

放線菌 *Streptomyces* sp. 590 由来 L-メチオニン脱炭酸酵素の精製および性質検討

a)

b)

()

Purification and Characterization of L-Methionine Decarboxylase from *Streptomyces* sp. 590

Tomomi Maemura, Kumiko Uchitomi, Chika Kusaka, Junko Inagaki^{a)},
Takashi Tamura, Kenji Soda^{b)}, and Kenji Inagaki
(Course of Agrochemical Bioscience)

L-Methionine decarboxylase [EC 4.1.1.57] catalyzes the decarboxylation of L-methionine and is a pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme. L-Methionine decarboxylase has been purified 630-fold by DEAE-Toyopearl 650M, Phenyl-Toyopearl 650M and Sephacryl S-300 column chromatographies from *Streptomyces* sp. 590. The enzyme has a dimeric structure with identical subunits of Mr 60,000. This enzyme shows optimum activity at pH7.0 and 45°C, and is stable between pH5.7 and pH9.0. L-Methionine decarboxylase has antitumor activity against RERF-LC-AI and HeLa cells. Ten N-terminal amino acid sequence of L-methionine decarboxylase was determined, and the sequence showed no homology with other reported proteins.

Key words : L-methionine decarboxylase, pyridoxal 5'-phosphate, *Streptomyces*, decarboxylation of L-methionine

緒 言

放線菌は最も形態分化の進んだ細菌といわれている。カビに似た糸状の菌糸を形成し放射状に伸長させる原核細胞型のグラム陽性細菌である。DNAのGC含量が高く、菌糸体・菌糸分岐型・胞子などの形態的形質に加え、細胞壁の化学組成、キノン系、DNA相同性などが分類形質として広く用いられている。多数の菌株は、医薬分野に役立つ多種多様な抗生物質を二次代謝産物として生産する。そのため、組み換えDNA技術で抗生物質などの工業生産を可能とするため、放線菌の宿主ベクターの開発が進むなど、放線菌は今日の応用微生物学上きわめて重要な菌群であると言える¹⁾。

L-メチオニンの脱炭酸反応の存在が初めて報告されたのは、Mazelisによるキャベツの葉や西洋わさびの過酸化物が生成する際の酵素システムの一部としてであった^{2,3)}。

1968年になり、協和発酵工業株式会社の萩野と中山によって、L-メチオニン脱炭酸酵素の存在が放線菌 *Streptomyces* sp. で発見され、本酵素がメチオニンの脱炭酸反応を触媒することが明らかにされた。更に、この反応の産生物が3-メチルチオプロピルアミンであると同定された^{4,5)}。その後、京都大学化学研究所の味園らに

よって放線菌由来L-メチオニン脱炭酸酵素が部分精製され、本酵素がピリドキサル5'リン酸 (PLP) を補酵素とするビタミンB₆酵素であることが示された⁶⁾。これまで本酵素を有する生物として報告されているのは、この放線菌を除いては、シダ^{7,8,9)}、海産鞭毛藻¹⁰⁾の2種のみである。これらに共通した特徴として、同一サブユニットからなるダイマー構造であること、PLPを補酵素とすることがあげられる。本酵素の生理的意義は、不明な点が多い。唯一海産鞭毛藻において、海洋中の硫黄サイクルの重要な物質である硫化ジメチルの合成に本酵素が関与しているのではないかと考察がなされている¹⁰⁾。

このように、本酵素は保有する生物が極めて限られているという点から非常にユニークな酵素であるといえる。しかし、発見されてから40年近く経過したにも関わらず、未だ遺伝子レベルでの解析例は一例もなく生理的意義についても興味を持たれる。そこで、本研究は、放線菌からL-メチオニン脱炭酸酵素の精製を行い、N末お

Received October 1, 2010

- a) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
Graduate School of Medicine, Dentistry and
Pharmaceutical Sciences, Okayama University
b) 京都大学名誉教授
Kyoto University

よび内部のアミノ酸配列を明らかにすることで、酵素遺伝子のクローニング、大腸菌での大量発現系の構築、および立体構造解析を行い、他の類縁酵素との比較を行うことを最終目的とした。

