

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2011

課題番号：20570148

研究課題名 (和文) セレノシステイン生合成システムの構造生物学

研究課題名 (英文) Structural biology of the selenocysteine synthesis system.

研究代表者

関根 俊一 (SEKINE SHUN-ICHI)

東京大学・大学院理学系研究科・特任准教授

研究者番号：50321774

研究成果の概要 (和文)：

セレン(Se)はヒトを含め多くの生物の生存に必須の微量元素であり、細胞内では「21 番目のアミノ酸」として知られるセレノシステイン(Sec)の構成要素としてタンパク質に取り込まれている。Sec の生合成の構造基盤を明らかにするために、関与するタンパク質ないし tRNA の X 線結晶構造解析を行い、ほぼすべてについて構造決定に成功し、Sec 生合成の分子基盤の解明に大きく貢献した。

研究成果の概要 (英文)：

Selenium is an essential micronutrient for many organisms, including humans. It is present in proteins as a selenocysteine (Sec) residue(s), which is known as the 21st amino acid that is translationally incorporated into proteins. To elucidate structural basis of selenocysteine biosynthesis, we determined 3D structures of these proteins and tRNA by X-ray crystallography.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：セレノシステイン, セレン, 翻訳, tRNA, サプレッサー, X 線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

セレン(Se)はヒトを含め多くの生物の生存に必須の微量元素である。反応性に富み、それ自体は有毒であるが、生物は Se を取り込んで有効に利用する仕組みを備えている。Se は、生体内では主にセレノシステイン(Sec)とよばれるアミノ酸として一部のタンパク質(セレン含有タンパク質)に取り込まれたかたちで存在している。Sec はシステインの硫黄原子(S)がセレン原子(Se)で置換された高反応性のアミノ酸である(図1)。セレン含有タンパク質の多くは酸化還元反応や抗酸化作用を司るが、Sec はその活性中心として用いられている。このように、生物は Se をアミノ酸として安全に取り込み、その高い反応性を有効に活用している。

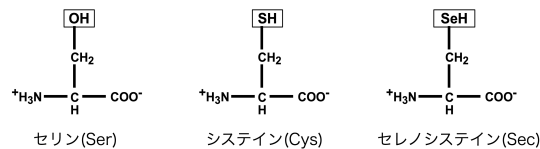


図1. セレノシステインの構造

Sec は「21 番目のアミノ酸」として知られており、翻訳後修飾ではなく、タンパク質合成系を利用して遺伝暗号にしたがってタンパク質に取り込まれる。20 種類の基本的なアミノ酸とは異なり、固有のタンパク質群をもちいて専用の tRNA (tRNA^{Sec}) 上で合成され、セレン含有タンパク質の遺伝子中の UGA コドン(通常は終止コドン)を Sec コドンに読みかえて正確に挿入される。このシステムは、遺伝暗号の進化を研究する上で重要であるだけでなく、遺伝暗号を拡張して有用なアミノ酸を部位特異的にタンパク質に導入する技術開発のための基盤となると期待されている。しかしながら、Sec の生合成の分子機構の構造基盤については国内外ともあまり研究が進んでいなかった。

2. 研究の目的

Sec は複数の段階を経て tRNA^{Sec} に結合したかたちで (Sec-tRNA^{Sec} として) 合成される(図2)。tRNA^{Sec} は Sec 専用の tRNA で、

UGA コドン (opal コドン) に対応するアンチコドンを持ち、その構造も標準的な tRNA とは大きく異なる。まず、tRNA^{Sec} はセリル tRNA 合成酵素(SerRS)によってその 3'末端にセリン(Ser)を付加される(Ser-tRNA^{Sec})。次に、セレノシステイン合成酵素(SelA)が、セレン化リン酸合成酵素(SelD)から供給されるセレン化リン酸(Se-P)を受け取って、tRNA^{Sec} 上で Ser を Sec に変換する。真核生物および古細菌では、このステップの前に Ser-tRNA^{Sec} が O-ホスホセリル tRNA キナーゼ (PSTK) によってリン酸化され、P-Ser-tRNA^{Sec} となっている必要がある。完成した Sec-tRNA^{Sec} は、tRNA^{Sec} に特異的な翻訳伸長因子によってリボソームに運ばれ、セレン含有タンパク質の特定の UGA コドンの位置に Sec が挿入される。

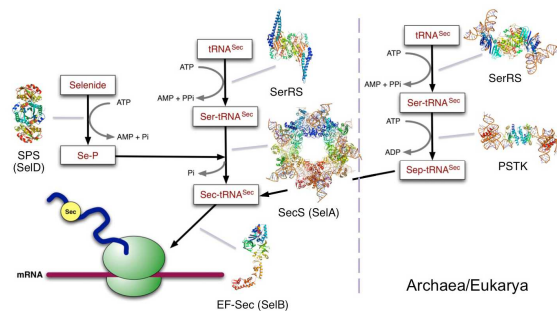


図2. セレノシステインの合成とタンパク質への導入

Sec の合成は tRNA^{Sec} 上で起こる一連の反応によって達成されており、また、そのために tRNA^{Sec} はタンパク質間でスムーズに受け渡されていくものと考えられる。このように、Sec の生合成を担うタンパク質群や tRNA^{Sec} は、一連の反応を達成するために緊密に連携したひとつのシステムとしてとらえることができる。本研究では、その動作機構の解明を目指し、各タンパク質や tRNA の複合体の構造解析および機能解析を行った。

