

琉球大学学術リポジトリ

泡盛麹菌におけるシステインスルフィン酸：
 α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ反応(農芸化学
科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 当山, 清善, 与那覇, 和雄, 石原, 昌信, 弘津, 達也 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4087

泡盛麹菌におけるシステインスルフィン酸： α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ反応

当山清善*・与那覇和雄*・石原昌信*・弘津達也*

Seizen TOYAMA, Kazuo YONAHA, Masanobu ISHIHARA and
Tatsuya HIROTSU: The transaminase reaction of cysteine-
sulfinate with α -ketoglutarate in *Aspergillus awamori*

I 結 言

システインスルフィン酸 (CSA) は、生体内においてシステインの代謝分解過程で生成される重要な含硫アミノ酸で、本アミノ酸の代謝経路ならびに代謝に関与する酵素系について多くの研究が行われている^{2,4,8,13}。CSAの代謝について、脱炭酸反応によるハイポタウリンの生成とその酸化によるタウリンの生成経路及びアミノ基転移反応によるピルビン酸の生成経路が動物組織を用いた研究で明らかにされた^{11,18}。CSAは、主として両経路で代謝されることが広く認められているが、微生物におけるCSAの代謝経路についての知見は極めて少ない。

筆者らは、^{14,19,20} 細菌における ω -アミノ酸の代謝に関与するトランスアミナーゼの単離・精製を行ない酵素の性質を明らかにしてきたが、最近、泡盛麹菌に γ -アミノ酪酸及びアラニンの関与するトランスアミナーゼ^{3,16}とともに、CSAをアミノ基供与体としたトランスアミナーゼ活性が高いことを確めた。本報では、泡盛麹菌の無細胞抽出液を酵素源としてCSA： α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ反応について調べたので報告する。

II 実 験 方 法

(1) 供試泡盛麹菌株： 実験にはグルコース・ペプトン含有液体培地で良好な生育を示し、 γ -アミノ酪酸トランスアミナーゼ活性¹⁶及びD-アミノ酸酸化酵素活性¹⁵が高い *Aspergillus awamori* IAM 2112 菌株を用いた。

(2) 培地組成と供試菌株の培養： 培養に用いた液体培地はグルコース 2.0%，ペプトン 0.2%，リン酸第一カリウム 0.1%，リン酸第二カリウム 0.2%，塩化カリウム 0.05%，硫酸マグネシウム 0.02%及び酵母エキス 0.02%を含む組成 (pH 6.0) で、常法通り (120℃, 20分間) 滅菌して用いた。前培養は上記液体培地 5.0 ml を試験管 (1.8×18 cm) に採り、供試菌株の胞子を接種したのち、30℃

* 琉球大学農学部農芸化学科

で24時間振とうして行なった。本培養は500 ml容振とうフラスコに上記液体培地150 mlを採り、前培養菌体を接種したのち、30°Cで24時間振とうして行なった。

(3) 酵素液の調製：本培養後の麹菌菌体を沓紙沓過により採取し、蒸留水、0.85%食塩水及び0.01 Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)で洗浄した。洗浄菌体に海砂を加えて乳鉢で磨砕したのち、 10^5 Mピリドキサーール-5'-リン酸(PLP)及び0.01%2-メルカプトエタノールを含む上記緩衝液を加えて抽出を行なった。無細胞抽出液中の菌体残渣及び海砂を遠心分離により除き、上清液をPLPを含む上記緩衝液に対して一夜透析を行ない、遠心分離後の上清液を酵素液として用いた。

