

ホモシステインスルフィン酸, ホモシステインスルホン酸, ホモシステインスルフォンアミドの合成とアミノ酸代謝酵素との反応性

数 岡 孝 幸¹⁾, 前 田 彰 久¹⁾, 老 川 典 夫¹⁾, 切 畑 光 統²⁾, 左右田 健 次¹⁾

(¹⁾関西大学工学部*, (²⁾大阪府立大学農学部**)

Synthesis of Homocysteinesulfinic Acid, Homocysteinesulfonic Acid and Homocysteinesulfonamide, and Reactivities with Various Enzymes Acting on Glutamic Acid and Glutamine

Takayuki KAZUOKA¹⁾, Akihisa MAEDA¹⁾, Tadao OIKAWA¹⁾, Mitsunori KIRIHATA²⁾ and Keiji SODA¹⁾

¹⁾Faculty of Engineering, Kansai University, ²⁾Faculty of Agriculture, University of Osaka Prefecture

We synthesized L-homocysteinesulfinic acid and L-homocysteinesulfonic acid, analogs of L-glutamic acid from L-methionine with overall yield of 18 and 30%, respectively. L-Homocysteinesulfonamide was synthesized as an analog of glutamine with an overall yield of 3%. Their reactivities with various enzymes acting on glutamic acid and glutamine were examined. L-Homocysteinesulfinic acid reacted with glutamate dehydrogenase ($K_m=13.3$ mM, $V_{max}=2.46$ U/mg), glutamate decarboxylase ($K_m=38.4$ mM, $V_{max}=2.39$ U/mg) and glutamate oxidase ($K_m=2.42$ mM, $V_{max}=22.8$ U/mg). It competitively inhibited glutamate decarboxylase ($K_i=6.23$ mM). L-Homocysteinesulfonic acid did not react with all the enzymes tested, but served as a competitive inhibitor of glutamate decarboxylase ($K_i=1.24$ mM). L-Homocysteinesulfonamide competitively inhibited glutaminase ($K_i=4.27$ mM) and asparaginase ($K_i=27.2$ mM).

酵素は一般的に基質特異性が高いが性質や構造が類似する基質アナログに対しても、しばしば作用する。酵素反応では基質の-COOHと-SOOHは類似する反応性を示す。例えばアスパラギン酸のアナログであるシステインスルフィン酸は、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ^{1,2)}やアスパラギン酸デカルボキシラーゼ³⁾に対して高い反応性を示す。しかしグルタミン酸のアナログであるホモシステインスルフィン酸(HCS)などについては不明な状態にある。本研究では、グルタミン酸のアナログとしてHCSやホモシステインスルホン酸(HCA)を、またグルタミンのアナログとしてホモシステインスルフォンアミド(HCN)を取り上げ、これらを化学的に合成し、様々なグルタミン酸及びグルタミン代謝関連酵素に対する反応性を調べた。

実験方法

L-ホモシステインスルフィン酸の合成

(1) 10 gのL-メチオニンに200 mlの無水液体アンモニアに溶解し、青色が30分維持するまでナトリウムの小片を添加した後、4.0 gの塩化アンモニウムと8 mlのベンジルクロライドを加えた。アンモニアを減圧乾燥で除去した後、500 mlの水に溶解し、氷酢酸でpHを4.0に調整した。懸濁液を煮沸後濾過し、濾液を4℃で3時間静置した。沈殿物を集め、

*所在地：吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

**所在地：堺市学園町1-1 (〒599-8531)

100 mlの水, 50 mlのエタノール, 10 mlのジエチルエーテルで順次洗浄し, 乾燥させた後, 0.014 N熱塩酸溶液 (100℃) に溶かし再結晶した。(2) 得られた5.36 gのS-ベンジル-L-ホモシステインを0.23 gの塩化モリブデン, 1.81 mlの60%過塩素酸と6.8 mlの水からなる溶液に添加し水浴中で冷却した後, 17.2 mlの30%過酸化水素を添加し14時間静置した。析出した結晶を50 mlの水, 50 mlのエタノール, 10 mlのエーテルで順次洗浄後乾燥し, 500 mlの沸騰水中で再結晶させた。(3) 得られた3.9 gのS-ベンジル-L-ホモシステインスルホン酸を200 mlの無水液体アンモニアに溶解し, 金属ナトリウムを加えた後, 減圧乾燥でアンモニアを除去した。乾燥物を80 mlの水に溶解し, Dowex樹脂カラムに吸着させ, 水で溶出後約10 mlに濃縮した。この溶液にエタノールを加え4℃で一晩静置した。得られた結晶を5 mlの冷エタノール, 3 mlのジエチルエーテルで洗浄, 乾燥させた後熱水-エタノール (1:4) 溶液中で再結晶させHCAを得た。

