

セレノシステインリアーゼ活性を持つ大腸菌 NifS ホモログの構造と機能

江崎 信 芳¹⁾, 三原 久 明¹⁾, 栗原 達 夫¹⁾, 吉村 徹¹⁾, 左右田 健 次²⁾
 (¹⁾ 京都大学・化学研究所*, ²⁾ 関西大学・工学部**)

Structure and function of *Escherichia coli* NifS homologs with selenocysteine lyase activity

Nobuyoshi ESAKI¹⁾, Hisaaki MIHARA¹⁾, Tatsuo KURIHARA¹⁾, Tohru YOSHIMURA¹⁾, and Kenji SODA²⁾

¹⁾ Institute for Chemical Research, Kyoto University, ²⁾ Faculty of Engineering, Kansai University

We have purified and characterized three NifS homologs from *Escherichia coli*, CSD, CsdB, and IscS, which appear to be involved in iron-sulfur cluster formation and/or biosynthesis of selenophosphate. All of them catalyze eliminations of Se and S from L-selenocysteine and L-cysteine, respectively, to form L-alanine. We substituted Ala for each of Cys358 of CSD, Cys364 of CsdB, and Cys328 of IscS, which correspond to catalytically essential Cys325 of *Azotobacter vinelandii* NifS. The enzyme activity toward L-cysteine was almost completely abolished by the mutations, whereas the activity toward L-selenocysteine was much less affected. This indicates that the reaction mechanism of L-cysteine desulfurization is different from that of the decomposition of L-selenocysteine and that the conserved cysteine residues play a critical role only for L-cysteine desulfurization.

セレンと硫黄は化学的性質が類似しており、セレン代謝においては、含硫化合物と含セレン化合物を区別して認識するセレン特異的な酵素が重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、含セレン化合物に作用する酵素のほとんどは、その硫黄アナログにも作用することが知られている¹⁾。

セレノシステインリアーゼはピリドキサルリン酸 (PLP) を補酵素とし、L-セレノシステインをL-アラニンとセレンに分解する反応を触媒する²⁾。この酵素はセレン化合物に特異的に作用し、セレン代謝に関与すると考えられている。一方、システインデスルフラーゼは同様な反応を触媒するが、L-セレノシステインとL-システインの両方に作用してL-アラニンを生成する³⁾。システインデスルフラーゼ

*所在地：宇治市五ヶ庄 (〒611-0011)

**所在地：吹田市山手町3-3-35 (〒564-8086)

は、ニトロゲナーゼの鉄-硫黄クラスター形成に際して、硫黄を供給する因子 (*nifS* 遺伝子産物, NifS) として窒素固定細菌から単離された⁴⁾。*nifS* 相同遺伝子は哺乳類・酵母・細菌に広く見いだされており、システインデスルフラゼ相同酵素が広く生物界において鉄-硫黄クラスターの形成・修復に寄与していると推論されている⁵⁾。

大腸菌には3種の *nifS* 相同遺伝子 (*csdA*, *csdB*, *iscS*) が存在する。セレノシステインリアーゼとシステインデスルフラゼの1次構造は類似していることから、これら遺伝子は、それぞれ機能の異なる酵素をコードしている可能性が考えられた。本研究では、これら3つの遺伝子をPCRによりクローン化して高発現させ、酵素を均一状態に精製してその酵素化学的性質を調べた。

実験方法

大腸菌 K-12 株のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、*csdA*, *csdB*, *iscS* のオープンリーディングフレームを含む DNA 断片を得た。これらの遺伝子断片をプラスミド pUC118 または pET21a (+) のマルチクロニングサイトに挿入し、それぞれの遺伝子高発現系を構築した。各遺伝子産物 (CSD, CsdB, IscS と命名) は硫安分画と各種カラムクロマトグラフィーにより SDS-ポリアクリルアミド電気泳動上で均一状態に精製した。酵素活性は L-セレノシステインから生成するセレン化水素を酢酸鉛で定量し測定した²⁾。標準反応液は 5mM L-セレノシステイン, 50mM ジチオスレイトール, 0.02mM PLP, 120mM トリシン緩衝液 (pH7.5) 及び酵素を含んでいる。システイン残基をアラニンで置換した変異酵素は部位特異的変異法により調製した。

結 果

3種の酵素 (CSD, CsdB, IscS) はいずれも L-セレノシステイン, L-システイン, L-システインスルフィン酸に作用して L-アラニンを生産する反応を触媒するピリドキサル酵素であったが、各基質に対する特異性やキネティクスの点では異なる特徴を示した (Table. 1)。CSD はセレノシステインとシステインスルフィン酸を良い基質とし、システインにも3酵素中で最も高い活性を有し、また、セレノシステイン濃度変化に対して非ミカエリス-メンテン型の挙動を示した。CsdB はセレノシステインに対する特異性が高く、大腸菌のセレノシステインリアーゼに相当すると考えられた。IscS はシステインスルフィン酸に対する活性が3酵素のうち最も低かった。

Table 1. Kinetic constants of three NifS homologs from *E. coli*

Substrate ^a	CSD		CsdB		IscS	
	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m
	units/mg	mM	units/mg	mM	units/mg	mM
SeCys	6.2 ^b	ND ^c	8.3	6.4	3.1	0.35
CSA	6.0	7.6	3.8	39	0.80	26
Cys	0.95	0.40	0.015	0.63	0.54	0.93

^a SeCys, L-selenocysteine; CSA, L-cysteine sulfinate; Cys, L-cysteine

^b Value measured at a substrate concentration of 12 mM.

^c Not determined because hyperbolic curve was not apparent within the concentration range tested.

