グルタチオンペルオキシダーゼの機能特性†

田 中 英 彦

(岡山大学農学部)

1. はじめに

グルタチオンペルオキシダーゼ (以下 GSH・Px と略) は, 1957 年に Mills⁽¹⁾ によって赤血球におけるヘモグロビン酸化変性防止因子として発見された酵素である。その後, 1973 年にセレンが GSH・Px の構成成分であることが示され⁽²⁾, 一部の研究者からは大きな関心が寄せられていた。しかし, 最近になり, 本酵素の生体内での役割はもとより, セレンが本酵素の活性部位にセレノシステイン (HSeCH₂CH(NH₂)COOH, 以下 Secys と略) 残基として取り込まれ, またそれに対応する DNA のコドンは通常終止コドンである TGA であることが示された。本コドンがどのようにして読まれるのか, またどのような経路でセレンが取り込まれるのかといった知見がかなり集積し, 生化学, 分子生物学的な観点から相当な関心が寄せられるようになった。一方, 近年, GSH・Px 活性を示すセレン非依存型の酵素の存在が明らかになり, これはグルタチオン S-トランスフェラーゼのアイソザイムであることが確認された。ここではこれらの面も含めて最近の話題を紹介する。

2. GSH・Px (セレン依存型)

(1) 本酵素活性の生体内分布 各種動物細胞中に本酵素が確認されるが, ラットの組織分布では, 肝臓, 腎臓, 心臓で活性が高く, 消化管では胃の活性が高い⁽³⁾。セレン欠乏飼料で約 1 カ月飼育したセレン欠乏ラットの本酵素活性は, どの組織でも著しく低下するが, とくに肝臓での減少が顕著である⁽³⁾。

(2) 酵素反応機構 GSH・Px は下式のようにグルタチオンの存在下で, H₂O₂ や各種アルキルならびに脂肪酸ヒドロペルオキシド (ROOH) を H₂O やその水酸化体に還元する反応を触媒する。

過酸化化物から水またはアルコールへの還元は次のような機構で進行すると考えられている⁽⁴⁾。すなわち, 活性中心残基 Secys のセレノラートアニオン (E-Se⁻) がペルオキシドによって酸化され, セレネニン酸 (E-SeOH) となり, これが GSH によって攻撃を受け, セレノスルフィド複合体 (E-Se-S-G) となり, これにさらに 1 分子の GSH が作用すると酵素活性中心が復元 (E-Se⁻) され, GSH の酸化型 (GSSG) が生成する。過剰のペルオキシド存在下では, セレネニン酸はセレニニン酸 (E-SeOOH) となるが, これは GSH によってセレネニン酸へと還元されるので問題とはならない。

本酵素の至適 pH は 8.5~8.8 である。Secys 残基のセレノールの pK_a は 5.2 であるので, このセレノールは大部分解離していることになる。ちなみにシステインのチオールの pK_a は 8.8 である。

(3) 本酵素の構造 ウシ赤血球の GSH・Px は, 早くから結晶化され, 一次構造はもとより, X線解析などによる高次構造が示されている (図 1)⁽⁴⁾。最近, 遺伝子操作などにより遺伝子レベルから各種起源の本酵素の一次構造が明らかにされている。ヒト赤血球の本酵素の場合, 相異なる 2 種のサブユニットからなる 4 量体である⁽⁵⁾, そのほかの動物赤血球や肝臓からの GSH・Px は, 分子量は異なるが, 76,000~92,000 の範囲で, いずれも同一サブユニット 4 個から構成される⁽⁶⁾。サブユニット当たり 1 グラム原子のセレンが Secys の形で含まれている⁽⁶⁾。

本酵素の構造をみてみると, Secys 残基はサブユニットの比較的表面上に位置しており, その近傍には, 疎水性または芳香族アミノ酸残基が集まっているため, H₂O₂ のみならず多種の ROOH を基質とすることができるのであろう。

(4) 本酵素の生合成 セレンを Secys 残基やセレノメチオニン残基として含むタンパク質を含セレント

† Characteristic Function of Glutathione Peroxidase.