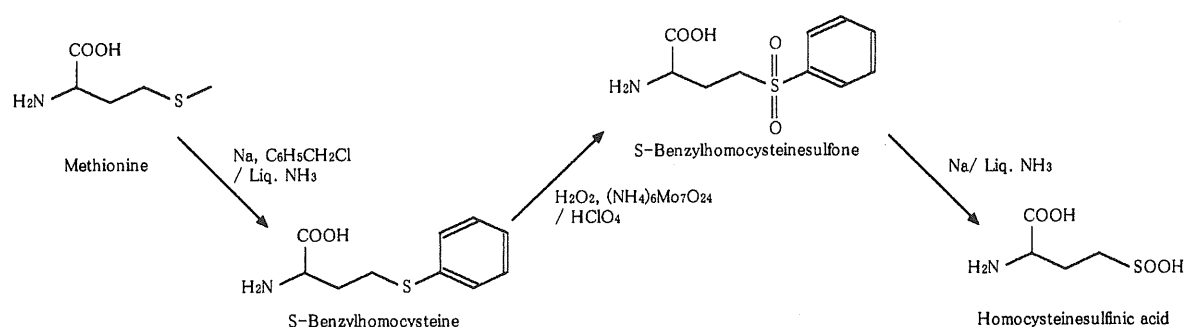


Fig. 1 Synthesis of L-homocysteinesulfinic acid

L-ホモシステインスルホン酸の合成

(1) 10 gのメチオニンに200 mlの無水液体アンモニアに溶解し, ナトリウム, 塩化アンモニウムを添加した後, 減圧乾燥でアンモニアを除去した。乾燥物に150 mlの水に溶解し, 氷酢酸でpHを7.0に調整した。懸濁液のpHを1N NaOHで中性付近に維持しつつ, 飽和フェリシアン化カリウムを添加し, 得られた沈殿物を200 mlの水, 30 mlのエタノール, 10 mlのジエチルエーテルで洗浄し乾燥させた後, 1000 mlの沸騰水中で結晶した。(2) 得られたL-ホモシステインを3 N 塩酸に溶解させ褐色になるまで臭素を加えた後, 約10 mlまで濃縮した。これに50 mlの水を加えDowex樹脂カラムに吸着させ水で溶出させた。溶出液を約5 mlまで濃縮後, 30 mlのエタノールを加え濃縮した。さらに30 mlのクロロホルムを加え濃縮することにより臭素を除去したのち水-エタノール中で結晶させ, 5 mlの冷エタノール, 3 mlのジエチルエーテルで洗浄後乾燥させHCAを得た。

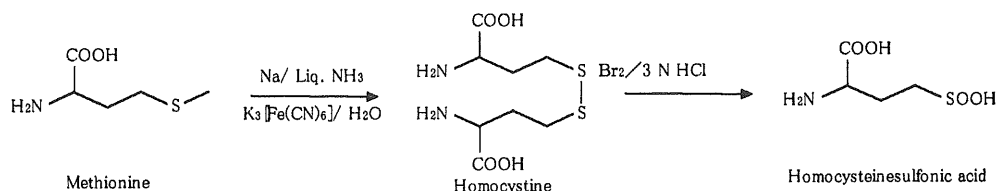


Fig. 2 Synthesis of L-homocysteinesulfinic acid

L-ホモシステインスルフィンアミドの合成

(1) L-ホモシステインはL-ホモシステインスルホン酸の合成の(1)で述べたように合成した。(2) 氷浴中で冷却しつつ3.6 gのL-ホモシステインを27 mlの1 N NaOHに溶解させた後, 6.89 gのカルボベンゾキシクロライドを54 mlの