材料と方法

使用菌株

l-メチオニン脱炭酸酵素を生産する放線菌 *Streptomyces* sp. 590は、協発発酵工業株式会社より分譲されたものを用いた。

使用試薬

試薬は特記したものを除き、すべてナカライテスク社の特級試薬を購入した。ペルオキシダーゼ、トリプティックソイブローズおよびN-ZアミンタイプAは和光純薬工業の特級試薬を購入した。酵素活性測定に用いるアミノキシダーゼは、大阪大学産業技術研究所の谷澤克行氏、岡島俊英氏より譲渡していただいた。

孢子懸濁液の作成

ベネット寒天培地（孢子形成用平板培地）に菌株を植菌後、2週間程度30℃で培養し、孢子が十分に形成されたコロニーを白金耳でかきとり、滅菌水に懸濁した後、脱脂綿でろ過することで菌糸を除去した。このろ過液を遠沈管に集め、軽く遠心することで上清を除去し、再度少量の滅菌水に懸濁したうえで終濃度が20%になるようグリセロールを添加し、少量ずつ分注し、保存用の孢子懸濁液とした。

Streptomyces sp. 590の培養

前培養では1 Lの坂口フラスコを用いた。115 mMグルコース、および3%トリプティックソイブローズ、1%酵母エキスを含む培地120 mLを作成し、綿栓で封をし、オートクレーブにより滅菌した。この培地に孢子懸濁液を十分量植菌し、30℃ 120 rpm, 24時間 ± 2時間培養した。本培養は、3 Lミニジャーファメンターを用い、300 mMグルコース、0.3%酵母エキス、1 mM MgSO₄ · 7H₂O, 15 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% PLP, 70 mM l-メチオニンを含む培地を2 MのNaOHにてpH7.2~7.3に調整し、滅菌後使用した。菌体は遠心によって回収し、0.85% NaCl溶液で2回洗浄し、-30℃のフリーザーで保存した。

l-メチオニン脱炭酸酵素の精製

集菌した菌体を破碎用緩衝液 [100 mMカリウムリン酸緩衝液 (KPB, pH7.0), 0.25 mM EDTA, 0.01% 2-メルカプトエタノール (2-ME), 50 μM PLP] で懸濁し、150W×20分間で超音波破碎を行った。破碎液から遠心操作により沈殿を除去し、硫酸アンモニウムを加えて、25%~50%飽和硫酸画分を回収した。得られた沈殿を緩衝液に懸濁し、さらに同じ緩衝液で一晩透析することで脱塩した。

50 mM NaClを含むリン酸カリウム緩衝液 [20 mM KPB (pH7.0), 0.25 mM EDTA, 0.01% 2-ME, 50 μM PLP]

でDEAE-トヨパールカラムの平衡化を行い、50 mM-250 mM NaClの直線濃度勾配にて目的タンパク質を溶出させた。次に20%飽和硫酸アンモニウムを含むリン酸緩衝液 [20 mM KPB (pH7.0), 0.25 mM EDTA, 0.01% 2-ME, 50 μM PLP] で平衡化したPhenyl-トヨパールカラムに活性画分を供し、20-0%飽和硫酸アンモニウムで直線濃度勾配にて目的タンパク質を溶出させた。活性画分を200 mLのセファクリルS-300樹脂を充填したカラムを用いて20 mM KPB緩衝液 (pH7.0), 200 mM KClを用い、1 mL/1分間の流速でゲルろ過クロマトグラフィーを行った。

l-メチオニン脱炭酸酵素の活性測定法

200 mM l-メチオニン, 40 μM PLPを含む100 mM KPB (pH7.0) に酵素サンプルを加え、45℃で5分間インキュベートし、l-メチオニン脱炭酸反応を行った。次に3分間煮沸することで酵素を失活させ、遠心によって沈殿を除去し、上清を回収した。上清中の3-メチルチオプロピルアミンをアミノキシダーゼで酸化させ、発生した過酸化水素をペルオキシダーゼとの共役系で赤色セミキノ色素として連続的に測定する4-アミノアンチピリンフェノール法を用いて測定した。煮沸後の上清に対し、上清:15 mM 4-アミノアンチピリン:50 mMフェノール:300 mU/mgペルオキシダーゼ (和光純薬工業株式会社) を21:1:1:1になるように加え、アミノキシダーゼを加えた後、37℃でインキュベートした。反応溶液中のアミンが完全に酸化され、赤色セミキノ色素の生成がストップした時点での吸光値505 nm (UV1200島津社) の増加量から、酵素活性を算出した。

