

含セレンペプチドの酵素的合成

田村 隆・下豊留 玲・江崎 信芳・左右田 健次
(京都大学化学研究所*)

Enzymatic Synthesis of Glutaselenone and its derivatives with γ -Glutamyltranspeptidase

Takashi TAMURA, Akira SHIMOTOYODOME, Nobuyoshi ESAKI and Kenji SODA
Institute for Chemical Research, Kyoto University

Abstract

We investigated catalytic activity of γ -glutamyltranspeptidase on selenocysteine-containing peptides, and compared with that on their cysteine analogues. Activity of the two types of the enzyme, one was from bovine kidney and the other was from *E. coli*, were assayed with γ -glutamyl-*p*-nitroanilide or L- and D-glutamine as γ -glutamyl donors and L-Se-benzyl-selenocysteinyl-glycine methylester or L-S-benzyl-cysteinyl-glycine methylester as γ -glutamyl accepters. The results obtained from the investigation of γ -glutamyltransferase activity was applied to the synthesis of glutaselenone derivatives.

セレンは周期律表 VI b 族に属し、金属、非金属両方の性質を合わせ持つユニークな元素である。近年、セレンの特性を利用して、様々な有機セレン化合物^{1,2)}が抗酸化剤として開発され注目を集めているが、われわれの研究室においてグルタチオンのセレノシステインアナログ、グルタセレンを合成し、これがグルタチオンペルオキシダーゼ活性をもつことを見いだした³⁾。

我々は従来のグルタセレンの化学合成法に γ -グルタミル基転移酵素⁴⁾（以下 γ -GTPと略す。）を用いて、簡便かつ効率のよいグルタセレン合成法を確立した。

実験方法

γ -GTP

γ -GTPは大腸菌由来⁵⁾及びウシ腎臓由来の二種類を検討した。大腸菌由来の酵素は京大農学部食品工学科教授、熊谷英彦博士より頂いた。ウシ腎臓由来酵素は和研薬より購入した。

*所在地：宇治市五ヶ庄（〒611）

γ-グルタミル基受容体の化学合成

GTP のγ-グルタミル受容体となる Secys-Gly は Fig. 1に示すルートによって化学合成した。

GTP の活性測定法

γ-GTP の活性測定はγ-グルタミル-p-ニトロアニリドを用いて分光学的に定量した。

γ-グルタミル基転移反応にはγ-グルタミルアミドの加水分解を伴うので、γ-グルタミル基受容体を加えない対照実験を同時に行い、410nm の吸光度変化における差をγ-グルタミル基転移活性とした。

反応生成物の HPLC 分析

反応生成物は HPLC で分析し、分取した。Waters 600E ポンプ, U6K インジェクタ, 484 uv デイテクタと Cosmosil 5C₁₈ カラム (4.6×150mm) を用いた。移動層は11%アセトニトリル, 1.1%酢酸を含む水を流速1.5ml/min で流した。

GTP によるグルタセレンメチルエステルの合成

大腸菌酵素を用いて Se-ベンジルグルタセレンモノメチルエステルを合成した。L-Gln 200mM, Se-ベンジル-Secys-Gly-OMe 100mM, 大腸菌酵素を含む pH 6.2の反応液を37℃でインキュベートし, 12時間後の反応液より HPLC によって生成物を分取した。

結果と考察

Se 型受容体と S 型受容体の活性

Se-Benzyl-L-Secys-GlyOMe (Se 型受容体) と S-Benzyl-L-Cys-GlyOMe (S 型受容体) をγ-グルタミル基受容体としての活性を比較した。(Fig. 2)

