

硒氨酸 Selenocysteine-----第 21 種氨基酸

張恭寧 何信重*

馬偕紀念醫院 醫事檢驗科 主任*

摘要

哺乳動物的含硒元素蛋白(selenium-containing proteins)被鑑定出硒元素(selenium)是先形成硒氨酸再以 UGA 為密碼編入蛋白質序列中。硒氨酸已經被確認為核糖體媒介蛋白質合成的第 21 種氨基酸。這類蛋白質要將硒氨酸編入，缺乏一般氨基酸順序的特色，但在硒蛋白(selenoprotein)基因轉錄的 mRNA，其 3'-untranslated region 有一個 stem-loop 結構稱為 selenocysteine insertion sequence (SECIS) element，它能將 UGA 密碼改譯成硒氨酸的訊號，其完成率遠大於譯成終止訊號。這個氨基酸使用獨特的 tRNA，是與 Serine 共用先形成 Serine-tRNA，其 anticodon 為 UCA。大部份硒蛋白的功能都與氧化還原反應有關，而且硒氨酸鍵結是處於酵素的活化區，參與最重要的催化反應。硒蛋白在哺乳動物是很普遍的蛋白質，至今發現有 14 種。關於含硒氨酸的酵素和蛋白，其分佈與性質容本篇內詳述。

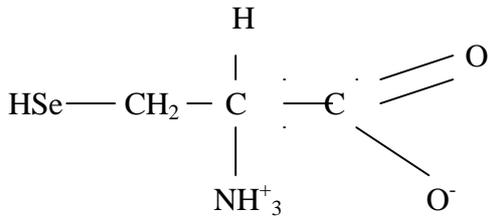
關鍵詞：硒、硒氨酸、SECIS element、第 21 種氨基酸、自由基、甲狀腺素

前言

1973 年 Rotruck 等人首先發現 glutathione peroxidase(GPx) 中含有 selenium；經過了 20 餘年來的努力才將這群人體重要的酵素解密，也改寫核酸鹼基配對的定律，首先在 GPx 的 mRNA 上發現以 non-Watson-Crick base pair 的結構，並以 UGA 為密碼(codon)直接插入蛋白質的氨基酸序列，真正成為核糖體媒介的第 21 種氨基酸，即 selenocysteine 硒氨酸。^(1,2,6,7,9,10) 硒化物可能具有化學防癌與阻止癌細胞生長的能力，⁽³⁾但需要先透過形成氨基酸再組成蛋白酵素或其他小分子。這類酵素所執行的工作包括銷毀細胞代謝所產生的自由基，誘發轉型細胞的凋亡，甲狀腺素的活化與分解，甚至關係到精蟲的型態與活力，為人體必需的稀有元素。^(5,11)

關於 Selenocysteine

硒氨酸 Selenocysteine 簡稱 Secys 或 Sec，氨基酸代碼為 U，基因密碼為 UGA，結構式如下：



Sec 之所以被承認是一種氨基酸，理由就在核糖體內蛋白質合成過程中擁有自己特別的配對鹼基 UGA；UGA 在蛋白質合成所代表的訊息有兩種：一是終止密碼，第二種訊息是代表 Sec 的密碼，這類蛋白稱為 selenoprotein。^(1,2,4,5,6,8,9,10,11) 在哺乳類 selenoprotein 中的 Sec 和一般氨基酸的插入(insertion)方式不同，於 mRNA^{Sec} 的 3' 端之 untranslated region(UTR) 有一個特別的 stem-loop 結構稱為 selenocysteine insertion sequence(SECIS) element，這個結構對於解讀 UGA 密碼成 Sec 的訊息是絕對必需的。

神秘的 SECIS element

1991 年 Berry 首先發現在哺乳類 selenoprotein 的 mRNA 3' 端 untranslated regions 有一個 stem-loop 距離 UGA codon 約 500 到 5300 個鹼基不等，命名為 selenocysteine insertion sequence (SECIS) element。⁽²⁾ 1996 年 Krol et al 首次將 SECIS element 結構式完整的定出，也陸續發現有其他的型式。哺乳動物在 selenoprotein 合成過程中，SECIS element 的角色類似 E coli 的 *Sel B* 基因，其功能是用來取代 elongation factor -Tu (EF-Tu) 的職責，將 Sec 攜帶到正確的位置。兩者最大的差異是 SECIS element 只認識 tRNA^{Sec}，把 Sec 精確地插入核糖體內 rRNA 的 A site 上，使 selenoprotein 的 peptide chain 繼續生長；而 EF-Tu 則能精確地辨識 40 種 tRNA，並將每種氨基酸準確地插入核糖體內 rRNA 的 A site 上。^(2,6,8,10)