酵素の諸性質の検討

酵素の諸性質の検討は上記の精製した酵素を用いて行った。最適反応温度は各温度で5分間メチオニンと反応させ測定した。熱安定性は、酵素を各温度で10分と30分間処理し、その後37℃にて活性測定を行い求めた。最適反応pHは37℃にて、各pHで5分間メチオニンと反応させ測定した。pH安定性の検討には、ブリトン・ロビンソン広域緩衝液 (40 mMリン酸, 40 mM酢酸, 40 mMホウ酸を混合し、2 N NaOHを用いてpHを調整) を用いた。

基質特異性の検討

通常の活性測定で用いているl-メチオニンの代わりにd-メチオニン, l-エチオニン, l-ロイシン, l-イソロイシン, l-バリン, l-アラニン, l-システイン, ホモシステイン, l-メチオニンスルホキシド, S-エチル-l-システイン, S-メチル-l-システイン基質溶液をそれぞれ70 mMとなるように作製し、適当な濃度に希釈した酵素溶液にて活性測定を行った。

抗腫瘍性の検討

96 wellプレートに1 × 10⁵ cells/mlのRERF-LC-AL (ヒト肺扁平上皮ガン細胞)あるいは1 × 10⁴ cells/mlのHeLa (ヒト子宮頸ガン細胞)を、100 μL/well播種し、24時間、37℃、5% CO₂で培養した後、各濃度のl-メチ

オニン脱炭酸酵素を添加した。その後4日間培養し MTT assay を行った。100 μ lの培地に1/10倍量(10 μ l)の0.5% MTT 試薬を添加し、1時間、37°Cでインキュベートした後、培地を捨て100 μ lの0.04N HCl(イソプロパノールで希釈)を加え溶解し、570 nmの吸光度で測定した。

二次元電気泳動での酵素の分離、分取およびN末端アミノ酸解析

酵素液に1 mlあたり10 mgのDTTを溶解したサンプル溶解液(60 mMトリス、5 M尿素、1 Mチオ尿素、1 mM PMSF、1% CHAPS、1% TritonX-100、pH8.8に調整)を加え、遠心分離した。上清に1/10量の1 Mアクリルアミドを加え、室温で10分間放置し、これを調整サンプルとした。泳動槽の下部槽に下部電極液(10 mMリン酸)を入れ、一次元目アガーゲル(アトー社製)の上部にサンプル溶液、重層液(2 M尿素)、上部電極液(0.2 M NaOH)の順でカラムの上部まで重層した後、70 V、2 mA、900分間電気泳動を行った。終了後、2.5%トリクロロ酢酸で一次元目ゲルの固定を3分間行い、蒸留水で洗浄し、SDS平衡化液(50 mM Tris-HCl、pH6.8、2% SDS、0.001% BPB)で10分間振とうした。その後、マーカーを染み込ませた3 mm四方のろ紙、一次元目ゲルをゲル接着アガロース溶液(SDS平衡化液1 mlに10 mgのアガロースを溶解)で二次元目ゲルに密着させ、SDS-PAGEを行い、染色、脱色を行った。泳動終了後、転写バッファー(25 mMトリス、192 mMグリシン、20% MeOH)にゲルを漬け、1時間平衡化した。転写バッファーで平衡化したフィルターペーパー、ファイバーペーパー、ゲル、PVDF膜をはさみ、エレクトロブロッティング装置(バイオラッド社)をセットし100 V、350 mA、1時間電気泳動後、PVDF膜を染色、脱色した。PVDF膜から目的スポットをカッターで切り取り、ペプチドシーケンサーによりアミノ酸配列解析を行った。

結果と考察

酵素の精製

硫酸分画とDEAE-トヨパール、Phenyl-トヨパール及びセファクリルS-300の各カラムクロマトグラフィーにより、比活性で630倍にまで精製することができた。また、ゲルろ過クロマトグラフィーおよびSDS-PAGEの結果から、本酵素が分子量60 kDaの同一サブユニットからなるダイマー構造を有していることが確認できた。しかし、均一と言えるまでには精製できておらず、更なる精製が必要だと考える(Fig. 1)。

l-メチオニン脱炭酸酵素の性質検討

本酵素の最適温度を明らかにするため、100 mM KPB(pH7.0)を用い、35°Cから40°Cの各反応温度で5分間、l-メチオニンと反応させることで最適反応温度を測定した。その結果、最適反応温度は45°Cであることが分かっ