1 N NaOHに溶かした溶液を加えた。反応液をジエチルエーテルで2度洗浄し、その後すぐに6 N 塩酸で酸性化した。生成物を濾過し、4度酢酸エチルで抽出した後、酢酸エチル-クロロホルム中で結晶させた。(3) 5.5 gのジカルボベンゾキシ-L-ホモシステイン、420 mgのp-トルエンスルホン酸、11 gのベンジルアルコールを120 mlのベンゼンに加え熱した後、エステル形成で生じた水を除去した。有機溶媒層をジカルボネートナトリウムと水で洗浄し、乾燥させた後、トルエン-n-ヘキサン中で結晶した。これらを酢酸エチルに溶解させシリカ樹脂カラムに吸着させ30% 酢酸エチル-n-ヘキサンで溶出し乾燥した後、トルエン-n-ヘキサン中で再結晶した。(4) 塩素を通気しつつ70 mlの水酢酸中に得られた5.8 gのジカルボベンゾキシ-L-ホモシステインベンジルエステルを加えた後、反応液を乾燥した。(5) 乾燥物を100 mlのベンゼンに溶解し、30分間無水アンモニアを通気し乾燥した後ベンゼンに再び溶解させ濾過した。濾液を冷却し生成した沈殿物を水-エタノールで結晶し乾燥した。(6) 得られた1 gのジカルボベンゾキシアミノプロパンスルホンアミドを20 mlの95%エタノールに溶解し170 mgの黒色パラジウム触媒存在下4時間水素で処理した後濾過し、濾液を乾燥した。乾燥物を水-エタノールで結晶化し、HCNを得た。

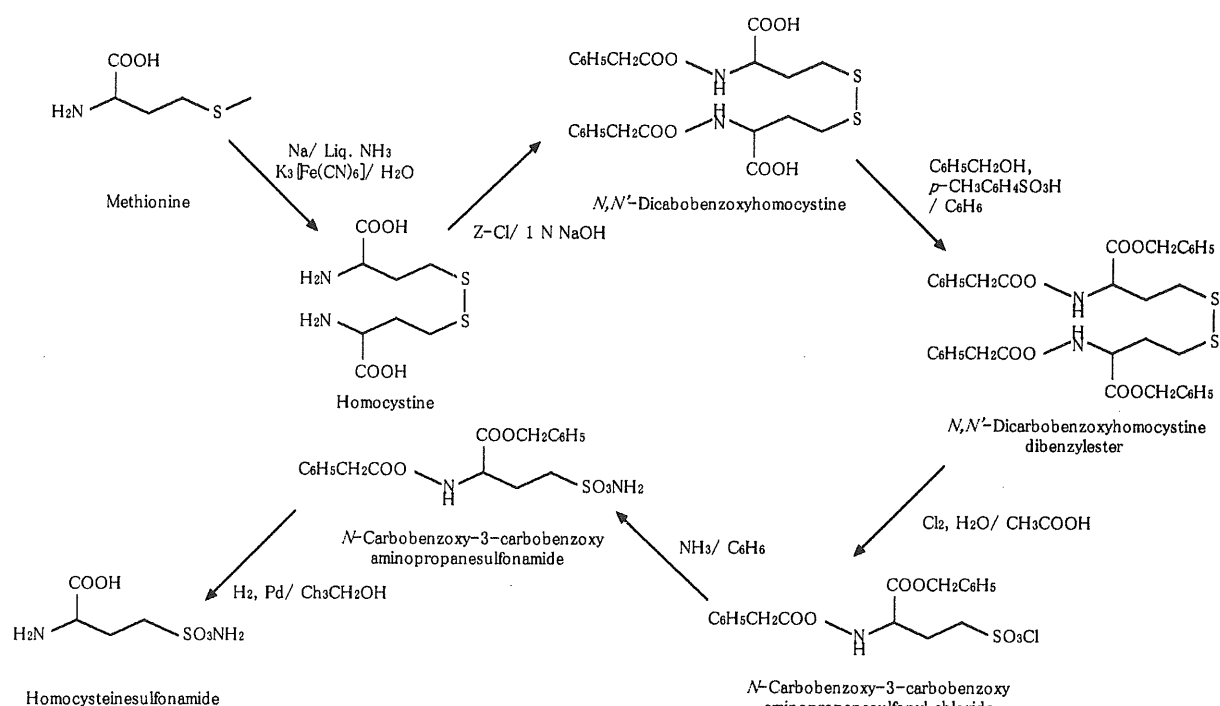


Fig. 3 Synthesis of L-homocysteinesulfonamide.

