

総合論文

抗ガン性酵素メチオニン γ -リアーゼに関する研究

田 中 英 彦

(生物資源化学講座)

Studies on Anti-cancer Enzyme, Methionine γ -lyase

Hidehiko Tanaka

(Department of Bioresources Chemistry)

Methionine γ -lyase, a pyridoxal-P dependent enzyme which was purified from *Pseudomonas putida* catalyzes α , γ -elimination and γ -replacement reactions of L-methionine and its derivatives, and also α , β -elimination and β -replacement reactions of S-substitute cysteines. The unique catalytic mechanism of methionine γ -lyase was studied using 1-vinylglycine and the mechanisms of inactivations were studied using suicide substrates, L-propargylglycine, S-(N-methylthiocarbamoyl)-L-cysteine and L-2-amino-4-chloro-4-pantanoate. The enzyme also catalyzes the rapid exchange of the α -and β -hydrogens of methionine and other amino acids with deuterium from solvents. From these studies, mechanisms for α , γ -elimination and γ -replacement reactions by this enzyme have been proposed; α -and β -hydrogens of the substrate amino acids are initially removed, and then the γ -substitute is eliminated to yield a vinylglycine-pyridoxal-P intermediate, which is a common key intermediate in α , γ -elimination and γ -replacement reactions. In addition, the gene encoding this enzyme was cloned and the primary structure of the enzyme was deduced from its nucleotide sequences. The methionine γ -lyase gene was expressed in *Escherichia coli*. We found a part of an open reading frame (termed *mdeB*) in the 3'-flanking region of the L-methionine γ -lyase gene, suggesting the presence of an operon involved in methionine catabolism. The deduced amino acid sequence of MdeB showed a high homology with the N-terminal region of the E1 component of pyruvate dehydrogenase complex from *E. coli*. We purified and characterized the novel α -ketobutyrate decarboxylase (MdeB) from *E. coli* transformant. Some of its properties were described.

Key words : methionine γ -lyase, γ -family pyridoxal-P enzyme

はじめに

私が岡山大学に赴任したのは1988年6月であった。その間気持の暖い先輩、同僚、後輩に恵まれ、15年間を楽しく過ぎようとしている。私は一貫して含硫・含セレンアミノ酸を中心に酵素化学を研究してきた。ここでは抗ガン性酵素メチオニン γ -リアーゼの発見、反応機構、クローニング、酵素の構造解析を中心に、その応用を含めて記述したい。

1. 性質

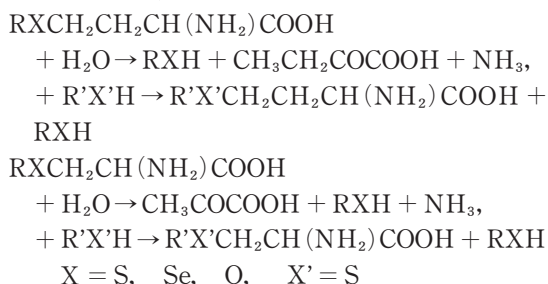
微生物のメチオニン代謝に重要な位置を占めるピリドキサルリン酸 (PLP) 酵素メチオニン γ -リアーゼを *Pseudomonas putida* から2段階のカラムクロマトグラフィーにより均一に精製した^{1,2)}。本酵素の分子量は174,000,

SDS での電気泳動では単一バンドを与え、その分子量は43,000であった。そのことから、本酵素は同一のサブユニット4個から構成されていることが示唆された。本酵素は、280 ($\epsilon = 134,000$) と420 nm ($\epsilon = 38,900$) に吸収極大を示した。本酵素に結合する PLP 量をフェニルヒドラゾン法と3-メチル-2-ベンゾチアゾロンヒドラジン法によって測定し、4.06 mol/174,000 g の値を得た。L-メチオニンは化学量論的に本酵素によって α -ケト酪酸、メタンチオール、アンモニアに分解した。L-メチオニンの他にL-メチオニンやL-システインの各種誘導体、L-エチオニン、L-メチオニンスルホン、L-ホモシステイン、S-メチル-L-システインやO置換-L-ホモセリン、DL-セレンメチオニン、O-アセチル-L-セリン (Table 1)

