

哺乳類におけるセレノシステイン合成

左右田健次・中村武史・江崎信芳・田中英彦
(京都大学化学研究所微生物化学研究部門*)

Selenocysteine synthesis in mammals

Kenji SODA, Takeshi NAKAMURA,
Nobuyoshi ESAKI and Hidehiko TANAKA
Institute for Chemical Research, Kyoto University

We studied enzymatic synthesis of selenocysteine (SeCys) in rat liver. When selenohomocysteine (SeHcys) and serine (Ser) were incubated with cystathionine (Cysta) β -synthase, which functions in transsulfurylation pathway, a new amino acid was formed and identified as selenocystathionine (SeCysta). SeHcys acted as an efficient *Se*-substituent donor in the β -replacement reaction; V_{max} ratio to the sulfur counterpart was about 70%. Cysta γ -lyase, which also acts in the transsulfurylation pathway, catalyzed α , γ -elimination of SeCysta to yield SeCys, α -ketobutyrate and NH_3 . The elimination rate was about 3 times higher than that of Cysta. Cysta β -synthase, however, did not catalyze direct formation of SeCys from Ser and H_2Se . Thus, SeCys is synthesized from SeHcys and Ser through SeCysta by coupling of Cysta β -synthase and Cysta γ -lyase reactions. We confirmed this synthetic pathway also with a mixture of both enzymes purified from rat liver, and with a rat liver homogenate. However, the amount of SeCys formed in the homogenate system was exceedingly lower than the value expected from the enzyme activities.

*所在地：京都府宇治市五ヶ庄(〒611)

硫黄と同様に同期律表でⅡb族に属するセレンは、従来その毒性のみが強調されてきたが、近年、動物ならびに微生物にとって必須な微量元素として認識されるに至り、その生理作用が注目を浴びるようになってきた。最近、セレンを必須成分とする酵素が相次いで発見され、中でも次に示す4種の酵素 *Clostridium sticklandii* の glycine reductase¹⁾, *Methanococcus vannielii* の formate dehydrogenase²⁾ や hydrogenase³⁾, ラット肝臓ならびにウシ赤血球の glutathione peroxidase^{4,5)} は、いずれもポリペプチド鎖中に selenocysteine 残基を含有することが実証され、セレンの必須性が少なくとも部分的に説明できるようになった。一方、植物界にも、主に遊離型で種々の含セレンアミノ酸が存在することが知られている⁶⁾。現在までに明らかにされたこれらの含セレンアミノ酸は、いずれも周知の含硫アミノ酸のアナログであることから、その代謝には含硫アミノ酸の代謝と同一系がはたらくものと考えられている。従って、哺乳動物における selenocysteine (SeCys) の生合成経路として図1に示すような経路が想定されるが、ほとんど実証されていない。本研究ではラット肝臓の酵素を用いて、次の2つの経路について SeCys 合成の可能性を検討した。

- (I) L-Serine (Ser) と L-selenohomocysteine (SeHcys) から L-selenocystathionine (SeCysta) を経由して SeCys へ至る経路。
- (II) L-Ser とセレン化水素 (H_2Se) から直接 SeCys を合成する経路。

