

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18691

研究課題名(和文)高濃度セレン耐性菌を利用したセレン代謝機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of selenium metabolism utilizing high concentration selenium-resistant bacteria

研究代表者

戸部 隆太(Tobe, Ryuta)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：00758823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：セレン蓄積地帯の土壌より単離した高濃度セレン耐性菌 *Pseudomonas* sp. F2a 株の全ゲノム配列を解読し、セレン耐性能またはセレン還元能に關与する可能性のある遺伝子群を特定した。また、特定した遺伝子(群)を各々クローニングし、精製タンパク質として解析した。さらに、MSを用いた分析により、亜セレン酸の還元に伴う反応中間体を検出した。

研究成果の概要(英文)：The selenium-resistant bacterium *Pseudomonas* sp. F2a was isolated from a soil around the selenium accumulation area in India, and its whole genome sequence was revealed using a next-generation sequencer. Based on the genomic information, the genes that may be involved in selenium resistance or selenium reduction ability were identified. Some of the identified genes were cloned and analyzed as purified proteins. In addition, the intermediate of selenite and the reductant protein was analyzed by MS.

研究分野：微生物生理学

キーワード：Selenium Thioredoxin Bacteria Selenophosphate Selenite reduction

### 1. 研究開始当初の背景

セレン (Se) は、哺乳類をはじめとする多くの生物における必須微量元素であり、生体内では主にセレンタンパク質として抗酸化作用など重要な生理的役割を果たしている。セレンタンパク質は、細菌・アーキア・真核生物の 3 生物ドメイン全てに存在する。一方で、Se の過剰摂取は毒性を示すため、Se 代謝系における無毒化メカニズムの解明が求められている。これまでにセレンタンパク質の生合成に必須なセレノシステイル tRNA (Sec-tRNA<sup>Sec</sup>) は、他の一般的な tRNA とは異なり、Sec-tRNA<sup>Sec</sup> 特異的な因子 (SelA や SelD) により厳密な制御下で合成されることが明らかにされてきた。この合成系において、Se 基質とされているセレニドは、取り込んだ Se 化合物 (セレン酸や亜セレン酸) を還元して生成される。しかし、これらセレニドや Se 化合物は、反応性が高く生体に高い毒性を示す。そのため、生体内には「必要な Se を安定かつ無毒な形でセレンタンパク質合成系に転移する系」と「過剰な Se 化合物を速やかに還元 (無毒化) し、細胞外に排出する系」が存在すると考えられる。その仕組みと制御メカニズムはどのようになっているのかは未だよくわかっていない。

### 2. 研究の目的

これまでの研究によって、哺乳類ではチオレドキシシンとグルタチオン (GSH) が無毒化に深く関与することを見出したが、一部の細菌は GSH を持たないため、哺乳類とは異なる無毒化のしくみが存在すると考えられた。そこで、新たに単離した高濃度セレン耐性グラム陰性細菌 *Pseudomonas* sp. F2a 株を利用し、細菌における GSH に依らない Se 化合物の無毒化のしくみを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) Se 蓄積地帯の土壌より新たに単離した *Pseudomonas* F2a 株が、どのような特徴的な遺伝子を有しているのかを明らかにするために本菌株のゲノムを解析した。本菌株は、高い Se 耐性能を持つ一方で、セレンタンパク質生合成も行うことから、より Se 代謝に特化した特徴的な遺伝子パターンを持つと考えられた。そこで、本菌の近縁種および大腸菌や酵母など既にゲノムが解読されている他種菌との比較を行い、本菌株の Se 代謝における遺伝子の特異性および普遍性を解析した。

(2) 先の予備実験において、新たにチオレドキシシン (Trx) がセレンタンパク質合成系に関与することを見出した。そこで、Trx およびチオレドキシシン還元酵素 (TrxR) が Se 化合物の還元および Se 運搬において、どのような働きを持つのかを精製酵素を用いて酵素学的に解析した。F2a 株のもつ 6 種の推定チオレドキシシン (Trx) および 2 種の推定 Trx 還元酵素 (TR) に対し、それぞれ精製タンパク

質を調製し、Se 化合物を基質とした活性測定により Trx および TR の生理的機能を解析した。

(3) セレン源である亜セレン酸の還元産物であるセレニドの運搬には、何か未同定の因子が関与することが示唆されている。そこで、精製 Trx を用いて、亜セレン酸の還元反応における中間体を分析した。

### 4. 研究成果

(1) ゲノム解析の結果から、F2a 株は Trx を 6 種類、TrxR を 2 種類を保有していると推定された。グラム陰性細菌のモデル細菌である大腸菌では、Trx が 2 種類、TrxR は 1 種類しか同定されていない。F2a 株は大腸菌と比較しても高い亜セレン酸還元能を有するため、これには Trx システムが関与する可能性が示唆された。

