

細菌のセレノシステイン代謝に関与する酵素

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

An Enzyme Participating in Bacterial Selenocysteine Metabolism

Patrick CHOCAT, Takeshi NAKAMURA, Nobuyoshi ESAKI,
Hidehiko TANAKA AND Kenji SODA
Institute for Chemical Research, Kyoto University

We have found the presence of a new enzyme in various mammalian tissues, that cleaves specifically L-selenocysteine into L-alanine and H_2Se and named it selenocystein β -lyase (Esaki, N. *et al.* (1982) J. Biol. Chem. 257:4386). In this paper, the distribution of the enzyme in microorganisms and some properties of the bacterial enzyme are described. The enzyme occurs widely in aerobic bacteria such as *A. viscolactis*. However, no significant activity is detected in yeasts and fungi. Like the pig liver enzyme, the enzyme from *A. viscolactis* acts specifically on L-selenocysteine (K_m : 0.8mM), requires pyridoxal 5'-phosphate as a cofactor (K_m : 5 μ M) and is competitively inhibited by L-cysteine (K_i : 0.2mM).

セレンは周期律表で VIb 族に属し、その化学的性質が同族の硫黄に類似すると共に、非金属性と金属性を併せもつ点でユニークな元素である。近年、哺乳類や鳥類、ある種の微生物に必須な微量元素であることが証明されるに至り、生理的な重要性が認識されるようになった。最近、いくつかのセレン依存型酵素のタンパクのポリペプチド鎖中に selenocysteine (SeCys) 残基が同定され¹⁾、セレンの必須性に関するひとつの説明がなされている。しかし、これら酵素へのセレンの取り込みに関する機構は現在のところ不明である。

* 所在地：京都府宇治市五ヶ庄 (〒611)

筆者らは最近、ラット肝臓における SeCys の合成経路を研究する過程で²⁾、L-SeCys を特異的に分解し、L-alanine とセレン化水素 (H_2Se) を生ずる反応を触媒する新しい pyridoxal 5'-phosphate (PLP) 酵素を見出し、selenocysteine β -lyase と命名した³⁾。本酵素は、含セレン化合物に特異的にはたらく酵素として報告された最初の例である。Selenocysteine β -lyase は各種の哺乳動物の組織中に広く分布しており、筆者らはこれまでにブタ肝臓の酵素を均一に精製し、その酵素化学的諸性質を明らかにしてきた³⁾。

本研究は、微生物における本酵素の分布ならびに、そのいくつかの性質を解明することを目的とした。

方 法

Selenocysteine β -lyase 活性は当研究室の保存株の中から任意に選択した細菌 74 株、酵母 33 株、カビ 23 株の無細胞抽出液を用いて測定された。これら菌株の培地組成は細菌用 (pH 7.2) : 1.5 % polypeptone, 0.1 % glycerin, 0.1 % KH_2PO_4 , 0.1 % K_2HPO_4 , 0.025 % 酵母エキスを、0.01 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 % 肉エキス, 0.5 % NaCl; 酵母用 : 10 % 麦芽エキス ; カビ用 (pH 6.0) : 2 % 麦芽エキス, 2 % glucose, 0.1 % polypeptone であり、各々の菌株は 24°C で 16 時間振盪培養された。遠心分離で集めた菌体は 0.85 % 食塩水で 2 回洗浄後、20 μM PLP と 0.01 % 2-mercaptoethanol を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に懸濁した。細菌の菌体は、0–4°C で 5 分間、超音波処理し、酵母とカビの菌体は、酸化アルミニウム粉末と海砂を加え、冷却した乳鉢中で十分磨砕した。遠心分離後の無細胞抽出液は、上記緩衝液 (pH 7.4) に透析した後、5–20 mg/ml のタンパク濃度に調整し、実験に用いた。

Selenocysteine β -lyase 反応は、生成する H_2Se またはアラニンを前報に述べたように定量することにより測定した³⁾。反応液 (0.5 ml) は、DL-selenocystine 0.8 μmol , dithiothreitol 4 μmol , PLP 0.01 μmol , ウシ血清アルブミン 0.04 mg, Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 40 μmol , および酵素を含む。

