

S-アルキルシステイン α, β -リアーゼによる含セレンアミノ酸の分解

紙谷 寛¹⁾・江崎 信芳¹⁾・田中英彦²⁾・左右田 健次¹⁾

(¹⁾京都大学化学研究所*, (²⁾岡山大学農学部**)

Decomposition of Selenium-Containing Amino Acids by S-Alkylcysteine α, β -Lyase

Hiroshi KAMITANI¹⁾, Nobuyoshi ESAKI¹⁾, Hidehiko TANAKA²⁾ and Kenji SODA¹⁾

¹⁾Institute for Chemical Research, Kyoto University and ²⁾Faculty of Agriculture, Okayama University

The Decomposition of various selenium-containing amino acids by S-alkylcysteine α, β -lyases, which were purified from *Pseudomonas putida* and *Bacillus* sp., was examined. The enzymes catalyzed the α, β -elimination of Se-methyl-L-selenocysteine and L-selenodjenkolate. The enzymes catalyzed also the β -replacement reaction of the selenomethyl group of Se-methyl-L-selenocysteine with various thiols to yield the corresponding S-substituted cysteines. When selenodjenkolate was decomposed by the *Ps. putida* enzyme an insoluble precipitate was formed in the reaction mixture. The formation of insoluble precipitate was not observed when monoiodoacetic acid was added to the reaction mixture.

S-アルキルシステイン α, β -リアーゼ (ACLase) は, S-アルキルシステイン類ならびにそれらのスルホキシド誘導体に作用し, α, β -脱離反応ならびに β -置換反応を触媒するピリドキサル-5'-リン酸 (PLP) 酵素である¹⁾。我々は, 最近 *Pseudomonas putida* (ICR 3640) ならびに中等度好熱性細菌 *Bacillus* sp. から ACLase をそれぞれ精製し, それらの物理化学的ならびに酵素化学的性質を明らかにした^{2,3)}。本研究では, 両酵素の含セレンアミノ酸に対する反応性について検討を行なうとともに, *Ps. putida* 由来の ACLase による L-セレノジェンコール酸の分解機構について検討した。

*所在地: 京都府宇治市五ヶ庄 (〒611)

**所在地: 岡山市津島中1丁目1-1 (〒700)

実験方法

1) 試薬

S-アルキルシステイン α, β -リアーゼは, *Ps. putida* ならびに *Bacillus* sp. より既報の方法に従って精製した^{2,3)}。Se-メチル-L-セレンシステイン (SeMC) は, du Vigneaud らの方法を改良して調製した⁴⁾。L-セレンジェンコール酸 (SeDA) は, Chocat らの方法に従って調製した⁵⁾。その他の試薬は, 市販の特級あるいは生化学用試薬を使用した。

2) 酵素活性測定法

ACLase の脱離反応における酵素活性は, Tricine-KOH 緩衝液 (pH 9.5) 100 μ mol, S-メチル-L-システイン (SMC) またはその他のアミノ酸 20 μ mol, PLP 10nmol および酵素を含む反応液 1.0ml を用いた。反応は *Ps. putida* 酵素の場合 30°C で, *Bacillus* 酵素の場合 50°C で各々 10 分間行ない, 50% 三塩化酢酸 0.1ml を加えて反応を停止し, 遠心分離により除蛋白後, 上清液について生成したピルビン酸を Soda の方法に従って 3-メチル-2-ベンゾチアゾロンヒドラゾン (MBTH) を用いて定量した⁶⁾。酵素の単位は, 上記脱離反応の条件下で, SMC から 1 分間に 1 μ mol のピルビン酸を生成する酵素量を 1 unit と定義した。

置換反応における酵素活性は, 上記脱離反応条件下での反応液組成に各種チオール 200 μ mol を含む反応液 1.0ml を用いた。反応は, 30 または 50°C にて 20 分間行ない, 三塩化酢酸添加後, 遠心分離して上清液中の置換反応により生成したアミノ酸をアミノ酸自動分析計により定量した。