(4) 蛋白質の定量：酵素液の蛋白質の定量はLowryら⁷⁾の方法に準じて行なった。

(5) 酵素活性の測定：酵素反応組成はL-システインスルフィン酸10 μ moles, α -ケトグルタル酸10 μ moles, リン酸カリウム緩衝液(pH 8.0) 50 μ moles, PLP 0.1 μ moles及び酵素で、総量1.0 mlとした。酵素反応は、37°Cで20分間行なった。反応混液に25%三塩化酢酸を加えて反応を停止したのち、遠心分離により除蛋白を行なった。反応で生成したグルタミン酸及びアラニンの定量はペーパークロマトグラフィー・ニンヒドリン法で行なった。反応で生成するピルビン酸の定量はサリチルアルデヒド法⁵⁾を改変して次のように行なった。酵素反応混液に水酸化カリウム(60%)1.0 ml及びサリチルアルデヒド(2.0%)0.5 mlを加え、37°Cで30分間保ったのち蒸留水1.5 mlを加えた。ピルビン酸との反応で生成した化合物の色度を480 nmにおける吸光度を測定し、本測定条件で作成したピルビン酸の検量線から酵素反応で生成したピルビン酸量を算出した。酵素活性の単位は、反応1分間に生成するグルタミン酸又はピルビン酸の μ mole数で表わし、比活性は蛋白質1 mg当りの単位数で示した。

III 実験結果

1. L-システインスルフィン酸と α -ケトグルタル酸のアミノ基転移反応

供試泡盛麹菌株をグルコース・ペプトン含有液体培地で培養して得た菌体の無細胞抽出液を酵素液として用い、L-システインスルフィン酸と α -ケトグルタル酸を基質とした反応で生成するL-グルタミン酸を調べたのがTable 1である。反応系から基質のシステインスルフィン酸または α -ケトグルタル酸を除くと全くグルタミン酸の生成がなく、また熱失活した酵素ではグルタミン酸の生成はみられない。この結果は、無細胞抽出液中に両基質が存在した系でグルタミン酸の生成反応を触媒するトランスアミナーゼが存在することを示している。PLPを除いた反応系で、グルタミン酸の生成が減少しており、本酵素はPLPを補酵素としていることが示唆される。なお、酵素反応で生成するグルタミン酸と酵素量との関係を調べた結果、酵素蛋白が70 μ gまでは直線関係が得られた。

2 酵素反応で生成するグルタミン酸とピルビン酸との関係

酵素反応で、 α -ケトグルタル酸はアミノ基転移反応を受けてグルタミン酸を生成することがわかったので、次にアミノ基供与体であるシステインスルフィン酸からの反応生成物を調べた。システインスルフィン酸が脱アミノ基を受けて生成するケト酸を調べた結果、反応混液中にはグルタミン酸とともにピルビン酸が生成されていることが確かめられた。酵素反応時間とグルタミン酸及びピルビン酸との関係を示したのがFig. 1である。図から明らかなように、反応時間とともにグルタミン酸とピルビン酸の生成がみられ、両生成物がほぼ等モル生成される。このことは、システインスルフィン酸がアミノ基転移反応を受けて生成する β -スルフィニールピルビン酸が分解され、ピルビン酸が生成されたことを示している。また、両物質の生成反応は、反応30分間までは直線的に進行する。

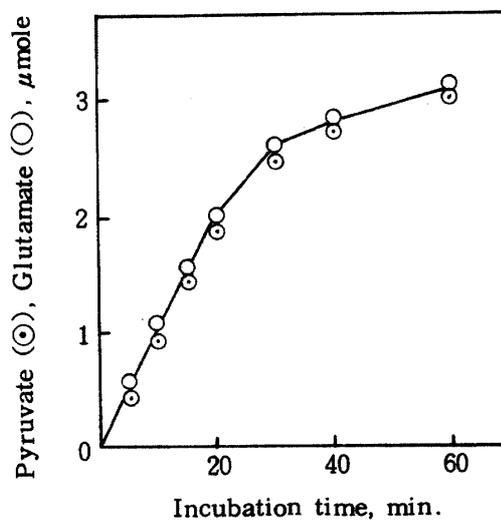
Table 1. Transaminase reaction between L-cysteinesulfinate and α -ketoglutarate by the cell-free extract of *Asp. awamori*

Reaction system	L-Glutamate formed μ moles
Complete	2.20
minus PLP	1.43
minus CSA	0
minus α -KG	0
with boiled enzyme	0