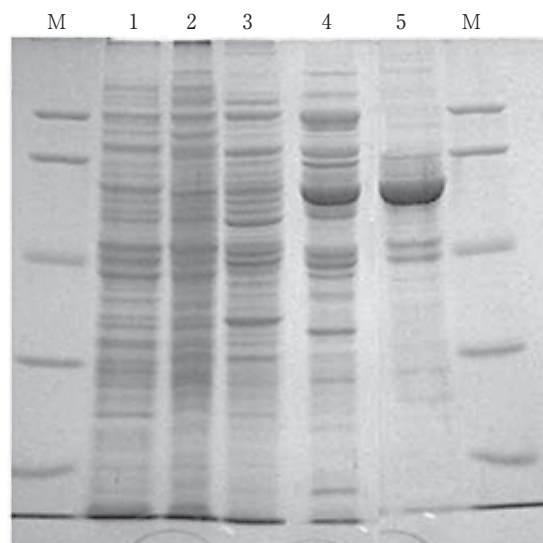


Fig. 1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of l-methionine decarboxylase from *Streptomyces* sp. 590.

Lanes M: molecular mass marker proteins, Lane 1: crude extract, Lane 2: ammonium sulfate precipitation, Lane 3: DEAE-Toyopearl column chromatography, Lane 4: Phenyl-Toyopearl column chromatography, Lane 5: Sephacryl S-300HR column chromatography. 10 μ g of protein was applied to each lane.

た(Fig. 2)。また、同様のリン酸緩衝液を用い、30°Cから60°Cの各温度で10分間、または30分間インキュベート後、氷上に5~15分静置し、37°Cでl-メチオニンと反応させることで熱安定性の検討を行った。その結果、45°Cを超えるあたりから急速に酵素の失活が起きることが分かった(Fig. 3)。また反応最適pHは、7.0であり、pH5.7~pH9.0までは残存活性が90%以上あり、pHに対して比較的安定な酵素であることが分かった(Fig. 4)。

基質特異性の検討

基質であるl-メチオニン以外では、S-エチル-l-システインとS-メチル-l-システインに対して59%、28%と比較的高い値を示し、l-ロイシンにも活性を示したが、それ以外のアミノ酸とはほとんど反応しなかった。こうした傾向は、放線菌由来の酵素で、共通しており、シダの酵素とも類似していた(Table 1)。

抗腫瘍性の検討

RERF-LC-AI、HeLa細胞ともに1 U/mlのl-メチオニンの濃度で、著しく生細胞数が減少していた(Fig. 5)。この実験により、今回初めて本酵素が抗腫瘍性をもつことが確認できたが、正常細胞に対する本酵素の細胞毒性の検討を行うことができていないため、今後この点について、検討を行う必要がある。

N末端アミノ酸配列の解析

二次元電気泳動の結果、本酵素であると考えられるスポットは2つ見られ、分子量は同じであったが等電点が異なった。それらをプロテインシーケンサーに供したと

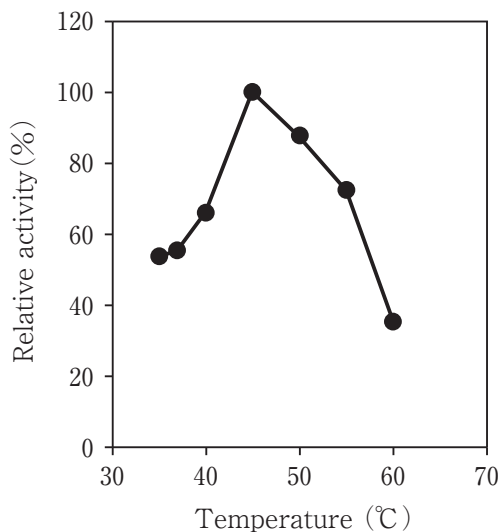


Fig. 2 Optimum temperature of l-methionine decarboxylase from *Streptomyces* sp. 590

