

Selenocysteine β -lyase の触媒機構

江崎 信芳・中村 武史・Patrick Chocat・

嘉来 宣之・田中 英彦・左右田健次

(京都大学化学研究所微生物化学部門*)

Selenocysteine β -lyase: Reaction and Regulation Mechanisms

Nobuyoshi ESAKI, Takeshi NAKAMURA, Patrick CHOCAT,

Nobuyuki KARAI, Hidehiko TANAKA and Kenji SODA

Institute for Chemical Research, Kyoto University

We have found that elemental selenium is released enzymatically from selenocysteine. The deuterium isotope effect at the α position is about 2.4. This indicates that the α hydrogen of selenocysteine is removed by a base at the active site. When the enzyme is incubated with L-selenocysteine in the absence of added pyridoxal 5'-phosphate, the activity decreases with prolonged incubation time. However, the activity is recovered by addition of pyridoxal 5'-phosphate. The spectrophotometric studies show that the inactivated enzyme is the apo form. The apo enzyme is activated by a combination of pyridoxamine 5'-phosphate and various α -keto acids. This regulatory mechanism is analogous to those of aspartate β -decarboxylase, arginine racemase, and kynureninase.

Selenocysteine β -lyase は、L-selenocysteine のみに作用し、 H_2Se と L-alanine に分解する反応を触媒するユニークな pyridoxal 酵素である。われわれは本酵素を哺乳動物組織や細菌中に見出し、ブタ肝臓より本酵素を均一状態に精製すると共に、その物理化学的並びに酵

*所在地：京都府宇治市五ヶ庄(〒611)

素化学的諸性質を明らかにした^{1,2)}。本酵素は含セレン化合物に特異的に作用する酵素の最初の例であり, cysteineは本酵素の基質にならず, selenocysteine と拮抗的に本酵素反応を阻害する。Selenocysteine β -lyaseが cysteine と selenocysteine を識別するのは, 両者の物理化学的性質の差に由来すると考えることができる。われわれは先に本酵素の反応機構として次の二つの可能性を提示した¹⁾。すなわち, 元素状 selenium が selenocysteine から酵素的に脱離し, その後反応液中に存在する selenocysteine や dithiothreitol 等の還元剤によって非酵素的に H_2Se に還元される可能性と, alanine と H_2Se が共に酵素的に生成する可能性である。後者の場合には selenocysteine は基質であると同時に, 酵素反応に必要な還元剤として作用している。われわれが検討した結果, selenocysteine β -lyase 反応は前者の機構で進行することが明らかになった。本報はその実験的根拠を詳述したものである。

方 法

Selenocysteine β -lyase は前報の方法に従いブタ肝臓より均一状態に精製した¹⁾。アポ酵素は次に述べるように酵素 (0.05 mg/ml) を phenylhydrazine で処理することにより調製した。すなわち, 酵素を potassium phosphate 緩衝液 (0.5 M; pH 8.0) 中にて phenylhydrazine (12 mM) と共に 37°C にて 20 分間インキュベートした後, 0.01 M potassium phosphate 緩衝液 (pH 7.2) で平衡化した Sephadex G-25 カラム (0.7 × 25 cm) を用いてカラムクロマトグラフィーを行った。DL-selenocystine は Sigma 社より購入し, 水より再結晶化した。L-selenocystine は Klayman と Griffin の方法³⁾に従い, Sigma 社より購入した β -chloro-L-alanine と元素状 selenium より合成した。DL- $[\alpha-^2\text{H}]$ -selenocystine は DL- $[\alpha-^2\text{H}]$ -serine より合成した $[\alpha-^2\text{H}]$ - β -chloroalanine を用いて同様の方法で調製した。DL- $[\alpha-^2\text{H}]$ -serine は L-serine を重水中で *Pseudomonas putida* の amino acid racemase と共にインキュベートし調製した。本酵素が重水中でアミノ酸の α 水素を重水素置換することは既に報告した⁴⁾。Selenocysteine β -lyase の活性は selenocysteine から生成する H_2Se を lead acetate で定量し測定した¹⁾。標準反応液 (2.0 ml) は 4 μmol の L-selenocystine, 16 μmol の dithiothreitol, 80 μg のウシ血清 albumin, 200 μmol の Tricine-NaOH 緩衝液 (pH 8.5), 0.5 μmol の pyridoxal-P 及び 5.45 μg の酵素を含んでいる。