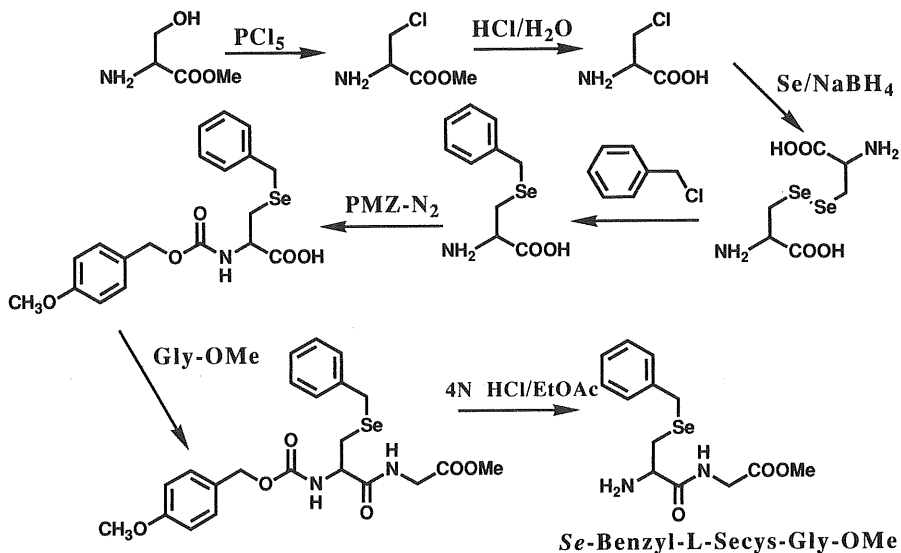


Fig. 1. Synthesis of γ-glutamyl acceptor. Se-Benzyl-L-Secys-Gly-OMe, was synthesized from L-serine methyl ester.

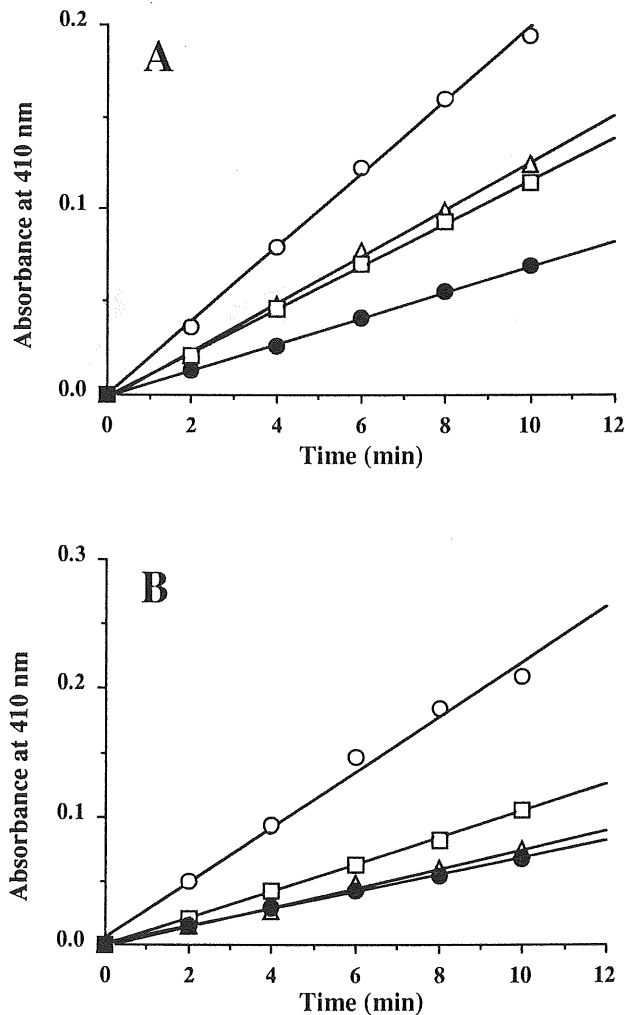


Fig. 2. Activity of γ -GTP on Se-Benzyl-Secys-Gly-OMe and S-Benzyl-Cys-Gly-OMe. γ -GTP of *E. coli*(A) and bovine kidney(B) was assayed with Gly-Gly (○), Se-Benzyl-Secys-Gly-OMe (□) and S-Benzyl-Cys-Gly-OMe (△). γ -Glutamyl acceptor was omitted for hydrolysis rate (●).