酵素活性の単位 (unit) は、1 分間の反応で生成する H_2Se または alanine の μmol 数で示し、酵素の比活性はタンパク 1 mg あたりの単位数で表した。タンパクは Lowry 法で定量した⁴⁾。反応液中の pyruvate の量は、lactate dehydrogenase を用いる方法により測定した。

結 果 と 考 察

1. Selenocysteine β -lyase の微生物における分布

菌体の無細胞抽出液を用いて本酵素活性の微生物における分布を検討した。表 1 に示すよう

Table 1. Distribution of Selenocysteine β -Lyase Activity in Microorganisms

Microorganisms	H ₂ Se formed (nmol/min per mg of protein) (A)	Alanine formed (nmol/min per mg of protein) (B)	A/B
Bacteria			
<i>Alcaligenes viscolactis</i> ICR 0820	32.0	28.5	0.89
<i>Brevibacterium leucinophagum</i> ICR 4070	22.5	28.3	1.25
<i>Citrobacter freundii</i> ICR 0070	17.5	20.5	1.17
<i>Pseudomonas alkanolytica</i> ICR 3350	16.7	17.9	1.07
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> ICR 2210	15.0	19.5	1.30
<i>Alcaligenes bookeri</i> ICR 0830	5.40	5.24	0.97
<i>Erwinia carotovora</i> ICR 0410	2.80	2.10	0.75
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3046	2.70	1.54	0.57
<i>Escherichia coli</i> IFO 3301	1.90	1.31	0.69
Fungi			
<i>Aspergillus ficuum</i> IFO 4318	3.80	1.33	0.35
<i>Absidia corymbifera</i> IFO 4009	1.40	0.94	0.67
<i>Penicillium expansum</i> IFO 5854	1.00	0.48	0.48
<i>Aspergillus sojae</i> IFO 4386	0.70	0.00	0.00
<i>Neurospora crassa</i> IFO 6067	0.56	0.26	0.46
Yeasts			
<i>Candida albicans</i> ICR 4597	8.10	1.13	0.14
<i>Kluyveromyces fragilis</i> IFO 0288	5.60	2.52	0.45
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> IFO 0371	2.90	1.62	0.56
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ICR 4104	2.60	1.30	0.50
<i>Hansenula beckii</i> IFO 0803	0.70	0.55	0.78

に各種の微生物に SeCys からの H₂Se 生成活性が認められた。一般的にその生成活性は細菌の方が酵母やカビよりも高い傾向を示した。SeCys のセレノール基は良好な脱離基であることから、基質アミノ酸の α , β -脱離反応を触媒する他の PLP 酵素でも SeCys に作用して H₂Se, pyruvate と NH₃ を生成する可能性が考えられる。そこで、高い H₂Se 生成活性をもつ微生物について SeCys からの alanine 生成能を調べた。その結果、細菌では SeCys からの H₂Se と alanine の生成量はほぼ等しいことが判明した。中でも *Alcaligenes viscolactis*, *Pseudomonas alkanolytica* などの高活性菌株の比活性はブタ肝臓のホモジネート中の比活性に匹敵する³⁾。両株の粗酵素液を用いて SeCys の α , β -脱離反応を検討した結果、pyruvate の生成量は lyase 反応による alanine 生成量の 3% 以下であった。したがって、SeCys から生成した pyruvate と SeCys 間のアミノ基転移反応による alanine の生成は無視しうるものと思われる。それゆえ、これらの細菌中には selenocysteine β -lyase が存在すると結論された。

一方、 H_2Se 生成活性を有する酵母とカビでは、細菌と比較してその活性が弱いだけでなく、いずれも alanine の生成量は H_2Se の約 50 % 以下であった。したがって、酵母とカビにおいては selenocysteine β -lyase 活性は非常に微弱か欠除しているものと思われる。