結 果

1. Selenocysteine β -lyase 反応の化学量論

われわれは先に元素状 selenium が selenocysteine や dithiothreitol 等の還元剤によって還元され、 H_2Se になることを報告した¹⁾。過剰量の dithiothreitol が存在すれば、L-selenocysteine は selenocysteine β -lyase の作用により、化学量論的に L-alanine と H_2Se に分解される。しかし、この事実は必ずしも H_2Se が一次的な酵素反応生成物であるということを意味しない。そこでわれわれは、大量の酵素を含む反応系を用いて本酵素反応の化学量論を再検討した。すなわち、selenocysteine をただちに L-alanine に分解することができる量の酵素を加え、残存する selenocysteine と他の生成物の間の二次的な反応が進行しないようにした。また、元素状 selenium の dithiothreitol による還元は比較的遅い反応であるから、反応は 2 時間行った。表 1 は消費する selenocysteine と生成する L-alanine 及び H_2Se の量的関係をまとめたものである。反応液に加える dithiothreitol の selenocysteine に対するモル比を 1 またはそれ以下に設定すると、元素状 selenium は生成するが、 H_2Se の生成は認められな

Table 1. Stoichiometry of selenocysteine β -lyase reaction^a

Molar ratio DTT ^b /Selenocysteine	Selenocysteine disappeared	Alanine formed	H_2Se formed
μmol			
0.2	0.51	1.03	0
0.4	0.98	2.02	0
0.8	2.05	3.97	0
1.0	2.50	4.93	0
2.0	2.50	5.10	2.42
3.0	2.50	5.06	4.91

^aThe reaction mixture (1.7 ml) contained 2.5 μmol of L-selenocysteine, various amounts of dithiothreitol (0–7.5 μmol), 0.34 μmol of pyridoxal-P, 0.68 mg of bovine serum albumin (Sigma), 340 μmol of Tricine-NaOH buffer (pH 8.5) and 3 units of enzyme, and was incubated at 25°C for 2 h. An aliquot of the reaction mixture was taken to determine selenocysteine and alanine by amino acid analysis, which was performed with a Hitachi high performance amino acid analyzer 835 equipped with a 4 x 150 mm column, and H_2Se with lead acetate (1).

^bDTT : dithiothreitol

かった。また、生成した L-alanine の量は消費した selenocystine の量のほぼ 2 倍であった。一方、上記モル比を 1 以上に設定すると、 H_2Se が生成した。これらの結果より次のような反応機構が考えられる。すなわち、selenocystine β -lyase は selenocystine から元素状 selenium を脱離し、 H_2Se の生成は未反応 dithiothreitol による元素状 selenium の非酵素的還元に基づく。実際に、上記モル比が 2 または 3 の時、元素状 selenium は未反応の dithiothreitol によって定量的に H_2Se に還元された。

2. 重水中で生成した alanine の NMR による分析

Selenocystine β -lyase 反応を重水中で行い、alanine への重水素の取り込みを ^{13}C 及び ^1H NMR で調べた。 ^1H off-resonance decoupling を用いて ^{13}C -NMR を測定したところ、 $[\beta\text{-}^2\text{H}_1]$ 及び $[\beta\text{-}^2\text{H}_2]$ の 2 種の alanine 分子種が観察された。 ^1H -NMR によって α -proton の β -proton に対する相対積分値を測定したところ、約 2 : 3 であった。すなわち、 $[\beta\text{-}^2\text{H}_1]$ 及び $[\beta\text{-}^2\text{H}_2]$ alanine が 1 : 1 の比率で生成することが明らかになった。L-alanine を重水中で単独で selenocystine β -lyase と共にインキュベートしても、重水素置換は観察されなかった。