大腸菌酵素は硫黄型受容体及びセレン型受容体に対してそれぞれグリシルグリシンの42及び39%の相対速度で転移反応を触媒し、セレンと硫黄を識別できなかった。一方、ウシ腎臓酵素を用いた場合には、それぞれグリシルグリシンの3.2及び21%であり、硫黄型よりセレン型のジペプチドに対して高い活性を示した。

Se型受容体とS型受容体の最適 pH

γ -グルタミル-*p*-ニトロアニリドを γ -グルタミル基供与体として、グリシルグリシン、S型受容体、Se型受容体を受容体として加水分解活性、転移活性に対するpHの影響を調べた。(Fig. 3)

大腸菌酵素はpH 5.5で加水分解活性が最も高かった。 γ -グルタミル基転移活性はpH 6から10までの

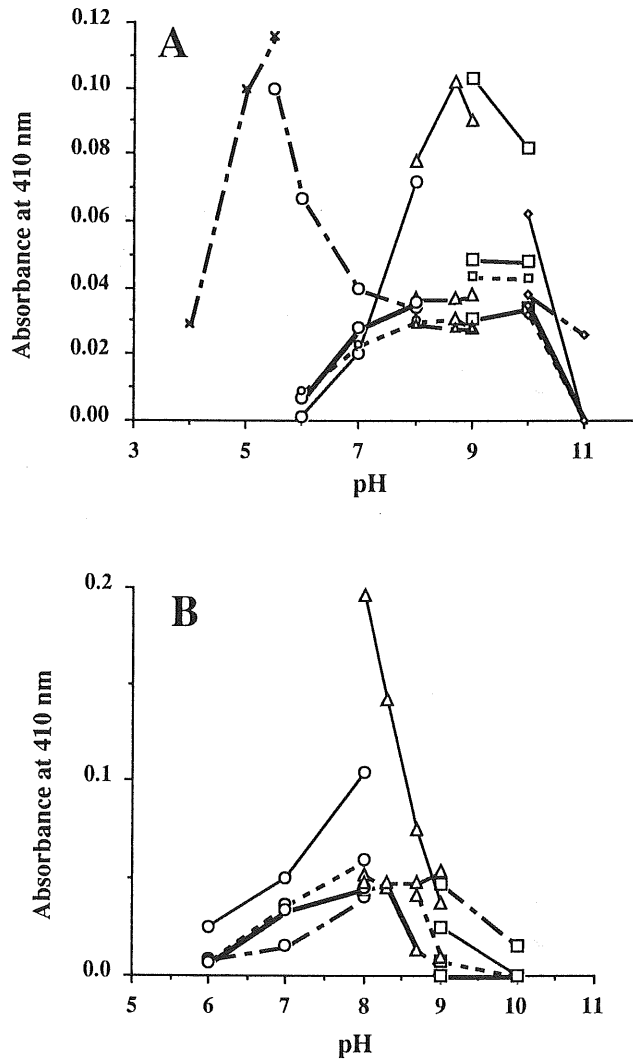


Fig. 3. Effect of pH on γ -GTP of *E. coli*(A) and bovine kidney(B).

Activity of γ -GTP was assayed with Gly-Gly (—), Se-Benzyl-Secys-Gly-OMe (·····) and S-Benzyl-Cys-Gly-OMe (—). γ -glutamyl acceptor was omitted for hydrolysis rate (---).

広範囲で活性を示したが、最適 pH は 9 であった。

一方、ウシ腎臓酵素では pH 9 において加水分解活性が最も高かった。転移活性では、グリシルグリシン、S 型受容体に対する転移活性の最適 pH は 8 であったが Se 型受容体に対する転移活性のピークはそれらよりやや塩基性側にシフトし、最適 pH は 8.3 であった。

γ -グルタミル基供与体の検討

γ -グルタミル基供与体として、L-または D-グルタミンを検討した。受容体としてグリシルグリシン、Se 型受容体を用いた。大腸菌酵素は L-または D-グルタミンから Se 型受容体に γ -グルタミル基転移を

行った (Table 1a)。牛腎臓酵素を用いた場合、L-またはD-グルタミンは γ -グルタミル基供与体とはならなかった。(Table 1b)

酵素法によるグルタセレン合成で安価なL-グルタミンを用いるためには、大腸菌由来の酵素を用いることにした。

γ -GTPによるグルタセレンモノメチルエステルの合成

酵素を加えずに反応を行った場合には見られない未知のピークがHPLCで認められた。このピークの保持時間は合成標品Se-ベンジルグルタセレンモノメチルエステルのものと完全に一致した。このピークを分取し $^1\text{H-NMR}$ によってSe-ベンジルグルタセレンモノメチルエステルであることを確認した。

$^1\text{H-nmr}$ (D_2O)