SECIS element 結構式(圖 1)中，雖來自人、鼠、細菌及血吸蟲，⁽⁶⁾ 有部分鹼基配對是固定排列：包括 Helices I and II、internal loop、apical loop 和一組罕見不依鹼基正常配對(non-Watson-Crick interacting nucleotides)的 Quartet 結構特稱為 SECIS core。SECIS core 位於 5'端有 AUGA、3'端有 GA，但兩者不依正常的鹼基配對作 G=A 與 A=G 的特殊 base pairing，如圖所

示。在 SECIS element 的 apical loop 上有兩個 unpaired 的 Adenine。以上兩處結構與 SECIS element 的特殊功能有關。(6,10)

關於 tRNA^{Sec}

Sec 所用的 tRNA 是與 Serine 所共用(圖 2)。在研究 E coli 合成 selenoprotein 時發現要插入 Sec 到 peptide chain 中需要四個 specialized translation elongation factor(*Sel* gene)基因的輔助包括：(1) *Sel A* gene 負責 Sec synthase 的合成並催化 tRNA 上的 Serine 置換成 Sec；就是把 Ser-tRNA^{Sec} 轉換成 Sec-tRNA^{Sec}；(2) *Sel B* gene 如前所述作為一個 Sec-specific elongation factor；(3) *Sel C* gene 負責 tRNA^{Sec} 的轉錄；(4) *Sel D* 負責生成 selenophosphate synthetase 這個酵素會利用 ATP 與還原態的 selenium 合成 selenophosphate。(2,10)

Sec 能插入蛋白質序列中是靠 L-Serine Ligase 的輔助，先將 L-Serine 固定在 tRNA 上，然後再將酯化後的 Sec 轉接到 tRNA 上。至今真核細胞是如何合成 Sec-tRNA^{Sec} 仍然不清楚，而 Serine 作為 Sec 的前趨物是被肯定的。(2,8)

tRNA 上的 anticodon UCA 乃 serine 所專用，其所需密碼為 AGU；但在哺乳動物 mRNA 末端的 SECIS element 或 E coli 的 *sel B* gene 卻能使 anticodon UCA 與 codon UGA 進行交叉配對(圖 2)並將 Sec-tRNA^{Sec} 上的 Sec 插入 rRNA 的 A site。

2000 年 Copeland 等人分離出一種 RNA 結合蛋白稱為 SBP2 (SECIS binding protein- 2)，(2) 擁有 846 個氨基酸並含有 RNA binding domain 可以抑制 UGA 在轉譯過程被譯成終止密碼(termination)。在細菌合成 selenoprotein 實驗過程中若是加入 SBP2 的抗體時這種插入 Sec 的功能立即消失，證實 SBP2 具有確保 Sec 插入 peptide chain 的能力。(2)但是經過證明這個蛋白質目前只被發現在網狀紅血球的融小體(reticulocyte lysates)內。

人體含 Selenocysteine 的酵素

人體由 Selenocysteine 所組成的蛋白有 14 種(表 1)。(1,2,6,8,10)細菌則有 formate dehydrogenase 及其他去氫酶。每種酵素均含有一分子的 Sec。但是 selenoprotein P 例外，它是由 10 到 12 個 Sec 分子所組成。於 1999 年 Kryukov 等人利用 SECISearch 找出人體兩種 selenoprotein 的基因：*Sel R* 與 *Sel T* 並解讀出其蛋白序列但是功能不明。(6)

表 1：人體 selenoprotein 一覽表

酵素名稱	亞型簡稱	主要功能
glutathione peroxidase	cGPx,pGPx,PH-GPx,GPx1	消滅 free radical, H ₂ O ₂
thyroid hormone deiodinase	I,II,III.	活化或代謝甲狀腺素
thioredoxin reductase	TR-1, TR-2, TR-3	與 GPx 合作消滅 free radical
selenophosphate synthetase2	none	合成 selenophosphate
selenoproteinW	none	存在肌肉中機能不明
selenoprotein P	none	當 selenium 的儲存場？
15-kDa selenoprotein	none	不明