Received October 1, 2003

が良好基質として作用した。一方、D-メチオニン、L-ノルロイシン、L-シスチオニンは作用しなかった。

さらにL-メチオニンとエタンチオールを本酵素とインキュベートした時、新しい含硫アミノ酸の生成が観察された。その生成物はL-エチオニンとメタンチオールであった。L-エチオニンはまた脱離反応であるL-メチオニンの誘導体とエタンチオールの間にも生成した。置換反応に対するこれら基質の反応性は脱離反応の基質の反応性とはかならずしも一致しなかった。さらに本酵素はS-メチル-L-システインとエタンチオール間での β 置換反応を触媒した。エタンチオールの代りに各種のアルカンチオール ($C_3 \sim C_{10}$) やアリルチオール (ベンゼンチオール, β -ナフタレンチオール) を用いた時も新しいアミノ酸の生成が観察された。以上の結果から、次のように、本酵素は α 、 β -と α 、 γ -脱離反応を触媒する他、 β -と γ -置換反応を触媒することが観察された。



この事実は、本酵素は含硫・含セレン、含酸素アミノ酸のC-S、C-Se、C-O結合を切断するが、ノルロイシ

ンやノルバリンのC-C結合は切断しないことを示している。本酵素はさらに、触媒中の重水素と、各種直鎖のL-アミノ酸のプロトン交換反応を触媒する。その結果、L- $[\alpha\text{-}^2H, \beta\text{-}^2H_2]$ -メチオニン、L- $[\alpha\text{-}^2H, \beta\text{-}^2H_2]$ -ノルロイシン、L- $[\alpha\text{-}^2H, \beta\text{-}^2H_2]$ -ノルバリン、L- $[\alpha\text{-}^2H, \beta\text{-}^2H_2]$ - α -アミノ酪酸、L- $[\alpha\text{-}^2H, \beta\text{-}^2H_2]$ -アラニンが酵素的に生産することができた³⁾。

また、ガン細胞に本酵素を添加すると、ガン細胞の増殖が止まった。これは本酵素が抗ガン活性を持つことを示唆する⁴⁾。

ガン細胞の増殖はL-メチオニンを必須とするがこれを分解することにより、根元的に絶つための結果に起因することが分った。これにより本酵素の医薬品として利用する方向が決まり、本酵素の安定性（プロテアーゼによる消化防止）や PLP の脱落防止等の解決策が検討中である（後述）。

2. 反応機構

L-ビニルクリシンは通常、PLP 酵素のアミノ基転移酵素の自殺基質として作用する。しかし、L-ビニルグリシンは本酵素によって作用し、また各種アルカンチオール類との γ -付加反応の基質として作用した。その結果、本酵素の α 、 γ -脱離反応や γ -置換反応はFig. 1のように、ビニルグリシン-PLP キノイド中間体をへて進行するものと予想された⁵⁾ (Fig. 1)。

3. クローニング

Ps. putida のL-メチオニン γ -リアーゼを大腸菌にクローニングし、本酵素の一次構造を明らかにした。本酵素は398アミノ酸残基からなり、その推定アミノ酸配列は、他の知られている γ -family PLP 酵素と26~43%の相同性を示した (Fig. 2)。本酵素において以前に化学修飾剤

Table 1 Substrate Specificity.

Substrate	Relative activity % ^{a)}	
	Elimination	Replacement
L-Methionine	100	100
D-Methionine	0	0
L-Ethionine	55	57
D,L-Methionine sulfone	55	39
D,L-Methionine sulfoxide	21	43
L-Methionine sulfoximine	1	5
S-Methyl-L-methionine	4	0
L-Homocysteine	180	176
O-Acetyl-L-homoserine	140	202
O-Ethyl-L-homoserine	99	nd ^{b)}
D,L-Selenomethionine	282	114
L-Norleucine	0	0
L-Norvaline	0	0
L-Cysteine	10	59
D-Cysteine	0	0
L-Cystathionine	0	nd
S-Methyl-L-cysteine	9	125
O-Acetyl-L-serine	15	nd

^{a)}The concentrations of amino acids were 25 (elimination) and 100mM (replacement) except for L-cystathionine (5mM).

^{b)}nd: not determined.