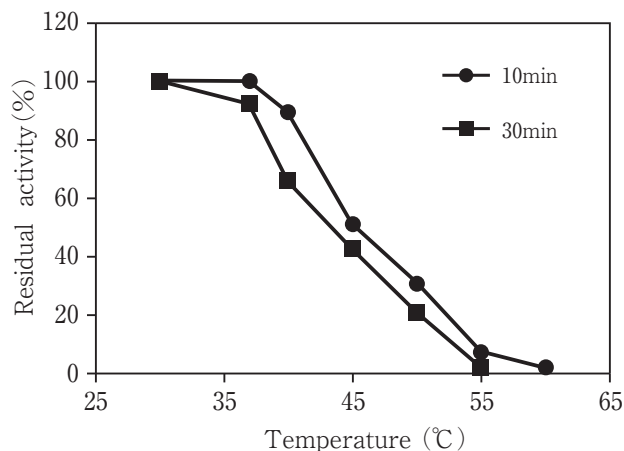


Fig. 3 Thermal stability of l-methionine decarboxylase from *Streptomyces* sp. 590

●, Enzyme activity was measured after incubation of the enzyme at various temperatures for 10 min. ■, Enzyme activity was measured after incubation of the enzyme at various temperatures for 30 min.

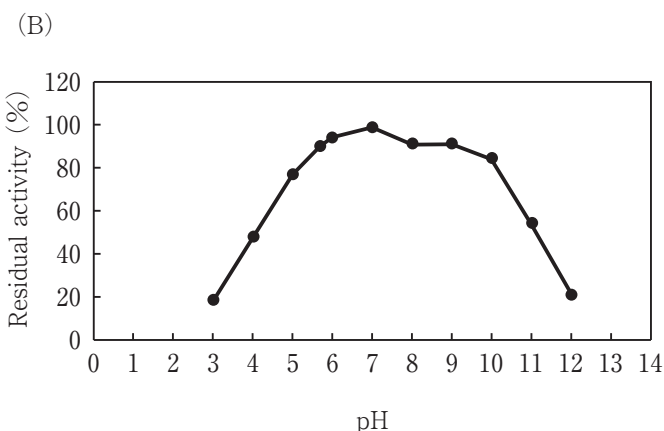
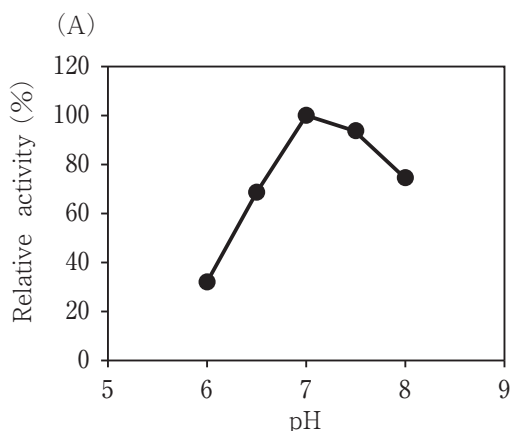


Fig. 4 Effects of pH on activity and stability of l-methionine decarboxylase from *Streptomyces* sp. 590.

(A) Optimum pH of l-methionine decarboxylase. Enzyme activity was measured in the KPB buffer. (B) pH stability of l-methionine decarboxylase. Enzyme activity was measured in Britton-Robinson's buffer.

ころ、N末端から ATAVDPGPEI- の配列であり、どちらも同じ配列であった。この配列を用いて相同性検索を行ったが、相同性の認められるタンパク質が得られなかったことから、新規性の高いタンパク質であることが推定された。

要 約

l-メチオニン脱炭酸酵素は、l-メチオニンの脱炭酸反応を触媒する PLP 依存酵素である。放線菌 *Streptomyces* sp. 590株由来のl-メチオニン脱炭酸酵素を精製し、性質検討およびN末端アミノ酸配列の解析を行った。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーと SDS-PAGE の結果から分子量60000の同一サブユニットからなるダイマー構造を有していることが確認された。本酵素の反応最適温度