2. PLP の補酵素作用

A. viscolactis の酵素を 10mM NH_2OH と処理後、0.01 % 2-mercaptoethanol を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に透析すると、本酵素活性は最初の 9 % に低下した。しかし 20 μ M PLP の添加で活性は完全に回復した。PLP に対する K_m 値は 5 μ M と算定された。一方、酵素を $NaBH_4$ で還元すると酵素活性は完全に消失し、PLP の添加効果は全くみられなかった。したがって細菌の selenocysteine β -lyase も動物酵素と同様に補酵素として PLP を要求することが明らかになった³⁾。

3. 基質特異性

A. viscolactis の酵素は、表 2 に示すように種々のアミノ酸の中で L-SeCys のみに特異的

Table 2. Substrate and Inhibitors of the Selenocysteine β -Lyase of *A. viscolactis*

Substrate	: L-Selenocysteine	K_m : 0.8mM
Competitive inhibitors	: L-Cysteine	K_i : 0.2mM
	S-Methyl-L-cysteine	K_i : 1.5mM
	Cysteamine	K_i : 7 mM
Inert: D-Cysteine, DL-Serine, L-Cysteic acid, D-Selenocysteine, DL-Selenocysteine, Se-Ethyl-DL-selenocysteine, Selenocysteamine, L-Kynurenine, L-Aspartate, DL-Homocysteine, DL-Methionine, DL-Homoserine, DL-Selenohomocysteine.		

に作用した。本酵素の L-SeCys に対する K_m 値は約 0.8mM と算出され、ブタ肝臓の酵素の値 (0.83mM) とよく類似していた³⁾。基質とはなり得なかった L-cysteine, S-methyl-L-cysteine あるいは cysteamine は本酵素反応において L-SeCys に対する拮抗阻害剤としてはたらいだ。 K_i 値はそれぞれ 0.2, 1.5, 7mM であった。

4. 酵素の細胞内分布

A. viscolactis の菌体を用いて Kaback の方法⁵⁾ に従い膜画分を調製し、本酵素の細胞内分布を調べた。その結果、可溶性画分では 0.02 unit/mg タンパクの酵素活性が認められるのに対し、膜画分では 0.001 unit/mg タンパクの活性しか見い出されなかった。それゆえ、本酵素は細胞質中に存在することが示唆された。

5. 培地中への含硫、含セレン化合物の添加効果

硫黄をほとんど含まない基本培地 (表 3 脚注) を設定し、各種の含硫、含セレン化合物添加培地に生育させた *A. viscolactis* の本酵素活性を測定した (表 3)。いずれの培地においても

Table 3. Effect of Sulfur and Selenium Compounds Added in the Basal Growth Medium on *A. viscolactis* Enzyme Activity

S Source		Se Source		Sp. Act. (mu/mg)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 mM	--		23.2
"	"	Na ₂ SeO ₄	0.75μM	25
"	"	DL-Selenocystine	0.75μM	11
L-Cystine	0.1 mM	--		19.6
"	"	Na ₂ SeO ₄	0.75μM	25.4
"	"	DL-Selenocystine	0.75μM	16
L-Methionine	0.1 mM	--		26
"	"	Na ₂ SeO ₄	0.75μM	22.8

The basal medium (pH 7.8) containing 0.1% asparagine, 1% glucose, 0.1% K₂HPO₄, 0.01% yeast extract, and 0.1% metal solution was supplemented with the indicated concentrations of sulfur and selenium compounds. The cultures were grown at 24°C for 16 hrs under aeration. The activity of the dialyzed crude enzyme was determined as described in the text.

比活性にほとんど差が見られないことから、本酵素は含セレン化合物によって影響を受けない構成酵素である可能性が示唆された。

文 献

1. STADTMAN, T. C. (1980) Ann. Rev. Biochem. **49**:93
2. ESAKI, N., T. NAKAMURA, H. TANAKA, T. SUZUKI, Y. MORINO and K. SODA (1981) Biochemistry **20**:4492
3. ESAKI, N., T. NAKAMURA, H. TANAKA and K. SODA (1982) J. Biol. Chem. **257**:4386
4. LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, (1951) J. Biol. Chem. **193**:265
5. KABACK, H. R. (1971) Methods Enzymol. **22**:99