

## セレノシステイン代謝の酵素化学

田中英彦・江崎信芳・中村武史・嘉来宣之・左右田健次

(京都大学化学研究所微生物化学研究部門\*)

### Enzyme Chemistry of Mammalian Selenocysteine Metabolism

Hidehiko TANAKA, Nobuyoshi ESAKI, Takeshi NAKAMURA,

Nobuyuki KARAI and Kenji SODA

*Institute for Chemical Research, Kyoto University*

We have studied enzymologically the mammalian metabolism of selenocysteine, and shown that selenocysteine is synthesized by the coupled reaction of cystathionine  $\beta$ -synthase (EC 4.2.1.22) and cystathionine  $\gamma$ -lyase (EC 4.4.1.1) in rat liver. During the course of this study, we have found a novel pyridoxal enzyme, selenocysteine  $\beta$ -lyase, in a rat liver homogenate, which decomposes specifically L-selenocysteine into L-alanine and  $H_2Se$ . The enzyme occurs in various mammalian tissues such as livers, kidneys and hearts of rat, monkey and some others. We have purified the enzyme from pig liver to homogeneity and characterized it. The enzyme has a molecular weight of about 93,000 and consists of two identical subunits of molecular weight 49,000. The enzyme has an absorption maximum at 420 nm, and contains one mol of pyridoxal 5'-phosphate as a coenzyme per mol of enzyme. Its maximum reactivity is at about pH 9.0. The enzyme acts exclusively on L-selenocysteine. The following compounds are inert: DL-selenocystine; L-cystine, L-cysteine, L-serine,  $\beta$ -chloro-L-alanine, L-cysteinesulfinate, S-methyl-L-cysteine, Se-ethyl-DL-selenocysteine, L-homocysteine, selenocysteamine and selenocystamine. L-Cysteine ( $K_i=1.0$  mM) inhibits the enzyme competitively with L-selenocysteine ( $K_m=0.83$  mM).

---

\* 所在地：京都府宇治市五ヶ庄 (〒611)

ラット肝臓ならびにウシ赤血球のグルタチオンペルオキシダーゼ, *Clostridium sticklandii* のグリシンレダクターゼ, *Methanococcus vannielii* のギ酸脱水素酵素, *Cl. kluyveri* のヒドロゲナーゼなどの含セレン酵素はいずれもポリペプチド鎖中にセレノシステイン残基を含有することが実証されている<sup>1)</sup>。しかし, セレノシステインの代謝についてはほとんど不明な状態にある。最近, 著者らはラット肝臓におけるセレノシステインの生合成経路を検討し, シスタチオニン $\beta$ -シターゼ (EC 4. 2. 1. 22) とシスタチオニン $\gamma$ -リアーゼ (EC 4. 4. 1. 1) の共役反応によって, セレノホモシステインからセレノシスタチオニンを経由してセレノシステインが生合成されることを酵素化学的に実証した<sup>2,3)</sup>。その過程で, ラット肝臓中に, セレノシステインをアラニンと $H_2Se$ に分解する新しい酵素が存在することを見だし, セレノシステイン $\beta$ -リアーゼと命名した。本報では本酵素の哺乳動物組織中における分布やブタ肝臓の本酵素の精製法ならびにその酵素化学的諸性質について述べる。

## 方 法

### 1. 試 薬

アラニン脱水素酵素 (EC 1. 4. 1. 1) は *Bacillus sphaericus* (IFO 3525) より<sup>4)</sup> D-アミノ酸酸化酵素はブタ腎臓より<sup>5)</sup> それぞれ既法の方法に従って精製結晶化した。その他の試薬は市販特級品を使用した。