NifSが触媒するL-システインの分解反応 (Fig. 1) において、活性中心のシステイン残基Cys325が基質-PLP反応中間体のC4' にプロトンを渡すことでアニオン化され、続いて、基質システインのスルフィドリル基を求核攻撃し、酵素結合型ペルスルフィドを形成する反応機構が提唱されている³⁾。大腸菌の3酵素を含むNifSファミリー酵素において、このシステイン残基は保存されている。各酵素で保存されているシステイン残基 (CSD : Cys358, CsdB : Cys364, IscS : Cys328) をアラニン残基で置換した変異酵素を各々作成して活性を比較したところ、いずれにおいても、L-システインに対する活性はほぼ失われたが、L-セレノシステインに対する活性は45%以上保持されていることが見いだされた (Fig. 2)。このことから、保存されているシステイン残基はシステインを基質とする場合には触媒残基として重要であるが、セレノシステインが基質の場合は必須ではないことが明らかになった。

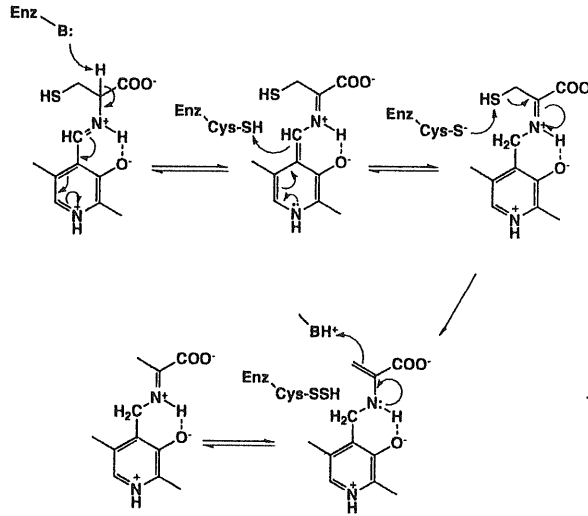


Fig. 1 Proposed reaction mechanism of desulfurization of L-cysteine catalyzed by *A. vinelandii* NifS³⁾.

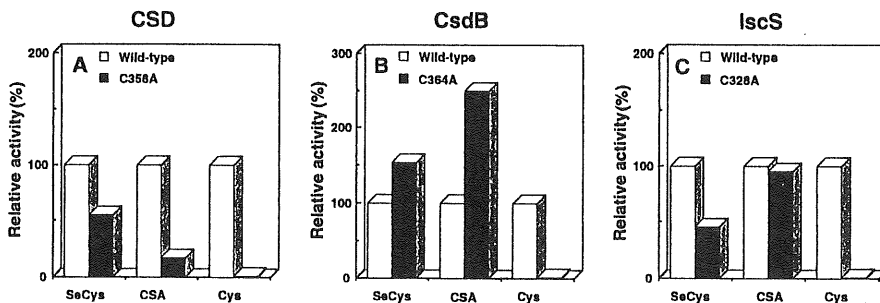


Fig. 2 Activities of the wild-type and Cys → Ala mutant CSD (A), CsdB (B) and IscS (C). The specific activities were determined in a reaction mixture containing 12 mM L-selenocysteine (SeCys), 90 mM L-cysteine sulfinate (CSA) or 60 mM L-cysteine (Cys) as a substrate. The specific activity of the wild-type enzyme with each substrate is set at 100%. Wild-type and mutant enzyme activities are shown in white and black bars, respectively.

考 察

大腸菌の3つのNifSホモログはそれぞれ異なる基質特異性を示し、細胞内でどのような働きをしているか興味深い、生理的な役割についてはこれからの研究課題である。

保存されているシステイン残基はL-システインの分解反応にのみ必須であることが示された。すなわち、少なくとも、調べた変異酵素においては、基質がシステインの場合とセレノシステインの場合で、反応機構が異なると考えられる。Fig. 3に、活性システイン残基が関与しないセレノシステイン分解反応の推定作用機構を示す。セレノシステインのセレノヒドリル基 (pK_a は5.2) は反応液中 (pH7.5) で脱プロトン化されており、セレンは中間体IIIから自発的に遊離しやすい。システインスルフィン酸の分解もFig. 3と同様な機構で進むであろう。しかし、システインのスルフヒドリル基 (pK_a は8.5) は同条件下でプロトン化されており、酵素の活性システイン残基による求核攻撃を受けなければ、硫黄の脱離が困難であると考えられる (Fig. 1)。

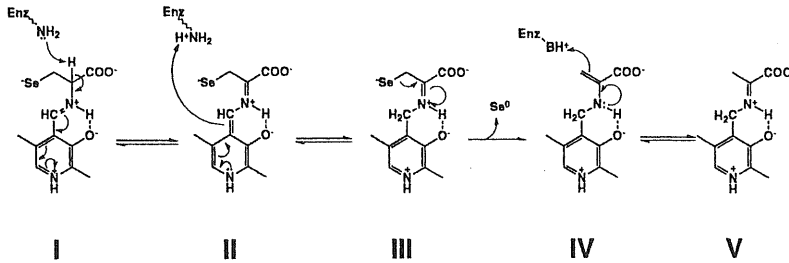


Fig. 3 Proposed reaction mechanism for the selenocysteine lyase reaction catalyzed by CSD, CsdB, and IscS.

文 献

- 1) Stadtman, T. C. (1974) *Science* 183 : 915
- 2) Esaki, N., Nakamura, T., Tanaka, H., and Soda, K. (1982) *J. Biol. Chem.* 257 : 4386
- 3) Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., and Dean, D. R. (1993) *Biochemistry* 33 : 4714
- 4) Jacobson, M. R., Cash, V. L., Weiss, M. C., Laird, N. F., Newton, W. E., and Dean, D. R. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 219 : 49
- 5) Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H., and Dean, D. R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273 : 13264