3) その他の分析方法

本酵素反応液中に生成するアンモニアは, グルタミン酸脱水素酵素法⁷⁾で, ホルムアルデヒドは, アルデヒド脱水素酵素法⁸⁾により定量した。アミノ酸の減少量はアミノ酸自動分析計により定量した。

結果と考察

Table 1 に両 ACLase の脱離反応における各種アミノ酸に対する基質特異性を示す。SMC のほかに, そのアナログである SeMC や O-メチル-L-セリン (OMS) も良好な基質となり, 両酵素はエーテル, チオエーテル, セレンエーテル結合の開裂反応を触媒することが判明した。それらの反応性の高さは各元素の電子受容能力と正の相関性をもち, セレン > 硫黄 > 酸素の順であった。また, 各基質に対する両酵素の K_m を測定したところ, SeMC < SMC < OMS の順番に増大する傾向にあり, したがってセレンアナログの酵素に対する親和性が最も高いと考えられる。酵素の基質のアルキル鎖の反応性に及ぼす影響について検討したところ *Pseudomonas* 酵素の場合, メチル, エチル, ベンジルのようにアルキル鎖長が増大するにつれて反応性が低下するのに対して, *Bacillus* 酵素は逆に反応性が増大する傾向を示した。

Table 1. Substrate specificity of ACLase

Substrate	<i>Ps putida</i>		<i>Bacillus</i> sp.	
	Rel. act. (%)	K _m (mK)	Rel. act.	K _m (mK)
S-Methyl-L-cysteine	100	4.8	100	5.1
S-Methyl-D-cysteine	0	n.d.	0	n.d.
Se-Methyl-L-selenocysteine	153	3.5	273	4.6
O-Methyl-L-serine	92	6.5	38	19.3
L-Djenkolate *	96	4.5	270	3.6
L-Selenodjenkolate **	167	4.7	246	2.0
S-Ethyl-L-cysteine	88	n.d.	141	4.3
S-Benzyl-L-cysteine	75	n.d.	149	0.73
L-Cysteine	0	n.d.	1	n.d.

Substrate concentration; 20 mM, * 10 mM, ** 7.5 mM. n.d.; not determined.

両酵素の置換反応における反応性について検討したところ Table 2 に示すように、両酵素はともに β -置換反応も触媒することが判明した。特に SeMC は、SMC に比べて優れた置換基受容体であることがわかった。

Table 2. Replacement reactivity of ACLase

Enzyme	RSH (R -)	SeMC ^a	SMC ^b	OMS ^c
ACLase from	Ethyl	0.16	0.19	0.14
<i>Ps putida</i>	<i>n</i> -Propyl	0.05	0.02	0.06
	Phenyl	0.01	0	0
	Benzyl	0.03	0.01	0.01
ACLase from	Ethyl	n.d.	0.28	0.26
<i>Bacillus</i> sp.	<i>n</i> -Propyl	1.04	0.40	0.20

^aSeMC ; Se-methyl-L-selenocysteine.

^bSMC ; S-methyl-L-cysteine.

^cOMS ; O-methyl-L-serine.

The S-substituted amino acids formed by the replacement reaction were measured with an amino acid analyzer and expressed by μ mol/ml/min. n.d. ; not determined.

次に *Ps. putida* 由来の ACLase を用いてジェンコール酸のセレンアナログである SeDA の分解について検討した。SeDA に作用して分解する酵素としては、ACLase のほかにメチオニン γ -リアーゼが知られている。メチオニン γ -リアーゼの場合とは異なり、ACLase の場合には水不溶性沈殿の生成が認められた。そこで、ACLase による SeDA の分解機構を推定するために分解生成物について検討した (Table 3)。その結果 ACLase の場合 SeDA の分解により生成するホルムアルデヒドならびに H₂Se 量がメチオ

ニンγ-リアーゼの場合にくらべるとかなり低かった。ピルビン酸とアンモニアの生成量は、メチオニンγ-リアーゼの場合と同様セレンコル酸 1mol の分解に対して約 2mol であった。また、モノヨード酢酸存在下で酵素反応を行った場合、水不溶性沈殿は生成しなかった。

Table 3. Reaction of selenodjenkolate with ACLase from *Ps. putida*

Enzyme	Substrate disappeared (μ mol)	Pyruvate formed (μ mol)	Ammonia formed (μ mol)	Formaldehyde formed (μ mol)	H ₂ Se formed (μ mol)
ACLase ^a	2.3	4.2	4.2	0.6	n.d.
	8.0	13.0	14.2	n.d.	1.7
+IAA ^b	8.0	16.3	16.3	n.d.	n.d.