Hidehiko TANAKA (Faculty of Agriculture, Okayama University, Okayama 700)

表 1 含セレンタンパク質

タンパク質	起 源	ポリペプチド鎖中のセレンの化学形態
Glutathione peroxidase	ヒト, ラットの赤血球 ラット肝	セレノシステイン
Iodothyronine 5'-deiodinase	甲状腺, 肝臓, 腎臓	セレノシステイン
Selenoprotein P	ほ乳動物	セレノシステイン
Glycine reductase	<i>Clostridium sticklandii</i>	セレノシステイン
Formate dehydrogenase	<i>Escherichia coli</i> <i>Cl. thermoaceticum</i> <i>Metanococcus vannielii</i>	セレノシステイン
Hydrogenase	<i>M. vannielii</i>	セレノシステイン
Xanthine hydrogenase	<i>Cl. cylindrosporum</i>	不明
Nicotinic acid hydrogenase	<i>Cl. barkeri</i>	不明 (不安定物質)
Thiolase	<i>Cl. kluyveri</i>	セレノメチオニン
3-Hydroxybutyl-CoA dehydrogenase	<i>Cl. kluyveri</i>	セレノメチオニン

図 1 ウシ赤血球 GSH-Px サブユニットの折りたたみ構造. Se はセレノシステイン残基.

ンパク質と呼び、現在までに動物や微生物中の数種の酵素や役割不明なタンパク質が見出されている (表 1)⁽⁷⁾. 最近、これら含セレンアミノ酸のタンパク質への取込みに関心が寄せられている. 1986 年, GSH-Px と大腸菌のギ酸脱水素酵素 (FDH) の遺伝子解析が行われ、活性部位に存在する Secys 残基に対応する DNA のコドンはいずれもオパール終止コドン (TGA) であることが明らかにされた. Harrison らは赤血球の分化成熟に関与する遺伝子の発現調節機構を解明する目的で、マウス赤芽細胞や肝臓、腎臓で強く発現する多数のクローンに着目し、その塩基配列を解析した. そのうち ep 19 は、その対応するアミノ酸配列の相同検索により、GSH-Px を

コードすることが確認され、活性中心に存在する Secys 残基に対応するコドンは終止コドンの 1 つである TGA によってコードされていることを明らかにした⁽⁸⁾. 一方, Böck らは大腸菌の FDH をコードする構造遺伝子 (*fdhF*) を含むプラスミドを *fdhF* 欠損変異株に導入すると活性が相補されるとともに、本酵素に相当する分子量 80,000 のセレン含有タンパク質が合成されることを示した. *fdhF* 遺伝子読取り枠内の末端あるいは内部を欠除した一連のプラスミドを構築し、大腸菌に導入すると短鎖のセレンペプチドが生成し、それらの分子量は遺伝子から予測される値とよく一致した⁽⁹⁾. また *fdhF* 遺伝子を lacZ の 5' 側に連結した融合遺伝子を構築した結果、嫌気条件下でのみ融合タンパク質が合成され、とくに *fdhF* 部分が TGA コドンを含む場合には、融合タンパク質の合成にセレンの存在が必須であり、TGA の上流部分との融合遺伝子の発現には、セレンは要求されないことを実証し、Secys のタンパク質への取込みは翻訳段階で起こることを明らかにした⁽¹⁰⁾. さらに、FDH へのセレンの取込みには 4 種の遺伝子 (*selA*, *B*, *C*, *D*) が関与し、*selA* のコードするタンパク質はセリル-tRNA^{Sec}_{UGA} を Secys-tRNA^{Sec}_{UGA} に転換させる反応を触媒するピリドキサルリン酸酵素、すなわち Secys 合成酵素であること^(11,12), *selB* の遺伝子産物は未同定であるが、その塩基配列から翻訳開始因子 IF-2、または伸長因子 EF-Tu の遺伝子ときわめて高い相同性を示すことが明らかにされている. *selC* は、TGA から転写された UGA を特異的に認識する tRNA 遺伝子で、その

図 2 ヒト GSH-Px mRNA の 3'-非翻訳領域の二次構造

tRNA^{Sec}_{UGA} はセリンを受容することができる⁽¹³⁾。

本来終止コドンである TGA がなぜ読まれるのかについては分子生物学的に大変興味深いところである。原核細胞においては、TGA 近傍の高次構造によるものと推論されている^(14,15)。一方、GSH-Px などの真核細胞では、原核細胞と異なり、3'-末端の非翻訳領域の高次構造（ステムループ構造）が必須であることが示されている（図 2）^(16,17)。また Secys-tRNA を合成するとき、セリル-tRNA→ホスホセリル-tRNA→Secys-tRNA に変換されることが真核細胞において示されている⁽¹⁸⁾。