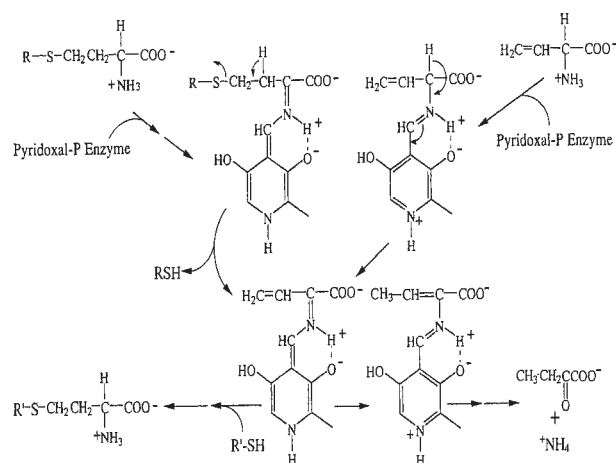


Fig. 1 Proposed mechanism for the α , γ -elimination and γ -replacement reactions of L-methionine and L-vinylglycine catalyzed by methionine γ -lyase.

の研究から同定されていたシステイン残基(Cys 116)は⁶⁾, 他の酵素では保存されていなかった. しかしながら, 本残基を含む領域(Tyr114 + Gly115-Cys116)は高度に保存されており, 特に Tyr114は, 全ての γ -family PLP 酵素において保存されていた. そこで Tyr114を Phe に変換させた Y114F, 及び Cys116を Ala, Glyにそれぞれ変異させた C116A, C116G変異酵素を作成し, これら残基の役割を検討した.

野性型酵素及び変異酵素の大量発現系を構築し, 大腸菌クローンからこれら酵素を均一に精製した. L-メチオニンに対する定常状態反応速度定数 (k_{cat} , K_m を算出した結果, C116A, C116G変異酵素は野性型酵素の18%及び11%の k_{cat} 値を示し, Cys116は反応機構に直接関与しないことを結論づけた. 一方, Y114F変異酵素は, 1/960まで k_{cat} 値が減少した. 本変異酵素の K_m 値

は, ほとんど変化しなかった. Tyr114は, 反応機構のどの段階に関与するかを明らかにするために, L-メチオニン γ -リアーゼの推定反応機構に基づき, 1) 基質アミノ酸と PLP のアルドイミン形成, 2) 基質の α -プロトンの引き抜き, 3) β -プロトンの引き抜き, 4) γ -位の脱離, 5) α -アミノ基の脱離, の5段階に大きくわけ, 各段階における Tyr114の関与を評価した. その結果, Y114F変異酵素は, γ -脱離基の脱離が著しく阻害されることを明らかにした. したがって, Tyr114は, おそらく基質の γ -脱離基の脱離を促進するための酸触媒として反応機構に関与することを提案した (Fig. 3).

L-メチオニン γ -リアーゼ遺伝子の下流域に大腸菌ピルビン酸デカルボキシラーゼ E 1 と高い相同性を示す遺伝子の5'末端部分を見だし, 両遺伝子がオペロン (mde オペロン) を形成していることを明らかにした⁷⁾. 完全な

L-methionine γ -lyase (<i>P. putida</i>)	1) MHGSNKLPGFATRAIHGGYD-PQDHGG-ALVPPVYQTATFT
cystathionine γ -lyase (rat)	2) CCGAA
cystathionine γ -lyase (<i>S. cerevisiae</i>)	3) MTLQESDKFATKAIHAGEH-VDVH-G-SVIEPISLSTTFK
cystathionine γ -synthase (<i>E. coli</i>)	4) MTRKQATIAVRSGLN-DDEQYG-CVVPPHLSSTYN
OAH-OAS sulphydrylase (<i>S. cerevisiae</i>)	5) MPSHFDTVQLHAGQENPGDNAHRSRAVPIYATTSYV
cystathionine β -lyase (<i>E. coli</i>)	6) MADKKLDTQLVNAGR-SKKYTLGAVNSVQRASSLV

50	100
1) FPTVEYGAACFAGEQAGHF-YSRISNPTLNLEARMASLEGGEGALALASGMGAITSLTWTLRPGDEVLLGNTLYGCTFA	
2) HLLATTFKQDSPGSSGFV-YSRSGNPTNRCLEKAVAAALDGAHCLTFARGLAA-TTITHLLKAGDEVICMDEVYGGTNR	
3) -----QSSPANPIGTIEYSRQNPNNENLERAVAALENAQYGLAFSSGSATTATILQSLPQGSHAVSIGD-VYGGTHR	
4) F-----TGF-NEPRAHD-YSRRGNPTROVQRLAELEGGAGAVLTNTGMSAIHLVTTVFLKPGDLLVAPHDCYGGSYR	
5) FENSKHGSQFLGLEVPGYV-YSRFQNPNTSVLEERIAALEGGAAALAVSSGQAAQTALIQGLAHTGDNIVSTSYLYGGTYN	
6) FDSVEAKKHATRNANGELFYGRRGTLTHFSLQQAMCELEGGAGCVLPFGCAAAVANSILAFIEQGDHVLMTNTAYEFSQD	

