

平成21年 5月20日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19370040
 研究課題名（和文） セレンの特異的の化学変換システムとタンパク質への共翻訳的挿入装置の構造機能解析
 研究課題名（英文） Structure and function of selenium-specific chemical conversion system and co-translational insertion of selenium into proteins
 研究代表者
 江崎 信芳（ESAKI NOBUYOSHI）
 京都大学・化学研究所・教授
 研究者番号：50135597

研究成果の概要：必須微量元素セレンは、同族の硫黄と厳密に区別され、特定のタンパク質の特定の位置にセレノシステイン残基の形で取り込まれ、数々の重要な生理的役割を果たす。本研究では、セレン代謝とセレンタンパク質の生合成に関与するタンパク質・酵素群が成し遂げる厳密にセレン特異的な化学変換とその際のタンパク質や RNA の構造機能の詳細に明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：タンパク質、酵素、微量必須元素、セレン

1. 研究開始当初の背景

セレンタンパク質生合成因子についてはドイツ・ミュンヘン大学の A. Böck、米国 NIH の T. Stadtman、米国ハワイ大学の M. J. Berry からも研究を行っている。哺乳類におけるセレンタンパク質生合成の分子生物学的研究は米国クリーブランドクリニックの D. M. Driscoll らが行っている。化学的見地からの詳細な反応解析および構造生物学的解析は遅れており、本研究代表者らによる細菌型および哺乳類型セレノシステインリアーゼの構造機能解析の他には、大腸菌 SelB の C 末端ドメインの X 線構造解析しか例はない。セ

レンタンパク質は抗酸化作用を示すことから、ストレス耐性、老化、ガン化などに関連し、医学的にも非常に重要である。さらに、精巣における精子の形成に関与するセレノプロテイン P や甲状腺ホルモンの代謝を担う脱ヨード化酵素も哺乳類にとって重要である。必須微量元素の作用は、その微量さゆえに解析が難しく未開拓な部分が多い。セレンの研究は、鉄や銅に比べると、栄養学的な面と細胞、分子、原子のレベルとの橋渡しが未だ十分になされていない。特に、セレンタンパク質生合成に関与する因子は以前より同定されているものを含めて構造機能解析が

遅れており、未同定の必須因子が存在することも示されている。

これまでに本申請代表者らは、硫黄とセレンを含む補因子およびセレノシステイン残基の生合成の酵素学に焦点を合わせて数多くの成果を挙げた。特に最近では、次のような成果が得られている。(1) 哺乳類培養細胞における RNAi 法によってセレノシステインリアーゼ、セレノリン酸シンターゼなどの細胞内機能の詳細を明らかにした。(2) セレノシステインリアーゼの X 線結晶構造解析と分光学的手法により、本酵素がセレノシステインに特異的に作用しシステインには作用しないというセレン/硫黄識別機構を明らかにした。(3) セレノシステイン挿入に関与する mRNA 上のステムループに結合し、セレンタンパク質の生合成に関与する新たなタンパク質因子を2つ同定した。(4) 好熱性アーキア *Methanocaldococcus jannaschii* においては、真正細菌、哺乳類とは異なったセレンタンパク質生合成機構が存在する可能性を見出した。

2. 研究の目的

必須微量元素であるセレンは、同族の硫黄と生体内で厳密に区別され、特定のタンパク質(セレンタンパク質と総称される)の特定の位置にセレノシステイン残基の形で機能発現に必須の要素として取り込まれ、種々の重要な生理的役割を果たしている。セレンタンパク質のセレノシステイン残基の生成においては、翻訳後修飾あるいは遊離のセレノシステインが直接取り込まれるのではない。本研究代表者らが見出したセレノシステインリアーゼ(SCL)を含む一連のセレン特異的な酵素群による化学変換を受けて、セリル-tRNA からセレノシステイル-tRNA が生成し、これが共翻訳的にタンパク質に取り込まれる。この取り込みにおいては、特殊な翻訳因子群が介在し、UGA コドン(通常はストップコドン)がセレノシステインとして特異的にデコードされる。このように興味深いセレン化合物の化学変換とユニークな翻訳イベントがおこる。セレンの量を遥かに上回る硫黄豊富な生体内環境下で、各々の因子が構造と機能に基づいた緻密な選択的反応を遂行することにより、セレンが特異的に転移・代謝され、セレンタンパク質の生合成を恙なく進行させていると考えられる。そこでは、タンパク質-タンパク質間の特異的認識とセレン化合物の選択的リレー系が築き上げられていると考えられる。そこで、本研究の究極的な目的は、セレン代謝とセレンタンパク質の生合成に関与するタンパク質・酵素群が成し遂げる厳密にセレン特異的な化学変換とその際のタンパク質や RNA の構造機能の全貌を原子レベルで詳細に明らかにすること