關於 Thyroid hormone deiodinase 與甲狀腺機能

控制甲狀腺機能的兩種稀有元素是碘(iodine)與硒(selenium)，前者負責甲狀腺素的合成，後者則控制甲狀腺素的活化與分解。(5,9,11)甲狀腺素去碘酶(Iodothyronine deiodinase)含有一分子的硒氨酸 共分為三型 type I、II、III，分佈在不同組織，其中 type I 存在肝、腎、甲狀腺。type II

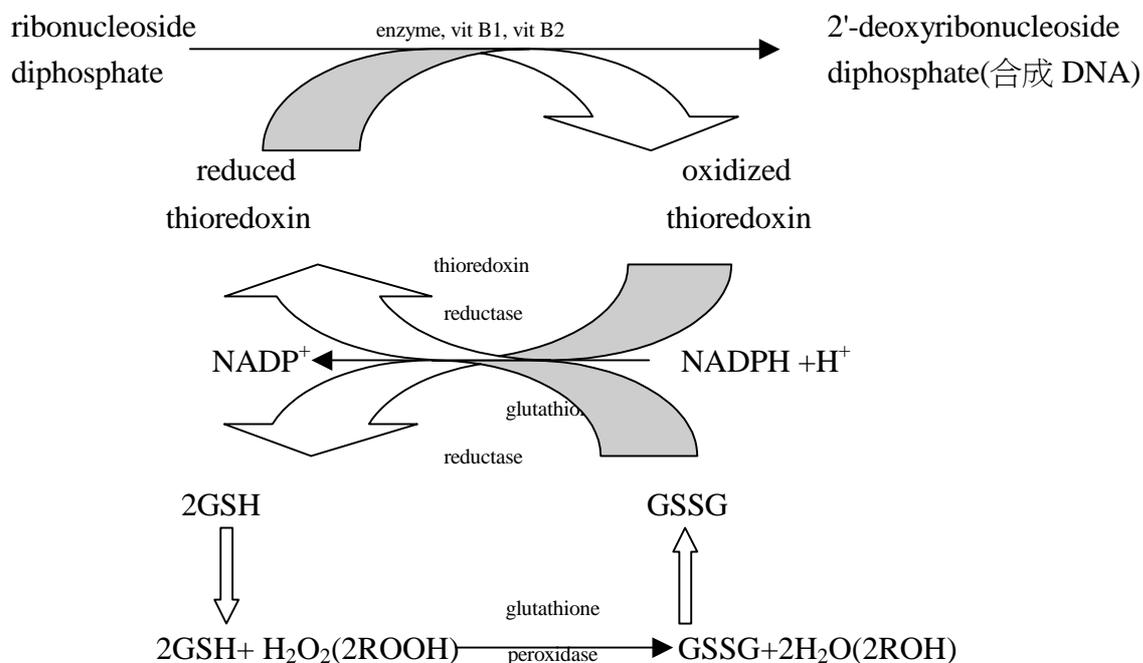
則存在腦部，兩者都是活化(active)甲狀腺素，能催化甲狀腺素 T₄ 去掉一個碘變成 T₃，使其活性大增。type III 負責去活化(inactive)，將 T₃ 去活化及分解。而 Sec residue 是位於酵素的活化區(active site)也具有保護酵素本身的能力。不論其活性太強或不足都會造成甲狀腺的異常。(1,6,10)

關於 Thioredoxin reductase 與 Glutathione peroxidase

thioredoxin reductase, TR(硫氧化還原蛋白還原酶)的功能是將組織代謝產生的 NADPH + H⁺ 還原成 NADP(圖 3)，(1,4,7,8,9)但需要有氧化態的硫氧化還原蛋白(oxidized thioredoxin) Vit B₁ 及 Vit B₂ 作為 cofactor，反應程式如圖 3；人體 TR 共可分三型，主要功能在銷毀細胞內所產生的 free radical (自由基)如過氧化氫及來自於磷脂質或脂肪酸的過氧化物，或其他的過氧化物。這些自由基都是經由 thioredoxin 和 glutathione 系統所收集並銷毀，避免紅血球或其他細胞遭受攻擊；哺乳動物是由 redoxin(氧化還原蛋白)來傳遞訊息，而 thioredoxin 的活性是依賴 redoxin reductase 中的 redoxin 的狀態，而 redoxin 的活性是根據其分子內 selenocysteine 鍵的轉換(5,9)。Sun QA 發現在人類癌細胞培養中所產生的自由基會造成 TR-1 上的 selenocysteine 被氧化，隨後 thioredoxin reductase 酵素的活性就會上升，顯示 selenocysteine 的狀態可以誘發硫氧化還原蛋白還原酶的活性。