150	
1) FLHHGIGEGVGLRHVDMADLQALEAAMTPATRVIVFESSPANPNMHMADIAGVAKIARKH---GATVVVNTY-CTPYLQ	
2) YFRVASEFGLKISFVDCSKTKLLEAAITPOTKLWIEITPTNPTLKLADIKACAIQVHKH---KDIILVVNTF-MSAYFO	
3) YFTKVANAHGVETSFN-DLLNDLPOLIKENTKLWIEITPTNPTLKVITQKVADLIKHAAGQDVLVNVNTF-LSPYIS	
4) LFDLSAKRGCVRLVFDQGDQALRAALAEKPKLVLESPSNPLLRVVDIAKICHLAREV---GAVSVVNTF-LSPALQ	
5) QFKISFRFGIEARFVEGDNPEEFKVFDETRKAVYLETIGNPKYNVPDEKIVAIHAKH---GIPVVVNTFGAGGYFC	
6) FCSKILSKLGVTTISWFDPLIGADIVKHLQPNTKIVFLESPPGSIIMEVHDVPAIVAAVRSVVP--DAIIMIDNTW-AAGVLF	

200	
1) RPLELGADLVVHSATKYLSGHGDITAGIV-V-----GSQALVDRIRLQGLKDM	
2) RPLALGADICMCSATKYMNGHSDVVMGLVSV-----NSDDLNERLRF--LQNS	
3) NPLNFGADIVVHSATKYINGHSDVVLGV-LA-----TNNKPLYE-RLQFLQNA	
4) NPLALGADLVHSCATKYLNGHSDVVGIV-I-----AKDPDV-VTELAWANN	
5) QPIKYGADIVTHSATKWIGGHGTTIGTII-VDSGKFPWKDYPEKFPQFSQPAEGYHGTIYNEAYGNLAYIVHVRTELLRDL	
6) KALDFGIDVSIQAATKYLGVHSDAMIGTA-V-----CNARCWEQLRENAY--L	

250	300
1) TGAVLSPHDAALMRGIKTLNLRMDRHCANAQVLAFLARQPO-VELIHYPLASFPQY--TLARQQMSQP-GGMIAFELK	
2) LGAVSPFDFCYLCCRGKHKCRSGWRNTFQDGMAVARFLESNPR-VEKVIYPLPSHPQH--ELAKRSARAC-PGMVSFYIK	
3) IGATPSFPAWLTHRGKTLHLRVRQAALSANKIAEFLAADKENVVAVNYPLGKTHPNYDVVLKQHRDALG-GGMISFRK	
4) IGVGGAFDSYLLRLGLRTLVRMELAQRNAQAIKYLQTP-LVKLYHPSPLENQGH--ETARQQKGF-GAMLSFELD	
5) -GPLMNPFAFLLQGVETLSLRAERHGENALKLAKWLEQSPY-VSWVSYPLASHSHH--ENAKKYLNSNGFGVLSFGYK	
6) MGQVMDADTAYITSRGLRTLGVRLRQHHESSLKVAEWLAEPQ-VARVNHPLPGSKGH--EFWKRDFTGS-SGLFSFVLK	

350	
1) GGIGAGR-----RFMNALQFSAVSLGDAESLAQHPASMTSHSSYTPEERAHYGISEGLVRLSVGLEDDIDDLADV	
2) GTLQHAQ-----VFLKNIKLFALAESLGGYESLAELPAIMTHASVPEKDRATELGISDTLIRLSVGLDEKDLLEDL	
3) GGAEAS-----KFASSTRFTLAESLGGIESLLEVPVAMTHGGIPKEAREASGVFDDLVRLSVGIEDDIDDLADI	
4) GDEQTLR-----RFLGGLSLFTLAESLGGVESLISHAATMTHAGMAPEARAAAGISETLLRISTGIEDGEDIADL	
5) DLPNADKETDPFKLSGAQVVDNLKLANLANVGDAKTLVIAPYFTTHKQLNDKEKLAGSVTKDLIRVSVGLEFFIDDIADP	
6) KKLNNEELA-----NYLDNFSLFMSAYSWGGYESLILANQPEHIAAIRPQGEIDF--SGTLIRLHIGLEDVDLADI	