により、セレンの微量必須元素としての機能発現制御の分子基盤を築き上げるところにある。この目標を達成するため、セレン代謝とセレンタンパク質生合成に関与する因子を網羅的に同定し、機能と構造の相関および化学変換の詳細を単独あるいは相互作用を介した複合体のレベルで詳細に解析する。

3. 研究の方法

(1) Sec-tRNA^{Sec}のセレン源であるセレノリン酸は、セレニドを基質として、セレノリン酸合成酵素 (SPS2) により合成される。しかし、セレニドは生体にとって毒性が高いため、遊離の状態ではほとんど存在しない。そのため、セレノシステインリアーゼ (SCL) がL-セレノシステインを特異的に分解し、生じたSeをペルセレニド (SCL-S-Se-H) の形で保持し、これがSPS2 への基質供給源になると考えられている。SCL-S-Se-HのSeがSPS2 へ転移される過程では、SPS2 がSCLと相互作用することが示唆されているが、それらの相互作用およびセレンの転移機構は明らかになっていない。一方、SPS2 のホモログとして、セレノリン酸合成活性を持たないSPS1 が見出されているが、その機能は不明である。SPS2 がSCLに相互作用するのであれば、アミノ酸配列相同性の高い (64%) SPS1 もSCLに相互作用する可能性がある。そこで、この3者間 (SCL、SPS2、SPS1) の相互作用および、それらが活性に与える影響を調べた。マウス由来タンパク質 (SCL、SPS1、SPS2) の遺伝子をクローニングし、yeast two-hybrid system および *in vitro* 翻訳産物を用いた免疫沈降法により、これらタンパク質間の相互作用解析を行った。

(2) 一般的なアミノアシルtRNAは、それぞれ特異的なアミノアシルtRNA合成酵素の働きにより、一段階の反応でアミノ酸が直接tRNAに付加(アミノアシル化)される。しかし、前述のようにSec-tRNA^{Sec}は、Secが直接tRNA^{Sec}に付加されるのではなく、一度セリンがtRNA^{Sec}に付加され、セリン分子種がセレノシステイン分子種に変換されて合成される。したがって、SerRSは、セリン特異的tRNA (tRNA^{Ser}) およびセレノシステイン特異的tRNA^{Sec} の両方にセリンを付加する重要な酵素である。メタン生成アーキアのSerRSは、真核生物や真正細菌、他のアーキアのいずれとも異なる機能未知なN末端領域を有する。*M. jannaschii* SerRSのN末端領域を対象とした相同性検索を行い、本領域がリン酸化酵素である *M. jannaschii* PSTKと相同性を有することを見出した。そこで、この特徴的なN末端領域を持つ*M. jannaschii* SerRSの機能を解析した。*M. jannaschii* ゲノムからSerRSとPSTKに相当する遺伝子をクローニングし、大腸菌を宿主とする発現系を構築した。これ

らの精製タンパク質をtRNA、ATP、 $[^{14}\text{C}]$ serineを含む溶液中で反応させ、アミノアシル-tRNAを合成した。余剰な $[^{14}\text{C}]$ serineを取り除き、アルカリ加水分解によりtRNAに付加したアミノ酸を遊離させ、薄層クロマトグラフィーにより分析した。本方法により、tRNAに付加された $[^{14}\text{C}]$ serine由来のアミノ酸のみが検出される。