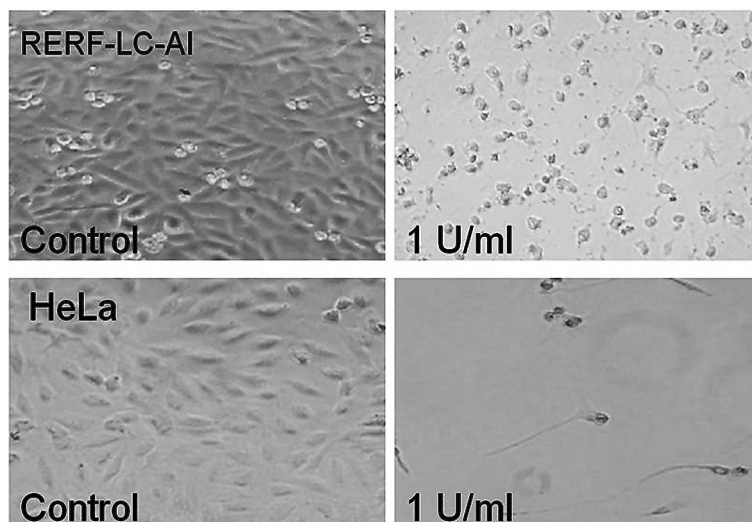
は45°C、最適 pH は7.0で、pH5.7から pH9.0の間で安定であった。また、ヒト子宮頸ガン細胞やヒト肺扁平上皮ガン細胞に対して抗腫瘍活性があることが判明した。二次元電気泳動を用いて精製酵素を分離し、N末端アミノ酸解析を行うことにより10残基のアミノ酸配列を明らかにすることができた。

参考文献

- 1) 村尾澤夫・荒井基夫：応用微生物学 改訂版。pp. 23-24, 培風館, 東京 (1993)
- 2) Mazelis, M. : Enzymatic degradation of adenosine triphosphate to adenine by cabbage leaf preparations. *Plant Physiol.*, **1**, 153-158 (1959)
- 3) Mazelis, M. : The pyridoxal phosphate-dependent oxidative decarboxylation of methionine by peroxidase. I. Characteristics

Table 1 Comparison of substrate specificity of l-methionine decarboxylase enzymes

substrate	Relative activity (%)			
	<i>Streptomyces</i>			<i>Fern</i>
	sp. 590 (this study)	sp. 590 (1980)	ATCC21020 (1990)	
l-methionine	100	100	100	100
d-methionine	<3			0
l-ethionine	10	19	8	0
S-ethyl-l-cysteine	59	61	29	12
S-methyl-l-cysteine	28	13		
l-leucine	19	15	5	40
l-isoleucine	<3	29	24	35
l-valine	<4		<5	16
l-alanine	<3		<5	0
l-cysteine	<3			
d, l-homocysteine	<3	24		
l-methioninesul foxide	<3			

Fig. 5 Anti-tumor efficacy of l-methionine decarboxylase from *Streptomyces* sp. 590 on RERF-LC-AI and HeLa cells.

- and properties of the reaction. *J. Biol. Chem.*, **237**, 104 (1962)
- 4) Hagino, H and K. Nakayama : Amino acid metabolism in microorganism Part II , production of 3-methylthiopropylamine from methionine by certain strains of *Streptomyces*. *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 1367 (1967)
 - 5) Hagino, H and K. Nakayama : Amino acid metabolism in microorganisms Part VI, l-methionine decarboxylase produced by a *Streptomyces* Strain. *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 727 (1968)
 - 6) Misono, H., Y. Kawabata, M. Toyosaka, T. Yamamoto and K. Soda : Purification and properties of l-methionine decarboxylase of *Streptomyces* sp. *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.*, **58**, 323-333 (1980)
 - 7) Stevenson, D. E., M. Akhtar and D. Gani : l-methionine decarboxylase from *Dryopteris filix-mas* : purification, characterization, substrate specificity, abortive transamination of the coenzyme, and stereochemical course of substrate decarboxylation and coenzyme. *Biochemistry*. **29**, 7631-7647 (1990)
 - 8) Akhtar, M., D. E. Stevenson and D. Gani : Fern l-methionine decarboxylase : kinetic and mechanism of decarboxylation and abortive transamination. *Biochemistry*. **29**, 7648-7660 (1990)
 - 9) Akhtar, M., D. E. Stevenson and D. Gani : *Streptomyces* l-methionine decarboxylase : purification and properties of the enzyme and stereochemical course of substrate decarboxylation. *Biochemistry*. **29**, 7660-7666 (1990)
 - 10) Kitaguchi, K., A. Uchida and Y. Ishida : Purification and characterization of l-methionine decarboxylase from *Cryptocodium cohnii*. *Fisheries Science*, **65**, 613-617 (1999)