1) QQALKASA (398 a.a.)	
2) QQALKAAHP (364 a.a.)	
3) KQALKQATN (394 a.a.)	
4) ENGFRAANKG (386 a.a.)	
5) QQSFTVFAGQKP (444 a.a.)	
6) DAGFARIV (395 a.a.)	

Fig. 2 Comparison of the deduced sequences of methionine γ -lyase, and other α , γ -elimination and γ -replacement pyridoxal-P enzymes. The residues are numbered according to the sequences of methionine γ -lyase. Deletions introduced in the sequences are indicated by hyphens. Residues that are conserved in all the sequences compared with that of methionine γ -lyase are boxed. $\diamond$, pyridoxal-P binding lysine residue. $\blacklozenge$, proposed essential cysteine residue for methionine γ -lyase.

オペロン構造を明らかにするために、L-メチオニン γ -リアーゼ遺伝子上流域及び下流域を含む15kb DNA 断片を大腸菌にクローニングした。本オペロンの転写単位は、L-メチオニン γ -リアーゼ (MdeA) および α -ケト酪酸デカルボキラーゼ (脱炭酸酵素) E 1 (MdeB) からなり、

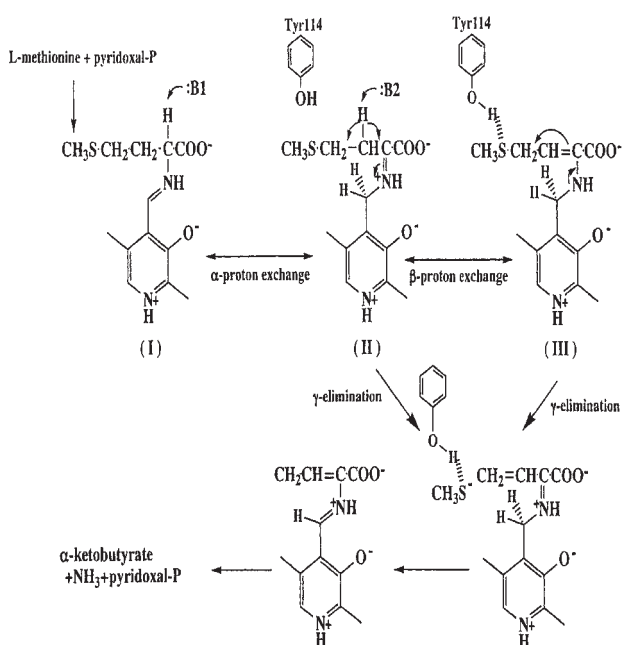


Fig. 3 Proposed role of Tyr 114, as a general acid catalyst in α, γ -elimination reaction mechanism of methionine γ -lyase.

mdeB 遺伝子下流には、D-因子依存性転写終結構造が観察された。mdeA の257bp 上流には、本オペロンとは逆方向に転写される調節タンパク質 (MdeR) がコードされていた。MdeR は159アミノ酸残基からなり、Lrp-family 調節タンパク質に属される。MdeR が mde オペロンのプロモータ活性に必須な正の調節タンパク質であることを明らかにした。しかしながら、L-メチオニンと MdeR による mde オペロンの誘導は、大腸菌では観察されなかった。

MdeB は893アミノ酸残基からなり、これまで明らかにされているグラム陰性細菌のピルビン酸脱炭酸酵素 E 1 と55~60%の相同性を示した。本酵素の大量発現系を構築し、本酵素を均一に精製し、酵素化学的諸性質を決定した。本酵素はグラム陰性細菌のピルビン酸脱炭酸酵素 E 1 とは対照的に、 α -ケト酪酸に高い基質特異性を示した (触媒効率率はピルビン酸の30倍) (Table 2)。したがって、本酵素は、基質特異性が新規の α -ケト酪酸脱炭酸酵素 E 1 である。この結果は、本酵素がL-メチオニン γ -

Table 2 Comparison of the kinetic constants for α -ketobutyrate, pyruvate and α -keto-n-valerate of α -ketobutyrate decarboxylase E 1.