### 2. 酵素活性の測定

セレノシステイン $\beta$ -リアーゼの反応は通常, 生成する $H_2Se$ を酢酸鉛を用いて定量することにより測定した。反応液 0.5 ml は 2  $\mu$ mol の DL-セレノシステイン, 5  $\mu$ mol のジチオスライトール (DTT), 0.01  $\mu$ mol のピリドキサル 5'-リン酸 (PLP), 0.02 mg のウシ血清アルブミン, 60  $\mu$ mol のトリシン-NaOH 緩衝液 (pH 8.5) および酵素液を含む。37°C, 20 分間反応後, 5 mM 酢酸鉛の 0.1 N HCl 溶液 3.5 ml を添加し, 反応を停止した。生成する PbSe の濁度を 400 nm にて測定した (分子濁度定数 =  $2.36 \times 10^4$ )。生成するアラニンは日立 835 型高速アミノ酸分析機を用いて測定した。

### 3. ブタ肝臓セレノシステイン $\beta$ -リアーゼの精製

精製はすべて 0.01% 2-メルカプトエタノールならびに  $2 \times 10^{-5}$  M PLP を含むリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を標準緩衝液として用い, またすべての精製操作は 4°C で行った。

1) 無細胞抽出液の調製: 新鮮ブタ肝臓 6.5 kg を 2 倍容の標準緩衝液に懸濁し, ワーリングブレンダーで 2 分間破碎した。この破碎液を 10,000  $\times$  g, 1 時間遠心分離した。

2) 熱処理: 上記上澄液を 50°C, 30 分間熱処理後すばやく氷冷し, 遠心分離した。

3) 硫酸アンモニウム分画：上記上澄液に硫酸アンモニウム(25%飽和)を加え、沈澱を遠心分離で除去した。上澄液をさらに硫酸アンモニウム45%飽和にし、遠心分離後、得られた沈澱を標準緩衝液に溶解し、10,000倍量の同緩衝液に対して透析した。

4) DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー：上記酵素液を標準緩衝液であらかじめ平衡化したDEAE-セルロースカラム(9.5×60cm)にてクロマトグラフィーを行った。0.1M KClを含む上記緩衝液にて十分洗浄後、0.14M KClを含む同一緩衝液で溶出した。この区分に硫酸アンモニウム(50%飽和)を加え、沈澱を標準緩衝液に溶解し、透析した。

5) ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー：上記酵素液を標準緩衝液で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム(8×45cm)に吸着させ、この緩衝液で十分洗浄後、0.05および0.1Mの標準緩衝液で活性画分を集め、硫酸アンモニウム(50%飽和)で塩析し、沈澱を上述の方法に従って溶解し、透析した。この酵素液を再び前と同様に平衡化したハイドロキシアパタイトカラム(2.7×25cm)に吸着させ、再び同様なクロマトグラフィーを行ったのち、上記と同様に塩析後透析した。

6) セファデックスG-200カラムクロマトグラフィー：上記酵素液を標準緩衝液で平衡化したセファデックスG-200カラム(2.2×130cm)でクロマトグラフィーを行った。活性画分を集め、ダイアフローメンブランで濃縮した。

7) ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー：上記酵素液を標準緩衝液で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム(1.2×13cm)に吸着させ、0.04M標準緩衝液にて酵素を溶出した。

## 結 果

### 1. セレノシステインの酵素的分解

DL-セレノシステインをラット肝臓抽出液と共にインキュベートすると、アラニンと $H_2Se$ が生成した。 $H_2Se$ はDTNBならびに酢酸鉛で、アラニンはアミノ酸分析ならびにガスクロマトグラフ質量分析によってそれぞれ同定した。生成したアラニンはアラニン脱水素酵素とは反応するがD-アミノ酸酸化酵素とは反応しないのでL-異性体である。一方、未反応のセレノシステインはD-アミノ酸酸化酵素によってほぼ全量酸化されるのでD-異性体である。したがってラットの肝臓抽出液中にはL-セレノシステインに作用し、L-アラニンと $H_2Se$ に分解する酵素の存在が明らかになった。著者らはこの新酵素をセレノシステイン $\beta$ -リアーゼと命名した。

