、新たにL-Tyr, L-His, L-Argに対する活性を獲得し、基質

特異性が劇的に変化した。これら諸性質が大幅に変化していたため、Arg305はL-グルタミン酸の側鎖認識を担う重要な残基であることが証明された<sup>16)</sup>。

#### ArgOXとなったR305E変異LGOXの結晶構造

我々は、作成したR305X変異LGOXの中で、L-アルギニンオキシダーゼ(ArgOX)へと性質が変化したR305E-LGOX (Fig. 6)の基質複合体のX線結晶構造解析に成功した (Fig. 7)。その結果、Fig. 7bに示したように基質L-ArgはGlu305と相互作用しているだけでなく、Asp433, Glu617とも相互作用しており、計3つの酸性残基を用いて基質をトラップすることで厳格な基質特異性を示すことがわかった<sup>17)</sup>。なかでもGlu617は基質が結合する前のLGOXでも基質側鎖と相互作用可能と考えられる位置に存在しており、LGOXの基質側鎖の認識に関わる可能性が示唆された。

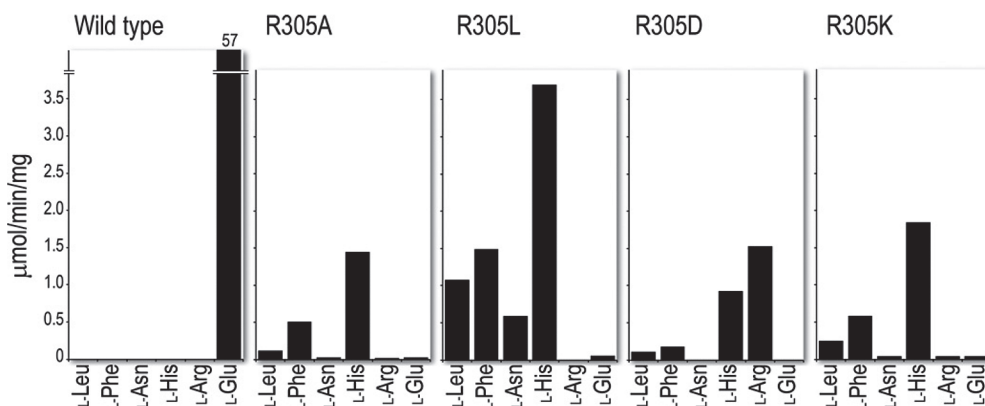


Fig. 5 Oxidative activities of wild-type and R305X LGOXs toward L-leucine, L-phenylalanine, L-asparagine, L-histidine, L-arginine, and L-glutamate.<sup>16)</sup>

The values are the average of two independent experiments.

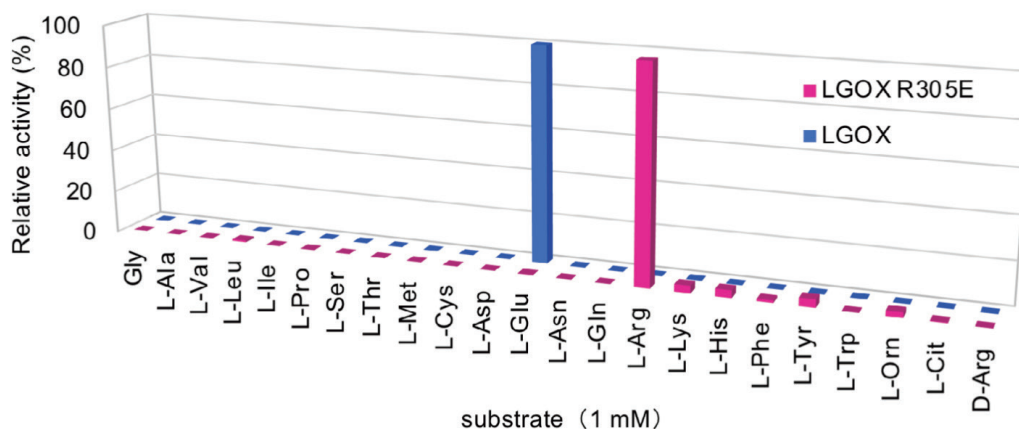


Fig. 6 Comparison of substrate specificity between R305E-LGOX and LGOX.<sup>17)</sup>

Relative oxidative activity is shown in magenta for R305E-LGOX and blue bars for LGOX. The most active substrate was designated as 100% relative activity. Enzyme activity was measured at 40°C with 1 mM substrate.