Substrate	K_m (mM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m (s^{-1}/mM)
α -ketobutyrate	0.016	17.1×10^{-2}	10.69
pyruvate	0.147	5.36×10^{-2}	0.364
α -keto-n-valerate	0.149	12.8×10^{-2}	0.859

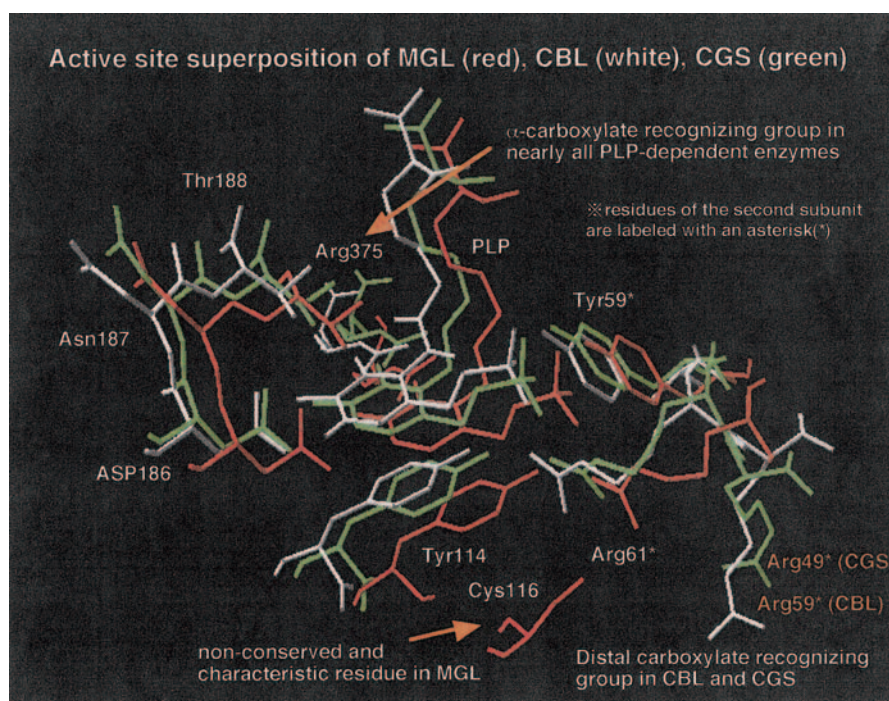


Fig. 4 MGL, CBL, CGS の活性部位の比較

リアーゼにより生じた α -ケト酪酸を特異的に代謝する役割をもつというオペロン構造上からの提案を支持した⁸⁾. *Ps. putida* の粗酵素液に対しウエスタンブロット分析を行い、培地中のL-メチオニンによって本酵素が誘導されることを確認した. また本酵素は, *Ps. putida* においてはL-メチオニン誘導性の α -ケト酪酸脱炭酸酵素複合体として存在したし, ピルビン酪酸脱炭酸酵素にかわって, α -ケト酪酸からプロピオニル-CoA へのスムーズな代謝に関与することが示唆された.

4. 今後の研究方針

L-メチオニン γ -リアーゼ(MGL)と同パターンの反応する酵素シスタチオニン γ -シンターゼ(CGS)やシスタチオニン β -リアーゼ(CBL)の活性部位の立体構造は類似していることを実証した(Fig. 4). 又その作用に関与するアミノ酸残基を Fig. 5 のように特定した. さらに医薬品として用いる際の不利な点, 血中における酵素の不安定要因を次の4点を中心に, 1) プロテアーゼによる消化, 2) ダイマー構造の解離, 3) 活性部位の酸化, 4) PLPの脱離, その解決策として, 1) プロテアーゼ認識部位のアミノ酸の変換, 2) ダイマー中のサブユニット

間のS-S架橋, 3) 酸化されるアミノ酸の置換, 4) 酵素とPLPとの相互作用(水素結合)の増強であり, K6H, F128C, S284C, Y189E, L341H等の変異酵素を作製して, 今後検討する予定である.