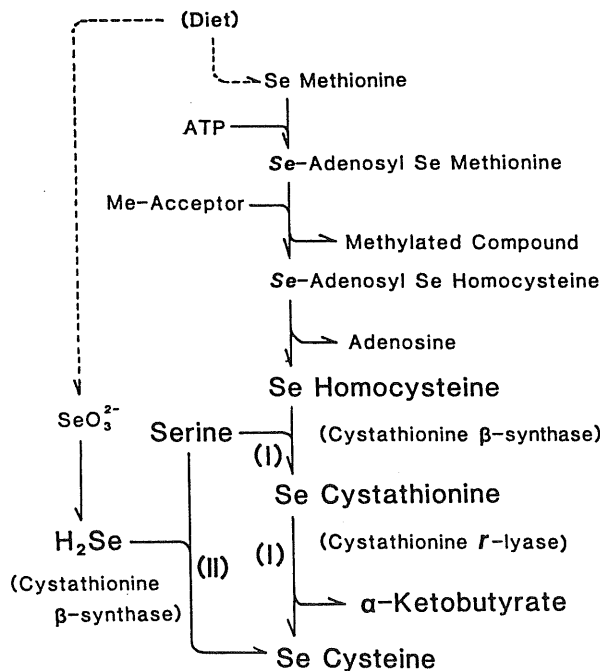


Fig. 1. Possible biosynthetic pathways of selenocysteine

方 法

酵素: Cysta β - synthase と Cysta r - lyase は Wistar 系ラット肝臓より各々 50 倍ならびに均一に精製した。タンパクは Lowry 法⁷⁾により定量した。

Cysta β - synthase 反応: 標準反応液 1ml は, 15mM L-Ser, 15mM L-homocysteine (Hcys), 10^{-5} M pyridoxal 5'-phosphate (PLP), 0.5mM CuSO₄, 100mM Tricine- NaOH 緩衝液 (pH 8.6) および酵素を含む。反応速度論の研究においては, 基質として 0.4~2.4 mM L-Ser のほか 0.5~5mM の L-Hcys あるいは L-SeHcys を用い, さらに 12mM DTT を添加した。N₂ 置換した試験管中で 37°C で反応を行い, 生成した cystathionine (Cysta) や SeCysta をアミノ酸分析により定量した。

Cysta r - lyase 反応: 反応液 0.5ml は 1~5mM L-Cysta または L-SeCysta, 10^{-5} M PLP, 100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5), および酵素を含む。37°C で反応を行い, 生成した α -ケト酸を Soda の方法⁸⁾に従い 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone (MBTH)を用いて定量した。

本酵素反応による α , r -脱離反応生成物と, α , β -脱離反応生成物を分別定量する際には以下の操作を行った。すなわち, 生成したアミノ酸は DTT を添加して disulfide あるいは diselenide 結合を還元した後, methyl iodide または ethyl iodide でアルキル化し, アミノ酸分析を行った。誘導体化は, 各ピークの分離改善や Ninhydrin 発色率の向上のために必要であった。一方, 生成した α -ケト酸は leucine dehydrogenase⁹⁾ や alanine dehydrogenase¹⁰⁾ を用いて対応するアミノ酸に変換した後, アミノ酸分析により定量した。

Serine sulfhydrylase 活性: 本反応は, 前述の Cysta β - synthase の副反応として知られている。反応液 1ml は 20mM L-Ser, 20mM Na₂S, 10^{-5} M PLP, 150mM Tricine-NaOH 緩衝液 (pH 8.6), および Cysta β - synthase を含む。N₂ 置換した試験管中で 37°C で反応させ, 生成した cysteine (Cys) を Gaitonde の酸性 Ninhydrin 法¹¹⁾で定量した。SeCys の生成を調べる際には, Na₂S の代わりに H₂Se 溶液を用いて反応を行い, 反応液をアミノ酸分析に供した。

結 果 と 考 察

1. Cysta β - synthase による SeCysta の合成

L-Ser と L-SeHcys から, SeCysta が Cysta の合成の約 70% の反応速度で合成された (表 1)。SeHcys に対する K_m 値は, Hcys に対する K_m 値と近似する。過剰の L-Ser 存在下での SeCysta 合成反応において, L-Hcys は L-SeHcys に対し拮抗阻害剤として作用し, 逆

Table 1. Kinetic parameters for cystathionine β -synthase

Km (mM)	Selenocystathionine synthesis		Cystathionine synthesis	
	Serine	Selenohomocysteine	Serine	Homocysteine
	0.3	2.5	1.2	1.2
Vmax (μ mol/mg/min)	0.11 (69%)		0.19 (100%)	