Asp. awamori was grown in a medium containing glucose 2.0%, peptone 0.2%, K_2HPO_4 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, KCl 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02% and yeast extract 0.02% (pH 6.0). The cultures were carried out at 30°C for 24 hr with shaking on a reciprocating shaker. The mycelia were harvested by filtration and washed with distilled water. The pressed mycelia were ground in mortar with seasand and extracted with 0.01M potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.1mM pyridoxal 5'-phosphate (PLP) and 0.01% 2-mercaptoethanol. The supernatant solution obtained by centrifugation was dialyzed against the same buffer. The cell-free extract was employed as enzyme source. Transaminase reaction system consisted of 10 μ moles of L-cysteinesulfinate (CSA), 10 μ moles of α -ketoglutarate (α -KG), 0.1 μ mole of PLP, 50 μ moles of potassium phosphate buffer (pH 8.0) and enzyme (50 μ g) in a final volume of 1.0 ml. Enzyme reaction was carried out at 37°C for 20 min and the reaction was terminated with 0.1 ml of 25% trichloroacetate. The glutamate formed was determined by paper chromatography. One unit of the enzyme was defined as the amount of enzyme which catalyzes the formation of 1 μ mole of glutamate per min. The specific activity was expressed as unit per mg of protein.

Fig. 1 Formation of L-glutamate and pyruvate in the L-cysteinesulfinate : α -keto-glutarate transaminase reaction

The enzyme reaction was carried out for the indicated time with 50 μ g of enzyme. Pyruvate formed was determined by the salicylaldehyde method. Other assay conditions are similar to those given in Table 1.



3 酵素反応で生成するピルビン酸とL-アラニン

システインスルフィン酸と α -ケトグルタル酸を基質とした反応で、グルタミン酸とピルビン酸が反応生成物として認められたのであるが、酵素反応混液中に他のアミノ酸が生成されるかどうかを調べた。酵素反応を長時間行なうか、あるいは多量の酵素を用いて反応を行なった結果、L-アラニンが反応混液中に生成されることが確かめられた。Fig. 2は、多量の酵素(200 μ g)を用いた反応で生成するピルビン酸とアラニンについて調べた結果である。反応初期にピルビン酸の生成がみられ、反応時間とともにアラニンが生成されピルビン酸が減少した。このことは、酵素反応で生成したグルタミン酸とピルビン酸を基質とした反応を触媒する酵素が酵素液中に存在し、アミノ基転移反応によりアラニンが生成されたことを示すものである。

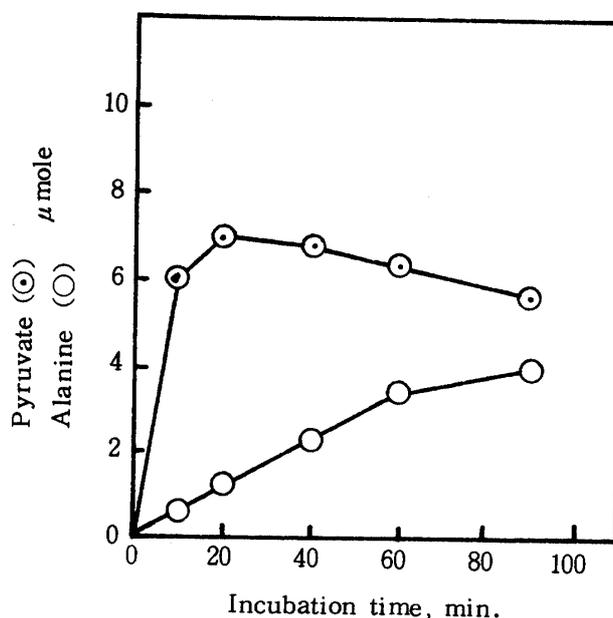


Fig. 2 Formation of pyruvate and L-alanine in the L-cysteinesulfinate: α -ketoglutarate transaminase reaction

The enzyme reaction was carried out for the indicated time with 300 μ g of enzyme. L-Alanine and pyruvate were determined by the methods of paper chromatography and salicylaldehyde, respectively. Other assay conditions are similar to those given in Table 1.