セレンタンパク質をもつマウスや大腸菌にも*M. jannaschii* tRNA^{Sec}と相同性の高いtRNA^{Sec}が存在する。しかし、マウスおよび大腸菌のtRNA^{Sec}を基質とした場合、*M. jannaschii* SerRSはSer-tRNA^{Sec}を合成したが、P Ser-tRNA^{Sec}の合成はできなかった。そこで、*M. jannaschii* SerRSがP Ser-tRNA^{Sec}を合成する上で、*M. jannaschii* tRNA^{Sec}のいずれの塩基が重要かを調べた。

(3) *M. jannaschii* SerRSはアミノアシル化とリン酸化の2つの反応を触媒し、以下のどちらかの過程を経てP Ser-tRNA^{Sec}を合成すると考えられた。(a) セリンをtRNA^{Sec}に付加し、その後Ser-tRNA^{Sec}をリン酸化する。(b) 遊離のセリンをリン酸化し、その後ホスホセリンをtRNA^{Sec}に付加する。そこで、本酵素のP Ser-tRNA^{Sec}合成機構を調べるため、セリンとtRNA^{Sec}を基質とするのではなく、予め調製した $[^{14}\text{C}]$ Ser-tRNA^{Sec}を基質として反応を行った。

アミノアシル化反応とリン酸化反応には、それぞれにATPが要求される。これまでの研究から、SerRSのATP結合部位はC末端側に存在することが示されている。しかし、*M. jannaschii* PSTKとのアミノ酸配列の比較から、*M. jannaschii* SerRSのN末端領域にもう一つのATP結合部位が推定された。そこで、P Ser-tRNA^{Sec}合成においてN末端側の推定ATP結合部位の関与を調べるため、特に保存性が高い残基Lys15をAlaに変換した変異型SerRS-K15Aを調製した。精製後、この変異型SerRSのP Ser-tRNA^{Sec}合成能を調べた。

4. 研究成果

(1) yeast two-hybrid system および *in vitro* 翻訳産物を用いた免疫沈降法の両解析において、SPS1とSPS2が相互作用することが示された。また、ゲル濾過および非還元SDS-PAGEの結果から、SPS1とSPS2が各々ジスルフィド結合によりホモ二量体を形成することが示唆された。また、免疫沈降法を用いた相互作用解析では、SCLと両SPSとの相互作用が検出され、これら相互作用はセレノシステインとATPアナログ体の添加により強化されることを見出した。しかし、SPS1およびSPS2は、SCL活性には影響を与えなかった。次に、SCLとSPS1がSPS2活性に与える影響を調べた。SPS2はセレニドとATPおよびH₂Oを基質として、セレノリン酸、リン酸

およびAMPを生成するので、AMP生成量を測定することによりSPS2のアッセイを行った。亜セレン酸をDTTで還元して生成したセレニドを直接SPS2に供給した場合、SPS1はSPS2活性に影響を与えなかった。しかし、SCL-S-Se-Hをセレン源として供給した場合、SPS1はSPS2の活性を50%程度にまで低下させた。これらのことから、SPS1はSCLと相互作用し、SCLからSPS2へのSeの転移を阻害する機能を持つことが示唆された。

(2) tRNA^{Ser}を基質とした場合、通常のアミノアシル化反応により、Ser-tRNA^{Ser}のみの合成が認められた。それに対し、tRNA^{Sec}を基質とした場合、Ser-tRNA^{Sec}の他にもうひとつアミノアシル-tRNA^{Sec}が合成された。薄層クロマトグラフィーおよびペーパークロマトグラフィーを用いた解析により、このアミノアシル-tRNA^{Sec}はP Ser-tRNA^{Sec}であることが示された。これらの結果より、従来知られるSerRSはセリンを付加するアミノアシル化反応のみを触媒するのに対し、*M. jannaschii*のSerRSはSer-tRNA^{Sec}とP Ser-tRNA^{Sec}の両方を合成する活性をもつことを初めて明らかにした。また、哺乳類のSec-tRNA^{Sec}合成において必須因子であるPSTKが、*M. jannaschii*のSec-tRNA^{Sec}合成には必須ではないことが示された。