3. $[\alpha\text{-}^2\text{H}]$ selenocystine の同位体効果

DL- $[\alpha\text{-}^1\text{H}]$ 、L- $[\alpha\text{-}^1\text{H}]$ 及び DL- $[\alpha\text{-}^2\text{H}]$ - selenocystine に対する K_m 及び $V_{\max}$ を測定した (表 2.)。DL- $[\alpha\text{-}^1\text{H}]$ 及び L- $[\alpha\text{-}^1\text{H}]$ selenocystine に対する K_m 及び $V_{\max}$ は近似していた。従って、D-異性体は基質 L-異性体の反応を妨害しないと考えられる。そこで、DL- $[\alpha\text{-}^1\text{H}]$ 及び DL- $[\alpha\text{-}^2\text{H}]$ selenocystine に対する

Table 2. Kinetic isotope effect with $(\alpha\text{-}^2\text{H})$ -selenocystine

Substrate	K_m (mM)	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	$V_{\max}/K_m$
L-Selenocystine	0.52	46	88
DL-Selenocystine ^a	0.40	46	115
$(\alpha\text{-}^2\text{H})$ -DL-Selenocystine ^a	0.50	19	38
.....			
Isotope Effect (H/D)		2.4	3.0

^aThe K_m values for DL-selenocystine were calculated for the L- isomers.

反応速度定数を比較した。観察された同位体効果より selenocysteine の α 水素が酵素によって引き抜かれる段階が存在することは明らかであり、しかもそれは全酵素反応過程の中で律速段階の一つと考えることができる。

4. Selenocysteine β -lyase の L-selenocysteine による不活性化

標準酵素反応液より pyridoxal-P を除去した反応液中で酵素をインキュベートすると、時間と共に反応速度が減少した。しかし、反応液中に pyridoxal-P を添加すると活性の回復が認められた。不活性化した酵素を 0.01 M potassium phosphate 緩衝液 (pH 7.4) に対して透析すると、結合 pyridoxal-P に由来する 420nm における吸収極大は完全に消失しており、酵素はアポ型に転換されていることが明らかになった。このような不活性化現象は L-selenocysteine とインキュベートした場合にだけ観察され、L-cysteine, L-serine, L-alanine, D-alanine, L-cysteine sulfinic acid, glycine, L-lysine, L-ornithine, L-aspartate, L-methionine, L-kynurenine, 及び hypotaurine による影響はなかった。

5. 不活性化した酵素に対する pyridoxal-P 及び α -keto acid の影響

Selenocysteine とインキュベートすることにより、不活性化した酵素を pyridoxal-P, pyridoxamine-P, glyoxylate, pyruvate, α -ketobutyrate, oxaloacetate, あるいは α -ketoglutarate で再活性化できないかどうか検討した。Pyridoxamine-P あるいは α -keto acid 単独では酵素を再活性化することはできなかったが、pyridoxal-P によりはじめの約 96% の活性が回復した。上記不活性化酵素あるいはホロ酵素から調製したアポ酵素はいずれも pyridoxamine-P 及び α -keto acid の両者共存下においてはじめて活性化された (表 3)。こうして活性化された酵素標品はいずれもホロ酵素と同一の吸収スペクトルを示した。これらの結果は次のような可能性を示唆している。すなわち、不活性化した酵素を pyridoxamine-P と共にインキュベートするとまず pyridoxamine-P 型酵素が生成し、その後 α -keto acid とのアミノ基転移反応によって pyridoxal-P 型に変換すると考えられる。Pyridoxal-P 非存在下で酵素が selenocysteine により不活性化されるのは、恐らく、selenocysteine とのアミノ基転移反応によって pyridoxal-P が pyridoxamine-P に変換するためであろう。生成した pyridoxamine-P の酵素に対する親和性が低ければ酵素から解離しアポ酵素が生成することになる。酵素タンパク 1 モル当り 1 モルの pyridoxal-P が結合していることが確認されているので、これに基づいて計算を行うと、酵素は 1 分間 1 mg タンパク当り 0.46 nmol の速度で L-selenocysteine と pyridoxal-P との間のアミノ基転移反応を触媒することになる。本来の