(2) 個々のタンパク質を解析するために、上記 6 種類の *trx* ホモログ遺伝子および 2 種類の *trxR* ホモログ遺伝子をクローニングし、翻訳産物を His タグ融合タンパク質として精製した。精製 TrxR の活性を DTNB 法で測定した結果、一つの TrxR にのみ NADPH 依存的に TrxR 活性が認められた。もう一つの TrxR は、通常の TrxR とは異なる機能を有することが示唆された。一方で、各精製 Trx ホモログの Trx 活性をインスリン法により解析した結果、測定した全ての Trx ホモログにおいて Trx 活性が認められた。次に、亜セレン酸を基質とする還元活性を調べた。その結果、それぞれの Trx ホモログで還元活性が異なることが明らかとなり、その中で 2 つの Trx が特に高い亜セレン酸還元活性を有することが示された。しかし、セレン酸、亜硫酸、チオ硫酸に対しては活性を示さなかった。

(3) 上記の Trx が亜セレン酸に作用し、生成される反応中間体の存在および形態を調べるために、還元型 Trx と亜セレン酸との反応産物を ESI-MS により解析した。また、Trx の活性中心である WCxxC モチーフに変異を導入し、変異型 Trx (C33A、C36A、および C33A/C36A) を作製・精製した。MS 解析の結果、野生型では、タンパク質単体のピークに加えて、反応中間体と思われるピーク (Trx + 97 Da) が検出された。一方で、変異型では C36A のみセレン単体 (Trx + 78 Da) が結合している反応中間体と推測されるピークが検出された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Jahan MI, Tobe R and Mihara H. (2018) "Characterization of a novel porin-like protein, ExtI, from *Geobacter sulfurreducens* and its implication in the reduction of selenite and tellurite" *Int J Mol Sci.* 査読有, 19(3), E809.

DOI: 10.3390/ijms19030809

2. Tobe R, Koga H, Tani Y, Tajima H, Tsuji A and Mihara H. (2017) "Identification of selenomethionine, selenocysteine, and Se-methylselenocysteine in the selenium-enriched common ice plant" *Biomed Res Trace Elements*. 査読有, 28, 135-142.

DOI: 10.11299/brte.28.135

3. Yim SH, Tobe R, Turanov AA and Carlson BA. (2018) "Selenoproteins - methods and protocols" *Methods in Molecular Biology*. 査読有, 1661, 177-192.

DOI: 10.1007/978-1-4939-7258-6\_13

4. Tobe R, Tani Y, Kataoka M, Yamashita Y and Mihara H. (2016) "Relationship between the glycosphingolipids and phospholipids synthesis and the mycelial growth in *Neurospora crassa*" *Trace Nutrients Research*. 査読有, 33, 13-20.

[https://jglobal.jst.go.jp/detail?JGLOBAL\\_ID=201702273913989814&q=1346-2334&t=2](https://jglobal.jst.go.jp/detail?JGLOBAL_ID=201702273913989814&q=1346-2334&t=2)

5. Kamada S, Okugochi T, Asano K, Tobe R, Mihara H, Nemoto M, Inagaki K and Tamura T. (2016) "A non-radioactive assay for selenophosphate synthetase activity using recombinant pyruvate pyrophosphate dikinase from *Thermus thermophilus* HB8" *Biosci Biotechnol Biochem*. 査読有, 80(10), 1970-1972.

DOI: 10.1080/09168451.2016.1200458

6. Carlson BA, Tobe R, Yefremova E, Tsuji PA, Hoffmann VJ, Schweizer U, Gladyshev VN, Hatfield DL and Conrad M. (2016) "Glutathione peroxidase 4 and vitamin E cooperatively prevent hepatocellular degeneration" *Redox Biol*. 査読有, 26(9), 22-31.

DOI: 10.1016/j.redox.2016.05.003

7. Tobe R, Carlson BA, Huh JH, Castro NP, Xu XM, Tsuji PA, Lee SG, Bang J, Na JW, Kong YY, Beaglehole D, Southon E, Seifried H, Tessarollo L, Salomon DS, Schweizer U, Gladyshev VN, Hatfield DL and Lee BJ. (2016) "Selenophosphate synthetase 1 is an essential protein with roles in regulation of redox homeostasis in mammals" *Biochem J*. 査読有, 473(14), 2141-2154.

DOI: 10.1042/BCJ20160393

[学会発表](計16件)

1. 戸部隆太, 神農美希, 伊豆由紀子, 寫本奈々, 三原久明 『*Geobacter sulfurreducens* 由来のマルチヘム含有セレンタンパク質の解析』日本農芸化学会, 2018.

2. 戸部隆太, 西田亮, 生田帆河, 葛野侑香, 森聡美, 安間友香理, 広瀬侑, Tejo N Prakash, 三原久明 『細菌におけるテルル酸還元機構の解析』特殊環境微生物セミナー, 2017.

3. 戸部隆太, 名田イサナ, 田島寛隆, 広瀬侑, 今井友也, Tejo N Prakash, 三原久明 『*Cellulomonas* sp. D3a 株におけるカルコゲンオキシアニオン還元機構の解析』環境微生物

物系学会合同大会, 2017.