^aSubstrate concentration ; 8.0 mM.

^bIAA ; monoiodoacetic acid, IAA concentration ; 20 mM.

n.d. ; not determined.

以上の結果から ACLase の SeDA に対する分解機構は, Chocat ら⁵⁾の推定した分解機構とほぼ同様であると考えられる (Fig. 1)。反応系中に生成する水不溶性沈殿は, SeDA の分解過程にて生成するメタンジセレンールの重合によるものと考えられる。しかし, 同様の反応を触媒する酵素が水不溶性沈殿の生成を生成する場合やしない場合があることについては, 不明な点が多く今後検討していく予定である。

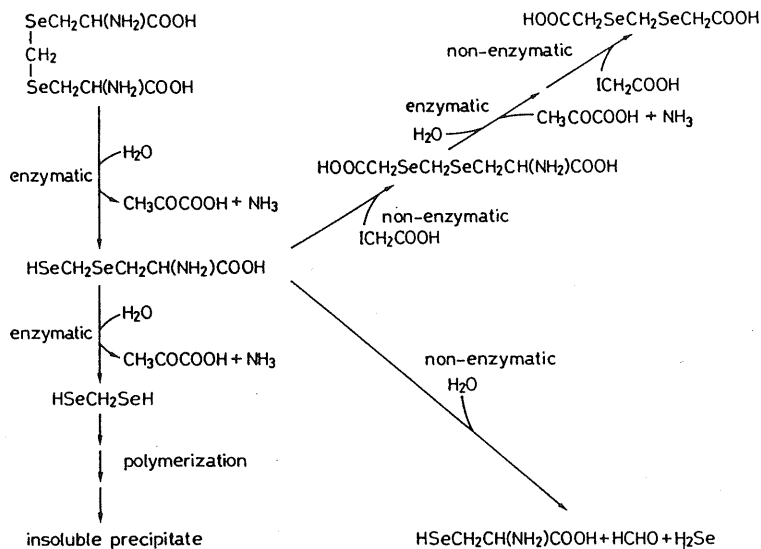


Fig. 1. Proposed decomposition mechanism of selenodjenkolate with ACLase from *Ps. putida*.

文 献

1. FOWDEN, L., P. J. LEA and E. A. BELL (1979) *Adv. Enzymol.* 50 : 117
2. KAMITANI, H., N. ESAKI, H. TANAKA and K. SODA (1990) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 36 :
3. KAMITANI, H., N. ESAKI, H. TANAKA and K. SODA (1990) *Agric. Biol. Chem.* 54 : 2069
4. DU VIGNEAUD, V., L. F. ANDRIETH and H. S. LORING (1956) *J. Am. Chem. Soc.* 78 : 1367
5. CHOCAT, P., N. ESAKI, H. TANAKA and K. SODA (1985) *Anal. Biochem.* 148 : 485
6. SODA, K. (1968) *Anal. Biochem.* 25 : 228
7. KUN, E. and F. B. KEARNEY (1974) in *Methods in Enzymatic Analysis*, ed. by Bergmeyer, U.H., Academic Press, New York : pp. 1802-1806
8. BERGMAYER, H. V., N. GRASSI and H. E. WALTER (1983) in *Methods in Enzymatic Analysis*, ed. by Bergmeyer, H. U., J. Bergmeyer and M. Grassl, Academic Press, New York : pp. 144-145
9. ESAKI, N., T. NAKAMURA, H. TANAKA and K. SODA (1982) *J. Biol. Chem.* 257 : 4386