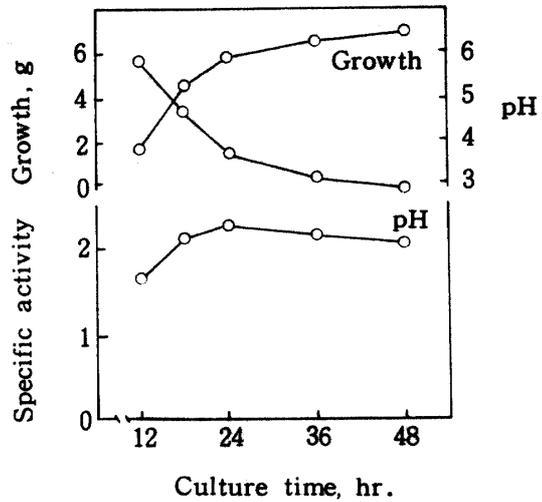
4 泡盛麹菌の培養時間と酵素活性との関係

供試泡盛麹菌株をグルコース・ペプトン含有液体培地で各時間培養を行ない、得られた菌体の無細胞抽出液を用いてシステインスルフィン酸： α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ活性を調べたのがFig. 3である。酵素活性は培養初期菌体にも存在し、培養24時間目に高い活性が得られた。本酵素活性は培養後期菌体でも高い値が得られ、麹菌の生育に伴ない培養液のpHが低下しても活性の低下はみられない。

グルコース・ペプトン培地に各種のアミノ酸を加えて供試菌株の培養を行ない、酵素活性が影響をう

Fig. 3 Time course of the formation of L-cysteinesulfinatase: α -ketoglutarate transaminase by *Asp. awamori*

The cultures were carried out for the indicated time. The degree of growth was shown as the amount of pressed mycelia (g, wet weight). Other conditions are the same as Table 1.

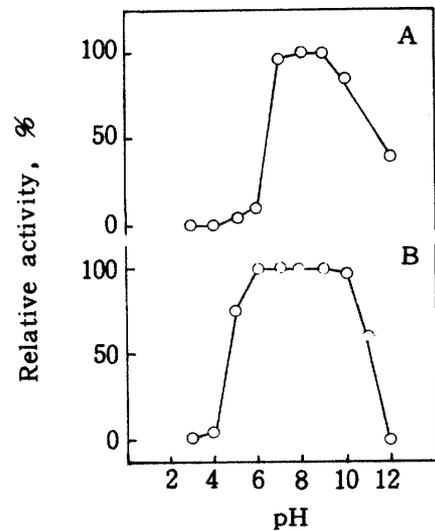


けるかどうかを調べた。培地にL-グルタミン酸, L- α -アラニン, L-アスパラギン酸, β -アラニン及び γ -アミノ酪酸等を加えた培地で培養して得た菌体でもほぼ同じ比活性が得られた。従って, 供試菌株による本酵素の生成は, 培地に加えるアミノ酸によって誘導されないことが明らかとなった。

5. トランスアミナーゼ反応に及ぼす pH の影響と酵素の pH 安定性

Fig. 4 Effect of pH on activity of L-cysteinesulfinatase: α -ketoglutarate transaminase and the enzyme stability.

The activity was assayed at the indicated pH (A). The enzyme was incubated at various pHs and at 37°C for 10 min, and the residual activity was assayed at pH 8.0 (B). Buffer used: sodium acetate, pH 5-6; potassium phosphate, pH 6-8; glycine-KCl-KOH, 9-11; K_2HPO_4 , 10-12. Other conditions are the same as Table 1.