に L-SeHcys は Cysta 合成反応において、同様に L-Hcys に対し拮抗阻害剤として作用した。さらに L-SeHcys と L-Hcys に対する見掛けの K_i 値が各々 3.4mM と 0.85mM と求められ、表1に示した K_m 値に近似することから、これら2つの反応は本酵素の同一の活性部位で触媒されているものと思われる。

2. Cysta γ -lyase による SeCysta の脱離反応

“方法”の項で示した操作に従ってアミノ酸分析を行った結果、4種のアミノ酸：Se-ethyl SeCys, α -aminobutyrate, Se-ethyl SeHcys および alanine が同定された。したがって、本酵素は SeCysta を α , γ -脱離反応によって SeCys, α -ketobutyrate NH_3 に分解する以外に、 α , β -脱離反応によって SeHcys, pyruvate, NH_3 に分解することが明らかになった。 α , β -脱離反応は、 α , γ -脱離反応の約50%の速度で進行する。一方、L-Cysta の α , β -脱離反応は、 α , γ -脱離反応の3%の速度でしか進行しない。また、SeCysta の α , γ -脱離反応は、Cysta の α , γ -脱離反応よりも3倍以上早い速度で進行することが認められた(表2)。

Table 2. Kinetic parameters for cystathionine γ -lyase

Substrate	Type of elimination	Km (mM)	Vmax (μ mol/mg/min)
L-Selenocystathionine	α , γ	1.7	19
	α , β	—	9.5
L-Cystathionine	α , γ	1.3	6.2
	α , β	—	0.18

3. 両酵素の共役系による SeCys の生成

以上の結果から推察して、SeCys は L-SeHcys と L-Ser から両酵素の共役反応により Se-Cysta を経て合成されることが予想される。両精製酵素ならびにほぼ等しい活性を持つラット

肝臓抽出液の両系を用い、L-SeHcys と L-Ser からの SeCys の合成を検討した。その結果、両系において SeCys の生成を認めた。しかし、その生成量は、肝臓抽出液の系では極端に少なく (1/10 以下)、ラット肝臓抽出液中には生成した SeCys を分解する活性の存在が示唆された。

4. Ser sulfhydrylase 活性による SeCys の生成

L-Ser と H_2S からの Cys 生成活性を Cysta β -synthase を用いて調べた結果、ニワトリ肝臓の酵素で見い出されたように¹²⁾、本来の Cysta 生成反応の V_{max} の 12% の速度で反応が行うことが観察された。しかし、 H_2S の代わりに H_2Se を用い、L-Ser と反応させると、SeCys の生成は全く認められなかった。

文 献

1. CONE, J. E., R. MARTIN DER RIO, J. N. DAVIS and T. C. STADTMAN (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73:2659
2. JONES, J. B., G. L. DILWORTH and T. C. STADTMAN (1979) Arch. Biochem. Biophys. 195:255
3. YAMAZAKI, S. (1982) J. Biol. Chem. 257: 7926
4. FORSTROM, J. W., J. J. ZAKOWSKI and A. L. TAPPEL (1978) Biochemistry 17:2639
5. LANDENSTEIN, R., O. EPP, K. BARTELS, A. JONES, R. HUBER and A. WENDEL (1979) J. Mol. Biol. 134:199
6. NATIONAL RESEARCH COUNCIL 編, 桜井治彦, 土屋健三郎訳 (1978) 環境汚染物質の生体への影響, セレン, 東京化学同人, 東京
7. O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL (1951) J. Biol. Chem. 193:265
8. SODA, K. (1967) Agric. Biol. Chem. 31:1054
9. OHSHIMA, T., H. MISONO and K. SODA (1978) J. Biol. Chem. 253:5719
10. OHSHIMA, T. and K. SODA (1979) Eur. J. Biochem. 100:29
11. GAITONDE, M. K. (1967) Biochem. J. 104:627
12. BROWNSTEIN, A. E., E. V. GORYACHENKOVA, E. A. TOLOSA, I. H. WILLHARDT and L. L. YEFREMOVA, (1971) Biochim. Biophys. Acta 242:247