### 2. セレノシステイン $\beta$ -リアーゼの動物組織内分布

セレノシステイン $\beta$ -リアーゼの動物組織内分布を調べた(表1)。肝臓ならびに腎臓には

一般に高い酵素活性が見いだされたが、血液や脂肪組織には活性は存在しなかった。

Table 1. Selenocysteine  $\beta$ -lyase activity in various mammalian tissues

Tissues	Species*									
	Rat	Dog	Mouse	Guinea pig	Pig	Cat	Rabbit	Bovine	Monkey	
	Specific activity ( X 10 <sup>3</sup> )									
Liver	5.5	10	9.7	15	8.2	1.6	17	3.5	9.9	
Kidney	4.9	4.5	8.9	14	3.6	1.9	17	—	—	
Pancreas	8.0	3.0	0.21	0.34	—	—	—	—	—	
Adrenal	3.5	—	—	—	—	—	—	—	—	
Heart	0.90	0.81	—	—	—	—	—	—	—	
Lung	2.0	1.2	—	—	—	—	—	—	—	
Testis	0.83	—	—	—	—	—	—	—	—	
Brain	0.93	0.96	—	—	—	—	—	—	—	
Thymus	1.7	6.0	—	—	—	—	—	—	—	
Spleen	1.4	1.8	—	—	—	—	—	—	—	
Muscle	0.57	—	—	—	—	—	—	—	—	
Fat	0	—	—	—	—	—	—	—	—	
Blood**	0	—	—	—	—	—	—	—	—	

The enzyme activity was measured by determination of alanine formed by amino acid analysis. The tissues extracts were prepared by centrifugation of the homogenates.

\* Average values of two rats are given. For the other animals, the values were obtained from the individual.

\*\* Fresh whole blood was dialyzed against 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 7.4). After centrifugation the supernatant solution was examined.

### 3. ブタ肝臓セレノシステイン $\beta$ -リアーゼの精製

Table 2. Purification of selenocysteine  $\beta$ -lyase

Step	Total protein	Total activity	Specific activity	Yield
	mg	units	units/mg	%
1. Crude extract	651,000	13,600	0.021	100
2. Heat treatment	271,000	7,300	0.027	54
3. Ammonium sulfate fractionation	103,000	6,290	0.061	46
4. DEAE-cellulose	5,640	2,980	0.53	22
5. First hydroxyapatite	425	1,360	3.2	10
6. Second hydroxyapatite	240	1,210	5.0	9.0
7. Sephadex G-200	27.2	635	23	4.7
8. Third hydroxyapatite	7.6	278	37	2.0

ブタ肝臓より本酵素を精製した(表2)。精製酵素を用いて以下の諸酵素活性の有無を調べたが、いずれの活性も検出されなかった。シスタチオニン $\gamma$ -リアーゼ、シスタチオニン $\beta$ -シクターゼ、セリンデヒドラターゼ、システインリアーゼ、アスパラギン酸 $\beta$ -脱炭酸酵素、キヌレニナーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ。

#### 4. 精製酵素の性質

1) 酵素の純度と分子量：精製酵素は超遠心分析的、ディスク電気泳動的に均一であった。

$S_{20,w}$ は5.5 S、沈降平衡法で測定した分子量は、偏比容を0.74と仮定すると $85,000 \pm 3,000$ と算定された。セファデックスG-200ゲルろ過法で求めた分子量は93,000、SDSディスク電気泳動法で求めた分子量は48,000であることから、本酵素は分子量的に相等しいサブユニット2個より構成されると推定される。

2) 基質特異性：本酵素はL-セレノシステインに特異的に作用する( $K_m=0.83\text{mM}$ )。D-セレノシステイン、L-システイン、L-セリン、 $\beta$ -クロロ-L-アラニン、L-システインスルフィン酸、S-メチル-L-システイン、あるいはSe-エチル-DL-セレノシステインは作用しない。DTTを添加しない系で反応を行うと、DL-セレノシスチン、L-シスチン、L-セレノホモシスチンあるいはセレノシスタミンはいずれも基質とはならない。L-システインはL-セレノシステインに対して基質拮抗阻害剤として作用した( $K_i=1.0\text{mM}$ )。