Glutathione peroxidase 區分為 4 型，其中 phospholipid hydroxide glutathione peroxidase(PH-GPx) 與齧齒類或家畜甚至人類的生殖系統有密切關係。若餵食缺乏 selenium 的食物給實驗動物時會造成其精蟲的活動性與尾巴都出現異常。(11)經過多年來的研究才了解 redox enzyme 為精蟲成熟所必需的。在未成熟精蟲(spermatide)的粒線體內有大量的 PHGPx 酵素。當成熟為精子時 PHGPx 都被去活化(inactive)。所以要從實驗動物中取得 selenium 最簡單的方法就是從睪丸粹取。(11)

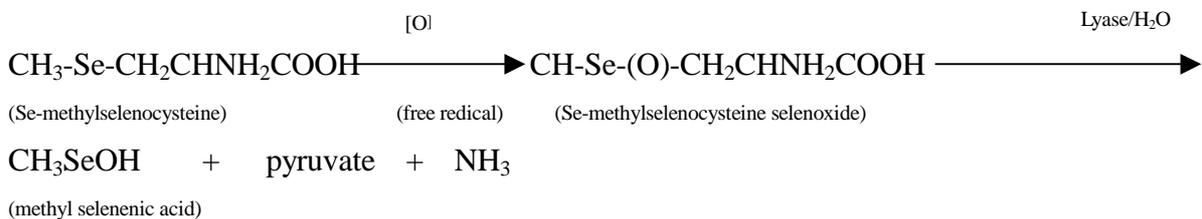
圖 3：Thioredoxin reductase 與 glutathione peroxidase 之關係圖⁽⁷⁾



關於 Selenoprotein 防癌的機轉

在過去 10 餘年來的研究報告顯示，若在實驗動物或癌症患者投與富含 selenium 的食物可以獲得阻止癌細胞生長。就以 glutathione peroxidase 角度來看適乎是合理，因為 glutathione peroxidase 主要的角色就是將組織細胞所產生的自由基代謝掉以避免傷及組織細胞。但是正常飼食的動物實驗中發現 glutathione peroxidase 的活性已經最大，縱使餵食 10 倍濃度的硒化物食物其酵素活性仍然一樣，甚至會減低活性。因此沒有直接證據顯示增加 glutathione 能增加防癌的能力。防癌能力可能要將重點回到低分子量的 chemopreventive metabolites 或是尚未鑑定出來的 selenoprotein 上。⁽³⁾根據 Ip 等人的研究一些小分子的 Sec 化合物如 Se-methylselenocysteine 可與 free radical [O] 結合形成 Se-methylselenocysteine selenoxide 再經 lyase 的水解產生 methylselenenic acid 和 pyruvate(圖 4)。

圖 4：小分子硒化物與自由基的反應方程式⁽³⁾



而 Se-methylselenocysteine 大量存在於 selenized yeast 及 selenized garlic(大蒜)中，為最好的化學防癌實驗材料。化學物質有能力清除癌化啓始細胞，可以導致癌化細胞的凋亡或是抑制變型細胞的生長，這種機轉稱為 chemoprevention。⁽³⁾在許多實驗室的研究報告顯示硒化物對抗癌細胞的機轉值得注意。Thompson 證實了硒化物誘發變型細胞凋亡的啓動不需要 DNA damage 和細胞 P⁵³ 的突變。⁽³⁾有許多型式的硒化物可以有效的抑制 cell cycle protein kinase(cdk-2) 與 cell signaling protein kinase 的活性；若以 methylate form 的硒化物也有同樣效果。硒化物會改變 cell cycle protein，減少 cdk-2 作用在 G₁/S phase 的活性，阻礙細胞進入 S phase 減少 DNA 的合成。以某個角度來看，關於小分子硒化物對人體的幫助充滿了想像。

Selenoprotein 的來源

自然界中有許多細菌、植物或動物都能利用 hydrogen selenide 合成多種有機化合物，如大蒜中的 selenide garlic 就是含有高單位的 Se-methylselenocysteine。⁽³⁾人類需要直接攝取有機的硒化物。自然界中 selenomethionine 插入 selenoprotein 中是直接取代 methionine 的位置而得。^(1,8)也就是說在含 selenomethionine 的蛋白質合成過程先由 methionine 編入，然後再接上 selenium 成為 selenomethionine residue 並沒有特殊密碼。^(1,3,8)人類再利用 selenomethionine 釋出的 selenium，先合成 selenophosphate 再生成 selenocysteine(Sec)或其他小分子，再利用 UGA 的密碼將 Sec 編入人體的特殊蛋白 selenoprotein。人體 selenium 的儲存者可能是 selenoprotein P，在已被發現的 14 種 selenoprotein 中只有 selenoprotein P 含有 10 到 12 個 Sec，其 Sec 數可以隨血中 selenium 的濃度而改變。其他的 selenoprotein 都只有單一個 Sec。所以 selenoprotein P 可能是人類 selenium 的儲存池，當食物中 selenium 供應不足時 selenoprotein P 就會釋出 selenium 供人體利用，但是至今仍無法證實其功能。^(1,3,8)