tRNA^{Sec}の配列比較および既知の知見から、*M. jannaschii* tRNA^{Sec}特異的な2つの部位に着目した。*M. jannaschii* tRNA^{Sec}の塩基をマウスや大腸菌型に変換した2つの変異型tRNA^{Sec} (G37A、G2C-C71G)を調製し、それらを基質とした場合のP Ser-tRNA^{Sec}合成を調べた。*M. jannaschii*の野生型tRNA^{Sec}を基質とした場合に比べ、G2C-C71G変異型tRNA^{Sec}を基質とした場合では、P Ser-tRNA^{Sec}の合成量が約10%にまで減少した。一方、G37A変異型tRNA^{Sec}を基質とした場合は、P Ser-tRNA^{Sec}合成量に顕著な差は認められなかった。以上の結果から、*M. jannaschii* tRNA^{Sec}のG2-C71塩基対が*M. jannaschii* SerRSによるP Ser-tRNA^{Sec}合成に重要な塩基の一つであることが明らかになった。

(3) 反応産物を調べた結果、Ser-tRNA^{Sec}からP Ser-tRNA^{Sec}への変換が認められた。一方、遊離のセリンをリン酸化する活性は認められなかった。これらの結果から、*M. jannaschii* SerRSは、アミノアシル化によりSer-tRNA^{Sec}を合成し、それをリン酸化してP Ser-tRNA^{Sec}を合成するという一連の反応を単独で触媒する新奇二機能性酵素であることが明らかになった。

野生型SerRSと比べ、変異型SerRS-K15AではP Ser-tRNA^{Sec}合成量が約6%にまで低下した。一方、Ser-tRNA^{Sec}の合成量には変化が認められなかった。これらの結果により、Ser-tRNA^{Sec}のリン酸化には、*M. jannaschii* SerRSの特

微的なN末端領域に存在するLys 15 が重要であることが明らかになった。

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 16 件)

1. Abe K, Mihara H, Nishijima Y, Kurokawa S, Esaki N (2008) Functional analysis of two homologous mouse selenophosphate synthetases, *Biomed. Res. Trace Elem.* 19, 76-79. 査読有.
2. Abe K, Mihara H, Tobe R, Esaki N (2008) Characterization of human selenocysteine synthase involved in selenoprotein biosynthesis, *Biomed. Res. Trace Elem.* 19, 80-83. 査読有.
3. Kudou D, Misaki S, Yamashita M, Tamura T, Esaki N, Inagaki K (2008) The role of cysteine 116 in the active site of the antitumor enzyme L-methionine g-lyase from *Pseudomonas putida*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1722-1730. 査読有.
4. Kurata A, Fujita M, Mowafy AM, Kamachi H, Kurihara T, Esaki N (2008) Production of (S)-2-chloropropionate by asymmetric reduction of 2-chloroacrylate with 2-haloacrylate reductase coupled with glucose dehydrogenase, *J. Biosci. Bioeng.* 105, 429-431. 査読有.
5. Kurihara T, Esaki N (2008) Bacterial hydrolytic dehalogenases and related enzymes: occurrences, reaction mechanisms, and applications, *Chem. Rec.* 8, 67-74. 査読有.
6. Kurokawa S, Mihara H, Yokoyama I, Mochizuki M, Yodoi J, Tamura T, Kurihara T, Esaki N (2008) Thioredoxin Reductase 1 Is Important for Selenoprotein Biosynthesis in HeLa Cells, *Biomed. Res. Trace Elem.*, 84-87. 査読有.
7. Mihara H, Hidese R, Yamane M, Kurihara T, Esaki N (2008) The *iscS* gene deficiency affects the expression of pyrimidine metabolism genes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 407-411. 査読有.
8. Sato S, Kurihara T, Kawamoto J, Hosokawa M, Sato SB, Esaki N (2008) Cold adaptation of eicosapentaenoic acid-less mutant of *Shewanella livingstonensis* Ac10 involving uptake and remodeling of synthetic phospholipids containing various polyunsaturated fatty acids, *Extremophiles.* 査読有.
9. Takahata M, Tamura T, Abe K, Mihara H,