動力学定数測定と阻害定数測定

グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GluDH) は反応で生成する NADH に由来する 340 nm の吸光度の増加から、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GluDC) は HPLC で減少する基質を定量し、グルタミン酸-オキザロ酢酸アミノトランスフェラーゼ (Glu-OAA AT) は HPLC で基質と生成物を定量し、グルタミン酸オキシダーゼ (GluOx)・グルタミナーゼ・アスパラギナーゼはネスラー法でアンモニアを定量しそれぞれ活性を測定し動力学定数を測定した。

GluDH, GluOx, Glu-OAA AT 反応では 10 mM の HCS あるいは HCA を反応系に添加し阻害効果を調べた。GluDC 反応では 5-20 mM HCS, 1-3 mM HCA を、またグルタミナーゼ及びアスパラギナーゼでは 1-3 mM HCN を反応系に添加し阻害定数を測定した。

結果と考察

HCS, HCA, HCNを10 g (67 mmol) のL-メチオニンからそれぞれ1.8 g (11 mmol), 3.0 g (16 mmol), 300 mg (1.6 mmol) 合成した。合成したHCS, HCA, HCNおよびHCN合成の中間体の融解温度を表1に示す。

Table 1. The melting points of products

Product	m. p. (°C)
HCS	174
HCA	262
<i>N,N'</i> -Dicarbobenzoxymocystine	120
<i>N,N'</i> -Dicarbobenzoxymocystine dibenzylester	88
<i>N</i> -Carbobenzoxymocystine-3-carbobenzoxymocystineaminopropanesulfonamide	123
HCN	236

合成したHCS, HCA, HCNを基質にして反応速度と阻害効果を調べた結果 (表2), HCSの動力学的定数をグルタミン酸に対するものと比較するといずれも高い K_m 値と低い V_{max} 値が得られ, グルタミン酸に比べて反応性は低かったが, 調べた酵素全てにおいて多かれ少なかれ反応性を示した。HCSは生体中に存在することが知られており⁴⁾, 上記の結果はHCSが生体中においてグルタミン酸代謝関連酵素によってグルタミン酸と同様の経路で代謝され得ることを示唆している。HCAはHCS同様生体中に存在し, 神経伝達物質として働く反面, 高濃度では神経細胞に毒性を示すことが知られている^{4,5)}が今回調べた酵素には反応性を示さなかった。酵素に対するHCA阻害効果の有無の違いから, HCAが基質とならないのは, グルタミン酸の γ -COOH基を認識するアミノ酸残基がHCSの γ -SOOHを認識できるがHCAの γ -COOOHは認識できないか, あるいはその基質ポケットにHCAが入ることができないかのいずれかの理由によると考えられる。システインスルフィン酸・システインスルフィオン酸を脱炭酸し, ハイポタウリン・タウリンの生成を触媒するシステインスルフィン酸 β デカルボキシラーゼ⁶⁾のように, γ 位の認識が厳密ではない他の酵素によってHCAは代謝されると考えられる。いままでHCNを基質とする酵素の報告はないが, この化合物による酵母の生育阻害効果が知られており, その理由の一つとしてグルタミン酸シンターゼの阻害剤として働くことによりグルタミン酸生合成が阻害されるためとの報告がある^{7,8)}。今回の結果からその生育阻害効果としてグルタミン酸活性の阻害によるグルタミン酸の, そしてアスパラギナーゼ阻害によるアスパラギン酸の生合成の阻害も生育阻害効果の一因であることが示唆された。

Table 2. Kinetic parameters of enzymes

Enzyme	Substrate (Inhibitor)	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	K_i (mM)
GluDH	Glutamate	1.47	6.78	
	HCS	13.3	2.46	—
GluDC	Glutamate	7.14	6.97	
	HCS	38.4	2.39	6.23
	HCA	—	—	1.24
GluOx	Glutamate	0.454	4.74	
	HCS	5.06	1.86	—
Glu-OAA AT	Glutamate	0.839	179	
	HCS	2.42	22.8	—
Glutaminase	HCN	—	—	4.27
Asparaginase	HCN	—	—	7.22

— : Not detection

文 献

- 1) Braunstein A. E. (1973) The Enzymes (3rd ed.) 9 : 379 - 481.
- 2) Yagi T., Kagamiyama H., and Nozaki M. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 90 : 447 - 452.
- 3) Tate S. S., and Meister A. (1971) Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol. 35 : 503 - 543.
- 4) Tschopp P., Streit P., and Do K. Q. (1992) Neuroscience Letters 145 : 6 - 9.
- 5) Kim J. P., Koh J. Y., and Choi D. W. (1987) Brain Research 437 : 103 - 110.
- 6) Do K. Q., and Tappaz M. L. (1996) Neurochem. Int. 28 : 363 - 371.
- 7) Masters D. S., and Meister A. (1982) J. Biol. Chem. 257 : 8711 - 8715.
- 8) Meek T. D., and Villafranca J. J. (1980) Biochemistry. 19 : 5513 - 5519.