### R305E-LGOX (ArgOX) のバイオセンサーとしての性能評価

Fig. 6 に示したように ArgOX に性質が変化した R305E-LGOX は、L-Glu に全く反応せず L-Arg に対して厳格な基質特異性を示す<sup>17)</sup>. L-Arg はヒトの代謝経路に関与、また、医療分野でのバイオマーカーになり得るため<sup>18,19)</sup>, L-Glu のバイオセンサー同様、L-Arg に関しても迅速かつ簡便な定量のための酵素法の開発が望まれている. 例えば *Pseudomonas* sp. 中に見い出された L-アルギニンオキシダーゼ (AROD, EC 1.4.3.25)<sup>20)</sup> による定量は、簡便であるが、AROD の L-Arg に対する比活性が低いため、これに代わる新たな酵素法が求められていた. 我々が作製した R305E-LGOX は、L-Arg に対する比活性が  $7.5 \text{ Umg}^{-1}$  と AROD の約 40 倍の比活性を持ち (Table 1), 熱や pH に対する安定性にも優れている. これらの特性は、酵素ベースのバイオセンサーへの応用に適している. また、R305E-LGOX による L-Arg の酸化的脱アミノ化の副産物として LGOX と同様、過酸化水素が生成する. 我々はこの性質を利用して、過酸化水素量を 4-アミノアンチピリン TOOS (N-ethyl-N-[2-hydroxy-3-sulfopropyl]-m-toluidine) 法<sup>21)</sup> で測定した. L-Arg の濃度を変化させた溶液 (0-100  $\mu\text{M}$ ) を調製し、 $0.25 \text{ Uml}^{-1}$  の R305E-LGOX

を含む反応混合物に添加し、 $28^\circ\text{C}$ 、 $555 \text{ nm}$  での吸光度をモニターしたところ、5 分前後のインキュベーションで吸光度が最大となった<sup>17)</sup>. 最大値を記録し、L-Arg 濃度に対してプロットした結果、L-Arg 濃度 0 ~ 100  $\mu\text{M}$  の範囲で  $555 \text{ nm}$  の吸光度と L-Arg の間に直線関係があり、決定係数は 0.9993 であった (Fig. 8). 4 アミノアン

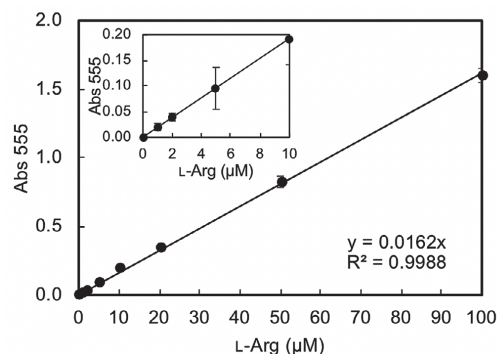


Fig. 8 Linear relationship between hydrogen peroxide production by LGOX R305E and L-arginine concentration.<sup>17)</sup>

The absorbance at  $555 \text{ nm}$  is plotted against the L-arginine concentration from 0 to  $100 \mu\text{M}$ . The magnified plot in the range from 0 to  $10 \mu\text{M}$  of L-arginine is shown as an inset. The linear regression equation with the coefficient of determination is also shown in the graph.