4. Tobe R, Shimizu A, Hagita S, Tamura T, Ogawa T, Kiriya K, Tai A, Kurihara T, Prakash TN and Mihara H. "Delivery of selenide to selenophosphate synthetase for selenoprotein biosynthesis in bacteria" The 11th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine (Se2017), 2017.

5. 戸部隆太, 三原久明 『細菌におけるセレン化合物の代謝とセレンタンパク質合成』日本微量元素学会, 2017. (招待講演)

6. 戸部隆太, 神農美希, Jahan Ishrat MST, 寫本奈々, 松寄祐樹, 伊豆由紀子, 三原久明 『*Geobacter sulfurreducens* 由来の新規マルチヘム含有セレンタンパク質 MHSEP の解析』酵素補酵素研究会, 2017.

7. 戸部隆太, 佐藤大起, 山田拓明, 三原久明 『*Pseudomonas putida* の D-リジン異化代謝における制御機構の解析』日本ビタミン学会, 2017.

8. 戸部隆太 『微生物におけるセレンおよびテルルの代謝』第3回日本セレン研究会, 2017.

9. 戸部隆太, 神農美希, 寫本奈々, 三原久明. 『*Geobacter sulfurreducens* が有するマルチヘム含有セレンタンパク質の精製と機能解析』日本農芸化学会, 2017.

10. Tobe R, Shimizu A, Hagita S, Prakash TN and Mihara H. "Selenium delivery system for selenophosphate synthetase in bacteria" The 6th International Selenium Conference (Se 2016), 2016.

11. 戸部隆太, 中尾領太, 片浦美沙, 三原久明. 『グラム陽性菌 *Clostridium sticklandii* 由来 D-セレノシスチン  $\alpha, \beta$ -リアーゼに関する研究』第496回日本農芸化学会関西支部例会, 2016.

12. Tobe R, Kataura M, Nakao R and Mihara H. "Purification and characterization of D-cysteine desulfhydrase from Gram-positive bacterium *Clostridium sticklandii*" The 5th International Conference on Cofactors & Active Enzyme Molecule 2016, 2016.

13. 戸部隆太, 清水敦貴, 波北悟, Prakash Tejo, 三原久明. 『セレンタンパク質合成系におけるセレン供給体の解明』日本微量元素学会, 2016.

14. 戸部隆太, 古賀裕紀, 田島寛隆, Prakash NT, 三原久明. 『セレン強化植物およびセレン耐性微生物に含まれるセレン種のスペシエーション分析』日本微量栄養学会, 2016.

15. 戸部隆太, 波北悟, 清水敦貴, 田村隆, 三原久明. 『細菌におけるセレノリン酸合成酵素への基質供給系の解析』日本ビタミン学会, 2016.

16. Tobe R, Hirose Y, Nada I, Saito S, Tajima H, Prakash TN and Mihara H. "Characterization and genome analysis of *Cellulomonas* sp. D3a, a selenium and tellurium oxyanions-reducing bacterium" The 13th International Conference on the Chemistry of Selenium and Tellurium

(ICCST-13), 2016.

〔図書〕(計6件)

1. Staicu LC, Oremland RS, Tobe R and Mihara H. (2017) “Bacteria versus selenium: A view from the inside out” Selenium in plants. Springer, Chapter 6, 79-108.

DOI: 10.1007/978-3-319-56249-0\_6

2. 戸部隆太、三原久明. (2017) 『鉄硫黄クラスターおよびセレンタンパク質生合成とその分子機構』硫酸と工業, 70, 23-28.

<http://www.ryusan-kyokai.org/pub/pdf/No70-2.pdf>

3. Carlson BA, Lee BJ, Tsuji PA, Tobe R, Park JM, Schweizer U, Gladyshev VN and Hatfield DL. (2016) “Selenocysteine tRNA[Ser]Sec: from nonsense suppressor tRNA to the quintessential constituent in selenoprotein biosynthesis” Selenium. Springer, Chapter 1, 3-12.

DOI: 10.1007/978-3-319-41283-2

4. Mihara H, Tobe R and Esaki N. (2016) “Mechanism, structure, and biological role of selenocysteine lyase” Selenium. Springer, Chapter 10, 113-123.

DOI: 10.1007/978-3-319-41283-2

5. Hatfield DL, Carlson BA, Tsuji PA, Tobe R and Gladyshev VN. (2016) “Selenium and cancer” Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals. Academic Press, Chapter 38, 463-473.

<https://doi.org/10.1016/C2014-0-02224-1>

6. 戸部隆太. (2016) 『セレンも世界を救う』生物工学会誌, 94(7), 426.

[https://www.sbj.or.jp/sbj/sbj\\_biomeia\\_2016.html](https://www.sbj.or.jp/sbj/sbj_biomeia_2016.html)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.ritsumei.ac.jp/lifescience/skbiot/mihara/Top.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

戸部 隆太 (TOBE, Ryuta)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：00758823

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

三原 久明 (MIHARA, Hisaaki)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：30324693

### (4)研究協力者

広瀬 侑 (HIROSE, Yuu)

豊橋技術科学大学・環境生命工学系・助教