β -脱離反応の速度はこれより 9×10^4 倍大きいので、本酵素は 9×10^4 回 β -脱離を触媒する間に 1 回の割合でアミノ基転移反応を触媒することがわかる。

Table 3. Activation of inactivated selenocysteine β -lyase with pyridoxamine-P and α -keto acid^a

α -Keto acid	Rel. Act.
Control (Pyridoxal-P)	100
Glyoxylate	66
Pyruvate	69
α -Ketobutyrate	31
Oxaloacetate	49
α -Ketoglutarate	63
None	0

^aThe inactivated selenocysteine β -lyase with selenocysteine was dialyzed against 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), and then assayed after preincubation with pyridoxamine-P and α -keto acids. The preincubation mixture contained 2.5 μ mol of α -keto acid, 20 nmol of pyridoxamine-P, 0.2 μ mol of EDTA (2Na salt), 45 μ mol of Tricine-NaOH buffer (pH 8.5) and 4.1 μ g of the inactivated enzyme in a final volume of 150 μ l. In a control, α -keto acid and pyridoxamine-P were substituted for 20 nmol of pyridoxal-P. The preincubation was carried out at 37°C for 10 min. The reaction was started by addition of the assay mixture containing 1 μ mol of L-selenocysteine, 4 μ mol of dithiothreitol, 20 μ g of bovine serum albumin and 100 μ mol of Tricine-NaOH buffer (pH 8.5). After 10 min, H_2Se formed was determined with lead acetate.

考 察

重水中で酵素反応を行うと、selenocysteine から $[\beta-^2H_1]$ 及び $[\beta-^2H_2]$ -alanine が生成することを 1H 及び ^{13}C -NMR を用いて明らかにした。Selenium 元素が脱離したあと alanine の β 位には必然的に重水素が 1 原子とりこまれるが、それ以外にもともと 2 原子ある β -水素のうちの 1 原子が 0.5 の確率で溶媒の重水素と交換する。重水中で alanine を酵素と共にインキュベートしても alanine への重水素の取り込みは観察されないので、alanine が活性中心から遊離する以前の段階で重水素が alanine に取り込まれていることは明らかである。一方、selenocysteine の α 水素は alanine の α 位に高度に保持されているので、活性中心には

α 水素及び β 水素の授受に関与するそれぞれ別のアミノ酸残基が存在すると考えられる。

Selenocysteine β -lyase が本来の β -脱離反応以外にアミノ基転移反応を触媒することを明らかにした。このように副反応としてアミノ基転移反応を触媒する pyridoxal-P 酵素はほかにも数種報告されている⁵⁾。中でも aspartate β -decarboxylase と kynureninase は β -置換alanine の β -脱離を触媒する点でselenocysteine β -lyase と共通している⁵⁾。これら3種の pyridoxal-P 酵素のタンパク構造や触媒作用の立体化学を比較検討することは非常に興味深い問題であろう。

ここに述べた研究は、われわれが先に報告した内容⁶⁾を中心にまとめたものである。

文 献

1. ESAKI, N., T. NAKAMURA, H. TANAKA and K. SODA (1982) J. Biol. Chem. 257:4386
2. CHOCAT, P., N. ESAKI, T. NAKAMURA, H. TANAKA and K. SODA (1983) J. Bacteriol. 156:455
3. KLAYMAN, O. L. and T. S. GRIFFIN (1973) J. Am. Chem. Soc. 95:197
4. SODA, K. and T. OSUMI (1971) Methods Enzymol. 17B:629
5. SODA, K. and K. TANIZAWA (1979) Adv. Enzymol. 49:1
6. ESAKI, N., N. KARAI, T. NAKAMURA, H. TANAKA and K. SODA (1985) Arch. Biochem. Biophys. 238:418