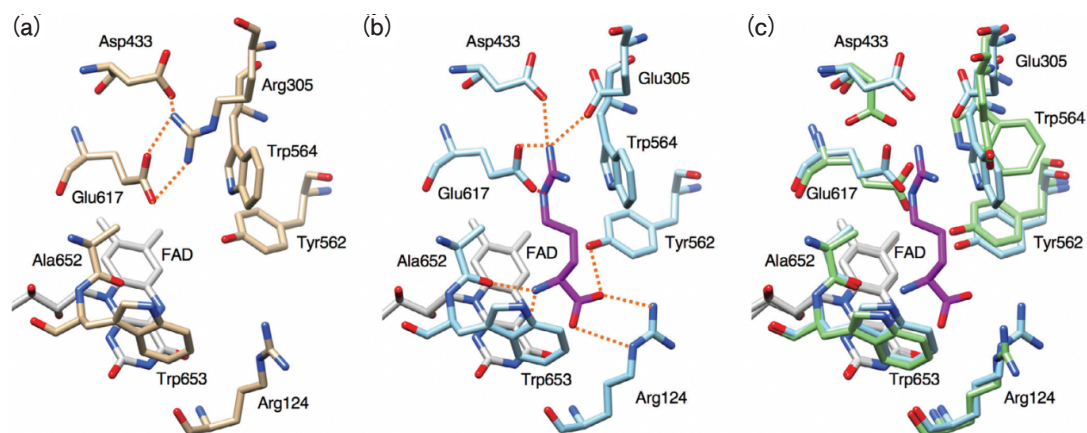


Fig. 7 Comparison of the active site structure of the L-arginine complex of R305E-LGOX with the ligand-free active site structure of LGOX.<sup>17)</sup>

- (a) Ligand-free structure of LGOX  
 (b) Active site structure of R305E-LGOX with L-arginine  
 (c) Superposition of the active site of R305E-LGOX (green) and the complex of L-arginine and R305E-LGOX (light blue)  
 Nitrogen and oxygen atoms are color-coded in blue and red. Possible hydrogen bonds are indicated by red broken lines.

Table 1 Kinetic parameters of LGOX, R305 variants and AROD<sup>17)</sup>

Enzyme	Substrate	Specific activity ( $\text{Umg}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
R305E-LGOX	L-Arg	7.5	$0.223 \pm 0.071$	$3.42 \pm 0.61$	$1.53 \times 10^4$
R305D-LGOX	L-Arg	1.5	7.20	1.65	$2.29 \times 10^2$
LGOX	L-Glu	57	0.173	53.2	$3.08 \times 10^5$
AROD	L-Arg	0.19	0.149	-	-

チピリン-TOOS法によって測定することで、L-Argの濃度測定が可能であることを実証した。また、L-Arg濃度が0~10 $\mu$ Mの間でも同様に直線を示しており、LGOX R305EのL-Argの定量への有効性を示している。これらの結果より、LGOX R305EはL-Arg定量用酵素センサーとしての利用に適していることが明らかとなった<sup>17)</sup>。

### おわりに

以上のように、我々はLGOXの持つ多面的で有用な性質とその基盤となっている特徴的な立体構造を明らかにし、本酵素の活用方法を開発してきた。今後は、遺伝子工学的手法を用いて更なる基質特異性改変酵素の創製に挑戦するとともに、残された最後の課題であるLGOXの成熟化機構の解明に向けて取り組みたい。