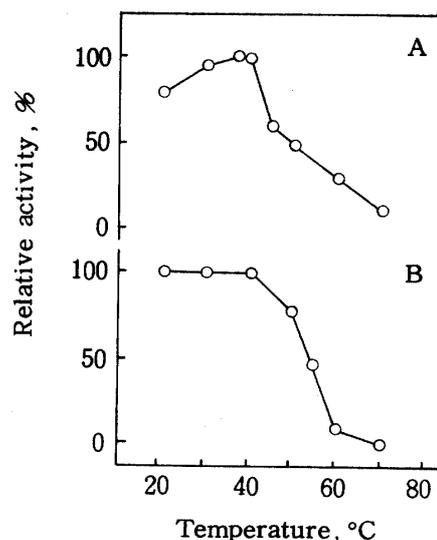
システインスルフィン酸トランスアミナーゼ反応を各種 pH で行ない, 活性と pH との関係を調べたのが Fig. 4 (A) である。本酵素反応は pH 5.0 以下の酸性領域では全く進行せず, 反応最適 pH は 7.0 ~ 9.0 にある。pH 10.0 で高い活性が得られており, 本反応は強アルカリ域でも進行する。酵素液を各種 pH で 37°C, 30 分間加温処理したのち活性を測定し, 酵素の pH 安定性を調べたのが Fig. 4 (B) である。本酵素は pH 6.0 ~ 10.0 の範囲で安定で, pH 4.0 以下では不安定である。基質が存在しないと本酵素は pH 12.0 で完全に失活する。

6. トランスアミナーゼ反応に及ぼす温度の影響と酵素の熱安定性

Fig. 5 (A) は、酵素反応を各種温度で行ない、酵素活性と温度との関係調べた結果である。反応の至適温度は 37 °C にあり、40 °C 以上では活性が徐々に低下した。酵素液を pH 8.0 で、各温度に 5 分間保ったのち酵素活性を測定したのが Fig. 5 (B) である。本酵素は 40 °C までは安定である。なお、本酵素の補酵素と考えられる P L P 存在下で酵素液を加温処理しても酵素の安定性には変化がみられなかった。

Fig. 5 Effect of temperature on the activity of L-cysteinesulfinate : α -ketoglutarate transaminase and the enzyme stability

The activity was assayed at various temperatures (A). The enzyme was incubated at various temperatures and at pH 8.0 for 5 min, and the residual activity was assayed (B). Other assay conditions are same as Table 1.



IV 考 察

最近、システインの代謝分解産物であるタウリンが生体内において重要な生理的機能を果していることが明らかになり^{2,9)}、タウリン生合成の前駆体であるシステインスルフィン酸の代謝に関与するトランスアミナーゼの生体内における分布、あるいは本酵素の特性等に関する研究が動物組織を用いて行われつつある^{1,10)}。システインスルフィン酸の関与するトランスアミナーゼ反応は細菌にも存在し、動物組織と同じく α -ケトグルタル酸をアミノ基受容体とした反応であることが確かめられていた¹²⁾。本研究で、供試泡盛麹菌の無細胞抽出液中にシステインスルフィン酸と α -ケトグルタル酸からグルタミン酸の生成反応を触媒する酵素が存在することが明らかとなった。酵素反応でグルタミン酸とともにピルビン酸が生成されることは、システインスルフィン酸がアミノ基転移反応を受けて生成した β -スルフィニールピルビン酸が分解されることによるものである。 β -スルフィニールピルビン酸は不安定で、生成後直ちに分解を受けピルビン酸と SO_2 に変化し、生成した SO_2 は酸化を受け SO_3^- または SO_4^- に変化することが知られている^{8,12)}。酵素反応でアラニンが生成されるのは、反応で生成したグルタミン酸とピルビン酸のアミノ基転移反応によるものと考えられる。供試菌株の無細胞抽出液中には本反応を触媒する酵素が存在することも確かめられている³⁾。従って、無細胞抽出液中にはグルタミン酸とピルビン酸の生成反応を触媒する酵素と両生成物を基質とした反応を触媒する酵素が存在し、両反応が同時に進行することによってアラニンが生成される (Scheme 1)。