3. グルタチオン S-トランスフェラーゼ（セレン非依存型）

本酵素は前述したように GSH-Px 活性を示すが、基質は有機過酸化物のみで、H₂O₂ は作用しない点で、セレン依存型の GSH-Px と異なる。

本酵素の組織分布は、ラットでは睾丸、肝臓、十二指腸で高く、心臓、肺、脳では活性は非常に低いか、ないとされている^(3,19)。動物においては、肝臓が最大の総 GSH-Px 比活性を示すが、活性の大部分は可溶性画分に存在し、そのほか約 20% はミトコンドリアのマトリックスに分布する⁽²⁰⁾。

4. 本酵素の生体内における役割

本酵素は、生体内でスーパーオキシドジスムターゼによるスーパーオキシドアニオンラジカル (O₂^{-•}) の不均化反応によって生成する H₂O₂ を水に還元して消去する役割のみならず、膜脂質構成脂肪酸や遊離脂肪酸のヒドロペルオキシドを還元して、相当する水酸化体に変換することにより、細胞内構成成分を過酸化変性から守ることが重要な役割と考えられている。ただし、セレン欠乏食餌ラットのセレン依存型 GSH-Px 欠損にした実験では、H₂O₂ の消去はカタラーゼによってなされるので、GSH-Px が H₂O₂ に対して実際どのくらい効果があるのかは疑問が残る。

そのほか、アラキドン酸の各種リポキシゲナーゼにより生成したヒドロペルオキシド化体 (5-, 12-, 15-HPETE) から GSH-Px によって生成するヒドロキシエイコサテトラエン酸類のアラキドン酸カスケードにおける役割が論じられている。

- (1) G. C. Mills : *J. Biol. Chem.*, **229**, 189—197 (1957).
- (2) L. Flohé, W. A. Günzler, and H. H. Schock : *FEBS Lett.*, **32**, 132—134 (1973).
- (3) T. Masukawa, T. Nishimura, and H. Iwata : *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 2635—2639 (1984).
- (4) O. Epp, R. Ladenstein, and A. Wendel : *Eur. J. Biochem.*, **133**, 51—69 (1983).
- (5) Y. C. Awasthi, E. Buetler, and S. K. Srivastava : *J. Biol. Chem.*, **250**, 5144—5149 (1975).
- (6) L. Flohé : in “Free Radical in Biology,” ed. by W. A. Pryor, vol. V, Academic Press, New York, 1982, pp. 223—254.
- (7) 田中英彦, 左右田健次 : 化学, **42**, 214—215 (1987).
- (8) J. Chambers, J. Frampton, P. Goldfarb, N. Affra, W. McBrain, and P. Harrison : *EMBO J.*, **5**, 1221—1227 (1986).
- (9) F. Zinoni, A. Birkmann, T. C. Stadtman, and A. Böck : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4650—4654 (1986).
- (10) F. Zinoni, A. Birkmann, W. Leinfelder, and A. Böck : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3156—3160 (1987).
- (11) K. Forchhammer, W. Leinfelder, K. Boesmiller, B. Veprek, and A. Böck : *J. Biol. Chem.*, **266**, 6318—6323 (1991).
- (12) K. Forchhammer and A. Böck : *J. Biol. Chem.*, **266**, 6324—6328 (1991).
- (13) W. Leinfelder, E. Zehelein, M. Mandrand-

- Berthelot, and A. Böck : *Nature*, **331**, 723—725 (1988).
- (14) F. Zinoni, J. Heider, and A. Böck : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4660—4664 (1990).
- (15) A. Böck, K. Forchhammer, J. Heider, and C. Baron : *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 463—467 (1991).
- (16) M. J. Berry, L. Banu, Y. Chen, S. J. Mandel, J. D. Kieffer, J. W. Harney, and R. Larson : *Nature*, **353**, 273—276 (1991).
- (17) Q. Shen, F. Chu, and P. E. Newburger : *J. Biol. Chem.*, **268**, 11463—11469 (1993).
- (18) T. Mizutani, N. Maruyama, T. Hitaka, and V. Sakenaga : *FEBS Lett.*, **247**, 345—348 (1989).
- (19) F. Carmagnol, P. M. Sinet, and H. Jeromo : *Biochim. Biophys. Acta*, **756**, 49—57 (1983).
- (20) L. Flohé and W. Schlegel : *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 1401—1410 (1971).
-