- Kurokawa S, Yamamoto Y, Nakano R, Esaki N, Inagaki K (2008) Selenite Assimilation into Formate Dehydrogenase H Depends on Thioredoxin Reductase in *Escherichia coli*, *J. Biochem.* 143, 467-473. 査読有.
10. Fujita M, Mihara H, Goto S, Esaki N, Kanehisa M (2007) Mining prokaryotic genomes for unknown amino acids: a stop-codon-based approach, *BMC Bioinformatics* 8, 225. 査読有.
11. Kawamoto J, Kurihara T, Kitagawa M, Kato I, Esaki N (2007) Proteomic studies of an Antarctic cold-adapted bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, for global identification of cold-inducible proteins, *Extremophiles* 11, 819-826. 査読有.
12. Kudou D, Misaki S, Yamashita M, Tamura T, Takakura T, Yoshioka T, Yagi S, Hoffman RM, Takimoto A, Esaki N, Inagaki K (2007) Structure of the antitumor enzyme L-methionine g-lyase from *Pseudomonas putida* at 1.8 angstrom resolution, *J. Biochem.* 141, 535-544. 査読有.
13. Miyake R, Kawamoto J, Wei Y-L, Kitagawa M, Kato I, Kurihara T, Esaki N (2007) Construction of a Low-Temperature Protein Expression System Using a Cold-Adapted Bacterium, *Shewanella* sp. Strain Ac10, as the Host, *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4849-4856. 査読有.
14. Omi R, Jitsumori K, Yamauchi T, Ichiyama S, Kurihara T, Esaki N, Kamiya N, Hirotsu K, Miyahara I (2007) Expression, purification and preliminary X-ray characterization of DL-2-haloacid dehalogenase from *Methylobacterium* sp. CPA1, *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 63, 586-589. 査読有.
15. Yamanishi Y, Mihara H, Osaki M, Muramatsu H, Esaki N, Sato T, Hizukuri Y, Goto S, Kanehisa M (2007) Prediction of missing enzyme genes in a bacterial metabolic network - Reconstruction of the lysine-degradation pathway of *Pseudomonas aeruginosa*, *FEBS J.* 274, 2262-2273. 査読有.
16. Yoshida M, Oikawa T, Obata H, Abe K, Mihara H, Esaki N (2007) Biochemical and genetic analysis of the γ -resorcyate (2,6-dihydroxybenzoate) catabolic pathway in *Rhizobium* sp strain MTP-10005: Identification and functional analysis of its gene cluster, *J. Bacteriol.* 189, 1573-1581. 査読有.

〔学会発表〕(計 7件)

1. 戸部隆太、セレノシステインリアーゼと相互作用するタンパク質の解析、第19回日本微量元素学会、2008年7月3日、東京都千代田区
2. Esaki Nobuyoshi、Mechanism of selenocysteine lyase: strict discrimination between selenium and sulfur、2007年10月24日、ISTERH/NTES/HITES 2007、Crete. Greece
3. Mihara Hisaaki、The Cellular Function of Selenocysteine Lyase in Selenoprotein Synthesis、2007年10月24日、Crete. Greece
4. 江崎信芳、セレン生化学研究の進展、第18回日本微量元素学会、2007年7月5日、福井県福井市
5. Mihara Hisaaki、A comparative study between selenocysteine lyase and cysteine desulfurase、The 9th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine、2006年7月26日、Madison, WI, USA
6. Esaki Nobuyoshi、Mechanism of selenocysteine lyase: strict discrimination between selenium and sulfur、The 9th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine、2006年7月26日、Madison, WI, USA
7. 三原久明、セレンタンパク質の生合成とセレン特異的酵素、第17回日本微量元素学会、2006年7月17日、静岡県静岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江崎 信芳 (ESAKI NOBUYOSHI)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：50135597

(2) 研究分担者

栗原 達夫 (KURIHARA TATSUO)

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号：70243087

三原 久明 (MIHARA HISAAKI)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：30324693