2. Awapara, J. 1976 The metabolism of taurine in the animal, "Taurine" (ed. by Huxtable, R. and Barbeau, A.) p. 1 ~ 20, Raven Press, New York
3. 石原昌信, 与那覇和雄, 当山清善 1980 泡盛麹菌のL-アラニン: α -ケトグルタン酸トランスアミナーゼの精製と性質, 琉大農学報 27 :
4. 岩田平太郎, 栗山欣弥 1975 "タウリン" 医歯薬出版
5. Berntsson, S. 1955 Spectrophotometric determination of pyruvic acid by the salicylaldehyde method, Anal. Chem. 27 : 1659 ~ 1660
6. Ellis, R. J. and Davies D.D. 1961 Glutamic-oxaloacetic transaminase of cauliflower, I. Purification and specificity, Biochem. J. 78 : 615 ~ 623
7. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R.J. 1951 J. Biol. Chem. 193 : 265 ~ 275
8. Meister, A. 1965 "Biochemistry of the amino acids" p. 799 ~ 811, Academic Press, New York
9. Rassin, D. K. and Gaull, G. E. 1978 Taurine and other sulfur containing amino acids: Their function in the central nervous system, "Amino acids as chemical transmitters" (ed. by Fonnum, F.), p. 571 ~ 597, Plenum Publishing Co.
10. Recasens, M., Benezra, R., Gabellec, M. M., Delaunoy, J. P. and Mandel, P. 1979 Purification and some properties of cysteine sulfinatase, FEBS Letters 99 : 51 ~ 54
11. Schaeffer, J. M., Mallorga, P., Austin, L. and Mandel, P. 1978 A fluorimetric assay for cysteine sulfinatase, Anal. Biochem. 90 : 239 ~ 245
12. Singer, T. P. and Kearney, E. B. 1956 Intermediary metabolism of L-cysteinesulfinic acid in animal tissues, Arch. Biochem. Biophys. 61 : 397 ~ 409
13. 鈴木友二 1962 シス테인とシスチンの代謝 "アミノ酸シリーズ第5集" (アミノ酸シリーズ編集委員会編), P. 95 ~ 103, 世界保健通信社
14. Toyama, S., Misono, H. and Soda, K. 1972 Crystalline taurine : α -ketoglutarate aminotransferase from *Achromobacter superficialis*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 46 : 1374 ~ 1379
15. 当山清善, 与那覇和雄, 知名定一 1979 泡盛麹菌のD-ロイシン酸化酵素 琉大農学報 26 : 115 ~ 123
16. 当山清善, 与那覇和雄 1979 泡盛麹菌の ω -アミノ酸: α -ケトグルタン酸トランスアミナーゼ, 発酵と工業 37 : 336
17. Yagi, T., Kagamiyama, H. and Nozaki, M. 1979 Cysteine sulfinatase transamination activity of aspartate aminotransferases, Biochem. Biophys. Res. Commun. 90 : 447 ~ 452
18. Yamaguchi, K., Sakakibara, S., Asamizu, J. and Ueda, I. 1973 Induction and activation of cysteine oxidase of rat liver. II. The measurement of cysteine metabolism in vivo and the activity of cysteine oxidase, Biochim. Biophys. Acta 297 : 48 ~ 59
19. Yonaha, K., Toyama, S., Yasuda, M. and Soda, K. 1977 Properties of crystalline ω -amino acid : pyruvate aminotransferase of *Pseudomonas* Sp. F-126, Agric. Biol. Chem. 41 : 1701 ~ 1706

-
20. Yonaha, K. and Toyama, S. 1980 γ -Aminobutyrate : α -ketoglutarate aminotransferase from *Pseudomonas* sp. F-126 : Purification, crystallization, and enzymological properties, Arch. Biochem. Biophys. 200 : 156 ~ 164

Summary

The cell-free extract of *Aspergillus awamori*, grown on peptone-glucose medium with shaking, catalyzed the transamination reaction between cysteinesulfinate and α -ketoglutarate to produce L-glutamate. The keto acid formed in the transaminase reaction from cysteinesulfinate was pyruvate. The pyruvate will presumably be produced from β -sulfinylpyruvate, a deamination product of cysteinesulfinate. The transamination of L-glutamate and pyruvate, which were produced in the cysteinesulfinate transaminase reaction, was also catalyzed by the cell-free extract of the strain to yield L-alanine. The optimal pH and temperature for the transaminase reaction were 7.0 - 9.0 and 37°C, respectively.