3) 反応の化学量論：酵素反応が化学量論的に進行するか否かを調べた結果、 $\text{H}_2\text{Se}$ およびアラニンの生成量はともにセレノシステインの減少量に等しいことが証明された。

4) PLPの補酵素作用：本酵素の吸収スペクトルは280nmと420nmに吸収極大を有し、さらに330nm付近に吸収の肩を示した。酵素を $\text{NaBH}_4$ で還元すると酵素活性と共に420nmの吸収極大が消失した。これらの事実はPLPの4-ホルミル基と酵素タンパクのアミノ基との間に形成されているアルジミン結合が $\text{NaBH}_4$ でアルダミン結合に還元されたことを示唆する。酵素をヒドロキシルアミンと反応後、標準緩衝液に対して透析すると、420nmの吸収極大が完全に消失したアポ酵素が得られた。本アポ酵素はPLP無添加では活性は認められないが、 $2 \times 10^{-5}$  PLPを添加することにより94%以上の活性が回復した。なお、PLPに対する $K_m$ 値は $3.3 \times 10^{-7}$  Mであった。

## 考 察

セレノシステイン残基が数種のタンパクのポリペプチド鎖中に発見されて以来、セレノシステイン残基の生合成が注目を集めている。現在2つの生合成機構が提唱されている<sup>1)</sup>すなわち、

前駆体タンパク質中の特定のアミノ酸残基が修飾を受けてセレノシステイン残基に転換される場合と、遊離のセレノシステインが翻訳の段階で直接タンパク質に取り込まれる場合である。しかし生体内にはセレノシステイン $\beta$ -リアーゼが広く分布しているので、遊離のセレノシステインの取り込みを証明するためには本酵素活性をあらかじめ除去しておくなど特別の配慮が必要であろう。

生体内では、セレノシステインはセレノメチオニンから合成されると考えられる<sup>1,2)</sup>。生成したセレノシステインが直接、セレンタンパクに取り込まれるのであれば、セレノシステイン $\beta$ -リアーゼは過剰のセレノシステインの分解解毒に寄与していると考えられる。一方、前駆体タンパクの翻訳後の修飾によってセレンタンパクが合成されるのであれば、セレノシステイン $\beta$ -リアーゼは真のSe前駆体の生合成に寄与していると考えられることができる。

含硫アミノ酸代謝に関与する多くの酵素がセレンアナログにも作用する<sup>1)</sup>。セレンと硫黄を識別しない反応はおそらくセレン毒性と関連しているであろう。システインにまったく作用しないセレノシステイン $\beta$ -リアーゼはこの点できわめてユニークな酵素といえる。

セレノシステイン $\beta$ -リアーゼの反応はPLP酵素の触媒する反応の中ではやや例外的なものである。 $\beta$ 位に脱離基をもつアラニン誘導体からアラニンが生成するという点では細菌のアスパラギン酸 $\beta$ -脱炭酸酵素に類似する<sup>6)</sup>。セレン原子がどのようにして脱離するかは極めて興味深い問題であり、現在反応機構を解明すべく検討している。

ここで述べた研究は、われわれが先に報告した内容<sup>7)</sup>を中心にまとめたものである。

## 文 献

- 1) SUNDE, R. A. (1984) JAOCS 61:1891
- 2) ESAKI, N., T. NAKAMURA, H. TANAKA, T. SUZUKI, Y. MORINO and K. SODA (1980) Biochemistry 20:4492
- 3) 左右田健次, 中村武史, 江崎信芳, 田中英彦 (1984) 微量栄養素研究 1:105
- 4) OHSHIMA, T. and K. SODA (1979) Eur. J. Biochem. 100:29
- 5) JENKINS, W. T., A. BEHLEN and P. I. ROGERS (1979) Anal. Biochem. 94:105
- 6) TATE, S. S. and A. MEISTER (1969) Biochemistry 8:1660
- 7) ESAKI, N., T. NAKAMURA, H. TANAKA and K. SODA (1982) J. Biol. Chem. 257:4386