### 参考文献

- Izidoro LFM, Sobrinho JC, Mendes MM, Costa TR, Grabner AN, Rodrigues VM, Saulo L da Silva, Zanchi FB, Zuliani JP, Fernandes CFC, Calderon LA, Stábili RG and Soares AM : Snake venom L-amino acid oxidases : trends in pharmacology and biochemistry. *BioMed. Res. Int.*, **2014**, Article ID 196754 (2014)
- Pollegioni L, Motta P and Molla G : L-Amino acid oxidase as biocatalyst : a dream too far. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 9323-9341 (2013)
- Kusakabe H, Kodama K, Kuninaka A, Yoshino H, Misono H and Soda K : A new antitumor enzyme, L-lysine  $\alpha$ -oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties. *J. Biol. Chem.*, **255**, 976-981 (1980)
- Amano M, Mizuguchi H, Sano T, Kondo H, Shinyashiki K, Inagaki J, Tamura T, Kawaguchi T, Kusakabe H, Imada K., and Inagaki K. : Recombinant expression, molecular characterization and crystal structure of anti-tumor enzyme, L-lysine  $\alpha$ -oxidase from *Trichoderma viride*. *J. Biochem.*, **157**, 549-559 (2015)
- Arima J, Tamura T, Kusakabe H, Ashiuchi M, Yagi T, Tanaka H and Inagaki K : Recombinant expression, biochemical characterization and stabilization through proteolysis of an L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. *J. Biochem.*, **134**, 805-812 (2003)
- Upadhyay S, Ohgami N, Kusakabe H, and Suzuki H : Electrochemical determination of gamma-glutamyl transpeptidase activity and its application to a miniaturized analysis system. *Biosens Bioelectron.*, **21**, 1230-1236 (2006)
- Upadhyay S, Ohgami N, Kusakabe H, Mizuno H, Arima J, Tamura T, Inagaki K, and Suzuki H : Performance characterization of recombinant L-glutamate oxidase in a micro GOT/GPT sensing system. *Sens. Actuators B Chem.* **119**, 570-576 (2006)
- 稲垣賢二 : アミノ酸代謝に関連する FAD, PLP および NAD 依存性酵素の特性, 構造解析と臨床診断への応用 ビタミン, **91**, 403-418 (2017)
- Kusakabe H, Midorikawa Y, Fujishima T, Kuninaka A, and Yoshino H : Purification and properties of a new enzyme, L-glutamate oxidase, from *Streptomyces* sp. X-119-6 grown on wheat bran. *Agr. Biol. Chem.*, **47**, 1323-1328 (1983)
- Koyama H : Purification and characterization of a novel L-phenylalanine oxidase (deaminating and decarb-oxylating) from *Pseudomonas* sp. P-501. *J Biochem.*, **92**, 1235-1240 (1982)
- Ullah A : Structure-function studies and mechanism of action of snake venom L-amino acid oxidases. *Front. Pharmacol.*, **11**, 110 (2020)
- Takatsuka H, Sakurai Y, Yoshioka A, Kokubo T, Usami Y, Suzuki M, Matsui T, Titani K, Yagi H, Matsumoto M, and Fujimura Y : Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Aghkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1544**, 267-277 (2001)
- Geueke B and Hummel W : A new bacterial L-amino acid oxidase with a broad substrate specificity : purification and characterization. *Enzyme. Microb. Technol.*, **31**, 77-87 (2002)
- Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, and Seeff LB : Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin. Chem.*, **46**, 2027-2049 (2000)
- Arima J, Sasaki C, Sakaguchi C, Mizuno H, Tamura T, Kashima A, Kusakabe H, Sugio S and Inagaki K : Structural characterization of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. *FEBS. J.*, **276**, 3894-3903 (2009)
- Utsumi T, Arima J, Sakaguchi C, Tamura T, Sasaki C, Kusakabe H, Sugio S, and Inagaki K : Arg305 of *Streptomyces* L-glutamate oxidase plays a crucial role for substrate recognition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 951-955 (2012)
- Yano Y, Matsuo S, Kusakabe H, Inagaki K, Ito N, Tamura T, and Imada K : A new L-arginine oxidase engineered from L-glutamate oxidase. *Protein Sci.*, **30**, 1044-1055 (2021)
- Vissers YL, Dejong CH, Luiking YC, Fearon KC, von Meyenfeldt MF, and Deutz NE : Plasma arginine concentrations are reduced in cancer patients : Evidence for arginine deficiency? *Am. J. Clin. Nutr.*, **81**, 1142-1146 (2005)
- Marescau B, De Deyn PP, Lowenthal A, Qureshi IA, Antonozzi I, Bachmann C, Cederbaum SD, Cerone R, Chamoles N, Colombo JP, Hyland K, Gatti R, Kang SS, Letarte J, Lambert M, Mizutani N, Possemiers I, Rezvani I, Snyderman SE, Terheggen HG, and Yoshino M : Guanidino compound analysis as a complementary diagnostic parameter for hyperargininemia : Follow-up of guanidino compound levels during therapy. *Pediatric Res.*, **27**, 297-303 (1990)
- Matsui D, Terai A, and Asano Y : L-arginine oxidase from *Pseudomonas* sp. TPU 7192 : Characterization, gene cloning, heterologous expression, and application to L-arginine determination. *Enzyme Microb. Technol.*, **82**, 151-157 (2016)
- Tamaoku K, Ueno K, Akiura K, Ohkura Y : New water-soluble hydrogen donors for the enzymatic photometric determination of hydrogen peroxide. II. N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfo-propyl) aniline derivatives. *Chem Pharm Bull.*, **30**, 2492-2497 (1982)