本研究を遂行するにあたり終始御指導, ご鞭撻を賜まわった恩師, 京都大学名誉教授, 関西大学名誉教授, 左右田健次博士に深く感謝の意を表したいと思います. また, 岡山大学時代の稲垣賢二教授, 田村隆助教授, 木村吉伸教授, 杉本学助手には沢山の御支援をいただき心より厚く御礼を申し上げます. さらに, 京都大学時代の京都大学教授, 江崎信芳博士, 大阪大学教授, 谷沢克行博士をはじめとする共同研究者の皆様心より感謝いたします.

文 献

- 1) Tanaka, H., N. Esaki and K. Soda : FEBS Lett., **66**, 307-311 (1976)
- 2) Tanaka, H., N. Esaki and K. Soda : Biochemistry, **16**, 100-106 (1977)
- 3) Esaki, N., S. Sawada, H. Tanaka and K. Soda : Anal. Biochem., **119**, 281-286 (1982)
- 4) Esaki, N., H., Tanaka and K. Soda : FEBS Lett., **84**, 309-312 (1977)

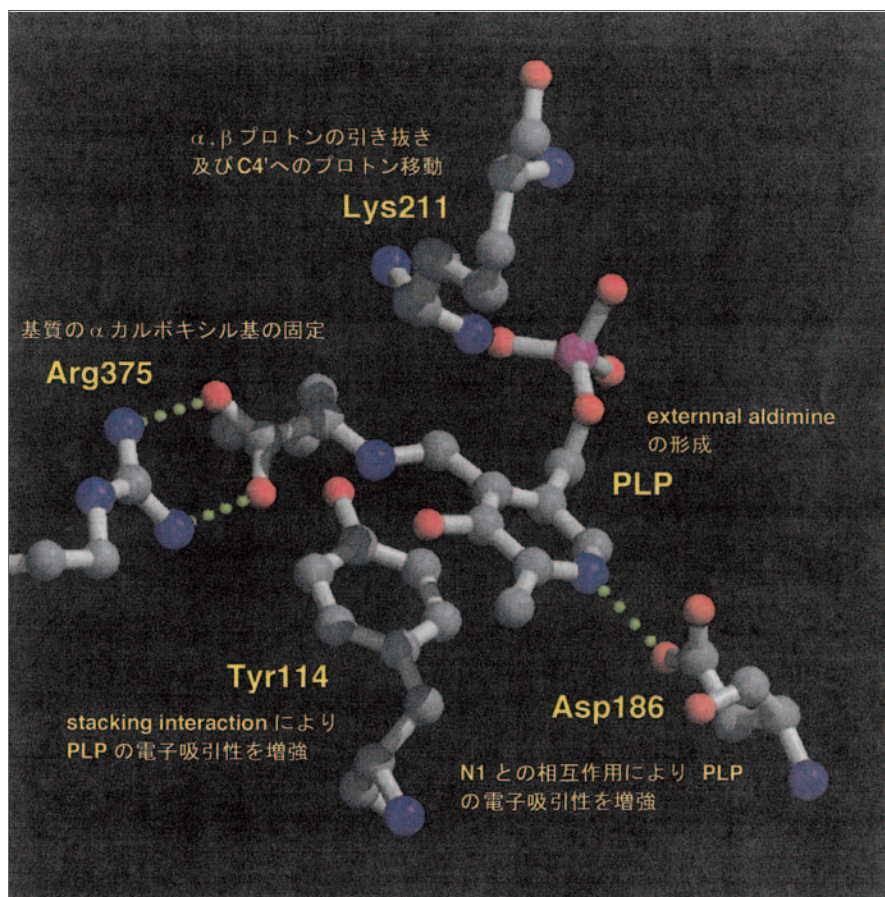


Fig. 5 α 及び γ ファミリーに属する酵素の最小触媒ユニット

- 5) Nakayama, T., N., Esaki, H, Tanaka and K, Soda, : Agric. Biol. chem., **52**, 177-183 (1988)
- 6) Inoue, H., K., Inagaki, M., Sugimoto, N., Esaki, K, Soda, and H, Tanaka, : J. Biochem., **117**, 1120-1125 (1995)
- 7) Inoue, H., K., Inagaki, S., Eriguchi, T., Tamura, N., Esaki, K., Soda, and Tanaka, H, : J. Bacteriol., **179**, 3956-3962 (1997)
- 8) Inoue, H., A., Nishito, S., Eriguchi, T., Tamura, K., Inagaki, and H, Tanaka, : J. Mol. Catalysis B : Enzymatic **23**, 265-271 (2003)