δ 2.1, m, 2H Glu- β CH_2

δ 2.4, m, 2H Glu- γ CH_2

δ 3.7, s, 3H メチルエステル CH_3

δ 3.8, s, 2H ベンジル- CH_2

δ 3.9, m, 3H Glu- α CH, Gly- CH_2

δ 4.4, m, 1H Secys- α CH

δ 7.3, s, 5H ベンジル- C_6H_5

Table 1a. Donor Specificity of *E. coli* γ -GTP

Donor	Acceptor			
	Gly-Gly		Se-Bz-Secys-Gly-OMe	
	Hydrolyase	Transferase	Hydrolyase	Transferase
	Relative rate		Relative rate	
γ -GpNA	100	100	100	100
L-Gln	107	131	109	91.4
D-Gln	198	127	133	409
L-Asn	0	0	0	0

Table 1b. Donor Specificity of Bovine Kidney γ -GTP

Donor	Acceptor			
	Gly-Gly		Se-Bz-Secys-Gly-OMe	
	Hydrolyase	Transferase	Hydrolyase	Transferase
	Relative rate		Relative rate	
γ -GpNA	100	100	100	100
L-Gln	297	0	215	0
D-Gln	319	0	252	0
L-Asn	0	0	0	0

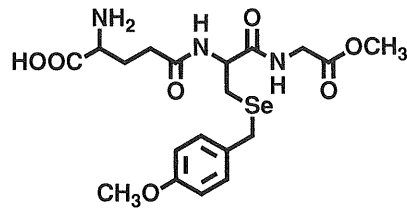
The assay mixture was analyzed on amino acid analyzer.

Activity on γ -GpNA was taken for 100.

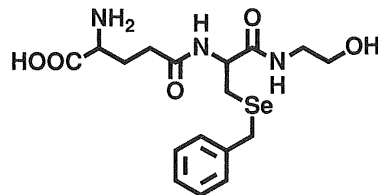
なお、ウシ腎臓酵素を用いた場合は、L-Glnが γ -グルタミル基供与体とならず、生成物は認められなかった。

この方法により、種々のグルタセレンン類縁化合物の合成を行った。セレンオール基をp-メトキシベンジル基で保護したもの、グルタセレンンのC末端カルボキシル基を水酸基にしたもの、グリシンがL-セリンメチルエステルに置換されたものを合成した。(Fig. 4)

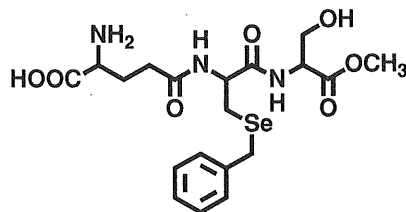
本研究で確立したグルタセレンンの合成法では、安価なL-Glnと化学合成したSe-保護セレンシステイニルグリシンメチルエステルを基質とし、 γ -GTP反応によってSe-保護グルタセレンンモノメチルエステルが合成される。これはTFA-チオアニソール処理などによって容易に脱保護され、還元型グルタセレンンに転換される。この方法はL-Glnのアミノ基及び α -カルボキシル基の保護、 γ -カルボキシル基の活性エステル化を必要とせず、また副生成物を生じないことなど、従来の化学合成法に比べて非常に優れた方法である。



Se-p-Methoxybenzyl-Glutaseleonone Monomethyl Ester



γ -L-Glutamyl-*Se*-Benzyl-L-Selenocysteinylglycinol



γ -L-Glutamyl-*Se*-Benzyl-L-Selenocysteinyl-L-Serine Methyl Ester

Fig. 4. Glutaseleonone derivatives produced with γ -GTP.
Chemically synthesized dipeptides were derivatized by γ -GTP to form glutaseleonone derivatives.

文 献

1. MULLER, A., E. CADENAS, P. GRAF and H. SIES (1984) *Bioch. Pharm.* 33 : 20, 3235-3239
2. MULLER, A., E. CADENAS, P. GRAF and H. SIES (1985) *ibid*, 34 : 8, 1185-1189
3. 老川典夫, 江崎信芳, 芦田裕之, 左右田健次 (1991) 微量元素研究 第8集75-79
4. TATE, S.S. and A. MEISTER (1974) *J. Biol. Chem.* 249 : 7593-7602
5. SUZUKI, H., H. KUMAGAI and T. TOCHIKURA (1986) *J. Bacteriol.* : 1325-1331