Selenium 的分佈

Selenium 硒為人體必需的微量元素，總量約 14.6mg，主要見於肝臟、腎臟、甲狀腺及其他組織。⁽¹⁾其中又以甲狀腺的單位濃度最高。⁽⁵⁾在地表上約 0.05ppm、海水中約 0.09ppm、人體血液正常值為 95~160ng/mL(0.15ppm)，高出周圍環境許多。自然界存在的型式可分為無機硒化物與有機硒化物，hydrogen selenide 可為細菌與動植物所利用，為無機型態轉有機型態反應的起點。^(3,8)缺乏症只在少數土壤缺乏 selenium 的地區才會發生如中國黑龍江省 keshan 地區及少數非洲地區。⁽¹⁾

結語

自從健康食品流行以來硒化物就無法置身事外，由於其消滅體內自由基活性氧的功能是早有共識，然而大量的硒化物不但無法增加 glutathione peroxidase 的活性反而會抑制，這點已是事實。然而小分子的硒化物如 selenotrisulfide bonds(S-Se-S),selenenylsulfide bonds(Se-S)或 Se-Se 在減少 ribonuclease 的反應以及抑制 protein kinase C 的功能上各有表現，這神秘的稀有元素日後仍然會受到學界的關注的。

參考文獻

1. Burtis CA, Ashwood ER: Tietz textbook of clinical chemistry, 3th, Philadelphia, WB Saunders. 424-5, 994-5, 1047-9, 1999.
2. Copeland PR, Fletcher JE, Carlson BA, et al : A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. EMBO J 19:306-14, 2000.
3. Ganther HE: Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. Carcinogenesis 20: 1657-66, 1999.
4. Kang SW, Baines IC, Rhee SG: Characterization of mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. J. Biol Chem 273: 6303-11, 1998.
5. Kohrle J: The trace element selenium and the thyroid gland. Biochimie 81:527-33, 1999.
6. Kryukov GV, Kryukov VM, Gladyshev VN: New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence element. J Biol Chem 274: 33888-97, 1999.
7. Martin DW, Mayes PA, Rodwell VW, Granner DK: Harper's review of Biochemistry. 20th Los Altos, California: 183,362, 1985.
8. Stadtman TC: Selenocysteine. Ann Rev Biochem 65:83-100, 1996.
9. Sun QA, Wu Y, Zappacosta F et al: Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. J Biol Chem 274:24522-30, 1999.
10. Suppmann S, Persson BC, Böck A: Dynamics and efficiency in vivo of UGA-directed selenocysteine insertion at the ribosome. EMBO J 18:2284-93, 1999.
11. Ursini F, Heim S, Kiess M et al: Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. American Science 285:1393-6, 1999.

Selenocysteine--the 21st amino acid

Gong-Ning Zhang, and Hsin-Tsung Ho

Department of Laboratory Medicine, Mackay Memorial Hospital

ABSTRACT

In the mammalian selenium-containing proteins identified , selenium initially forms a selenocysteine residue encoded by UGA before incorporating into the protein sequence. Selenocysteine is recognized as the 21st amino acid in ribosome-mediated protein synthesis. These proteins lack common amino acid sequence motif, but the 3'-untranslated region of selenoprotein gene contains a common stem-loop structure, called selenocysteine insertion sequence(SECIS) element. The SECIS element is necessary for decoding UGA as selenocysteine rather than a stop signal. The selenocysteine utilizes unique tRNAs containing complementary UCA anticodon which can be aminoacylated with serine to form Ser-tRNA. Most selenoproteins are involved in redox reactions in which selenocysteine residue located at the active site of enzymes play a central role in catalysis. Selenoproteins are quite common in mammals, so far, fourteen selenoproteins have been discovered . The distribution and properties of selenoproteins will be further discussed.

Key word: selenium/ selenocysteine/ SECIS element/ 21st amino acid/ free radical/ thyroid hormone