3. 研究の方法

細菌、古細菌ないしヒト由来の Sec 合成系タンパク質 (SelA, SelB, SerRS, PSTK 等) および tRNA^{Sec} について、それぞれ単独またはタンパク質・RNA 複合体の結晶を作成し、

X線結晶構造解析を行った。得られた立体構造の情報をもとに変異体解析を行い、作用機構を明らかにした。

4. 研究成果

(1) セレノシステイン tRNA (tRNA^{Sec})

tRNA^{Sec}は、標準的な tRNA とは異なる独特の配列や構造を持った tRNA であり、Sec の生合成および翻訳において中心的な役割を果たす。Sec の合成は tRNA^{Sec} に結合したアミノ酸を次々に変換することで達成され、Sec の翻訳は tRNA^{Sec} の持つ UGA コドンに対応するアンチコドンに依存している。しかしながら、これまで tRNA^{Sec} の立体構造は解明されていなかった。

我々は、ヒトの tRNA^{Sec} の X 線結晶構造解析に成功し、tRNA^{Sec} の三次元構造をはじめて明らかにした。tRNA^{Sec} は、他の tRNA とは異なるユニークな構造的特徴をもっていた。標準的な tRNA とは異なる二次構造があり、さらに独特の三次元的相互作用が見られた。また、通常と異なり、D アームとエクストラアームが相互作用しないため、tRNA^{Sec} はその中心が空洞になっていた。これらのユニークな構造的特徴の一部または全部が、Sec 合成系の各酵素・タンパク質が tRNA^{Sec} を認識するための目印として役立っていると考えられる。

(2) セリル tRNA 合成酵素 (SerRS)

セリル tRNA 合成酵素(SerRS)は、tRNA の 3'末端にセリンを結合させる酵素で、Sec 合成の最初の段階をつかさどる。我々は、古細菌 *Pyrococcus horikoshii* の SerRS の結晶構造を決定した。SerRS と tRNA のドッキング

グのモデルを作製したところ、SerRS のヘリカルドメインが、tRNA^{Sec} および tRNA^{Ser} に特徴的なエクストラアームの認識に関与していることが示唆された。

(3) O-ホスホセリル tRNA キナーゼ (PSTK)

真核生物および古細菌では、SerRS によって合成された Ser-tRNA^{Sec} は、O-ホスホセリル tRNA キナーゼ(PSTK)によってリン酸化され、P-Ser-tRNA^{Sec} となった後に Sec-tRNA^{Sec} に変換される。ここで、PSTK は、tRNA^{Sec} と tRNA^{Ser} を含む他の tRNA とを厳密に識別し、前者だけをリン酸化して Sec の合成経路へと導く分岐ポイントとしての役割を担っている。この厳密な tRNA の選別は、tRNA^{Sec} に特有の構造的特長を、PSTK が特異的に認識しているために可能となっていると考えられるが、その詳細は不明であった。

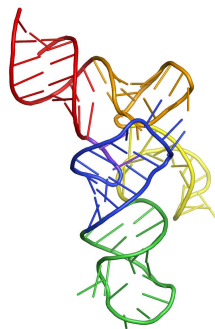


図3. ヒト由来 tRNA^{Sec} の結晶構造

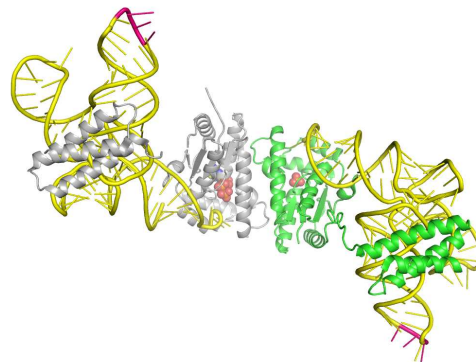


図4. PSTK と tRNA^{Sec} の複合体の結晶構造

我々は PSTK と tRNA^{Sec} との複合体の結晶構造解析に成功し、そのしくみを明らかにした (図4)。PSTK は N 末端ドメインと C 末端ドメイン、およびこれらのドメインを連結する長いリンカーから成っている。PSTK の N 末端ドメインと C 末端ドメインは、それぞれ独立に tRNA^{Sec} のアクセプターシステムと D アームとよばれる部位に結合していた。tRNA^{Sec} の D アームの構造は他の tRNA とは異なっており、PSTK の C 末端ドメインはこの固有の構造にぴったりと適合していた。変異体解析の結果、C 末端ドメインが PSTK と tRNA^{Sec} 間の結合および酵素活性に重要なことが明らかになった。つまり、PSTK は、主

にその C 末端ドメインと D アームとの適合性に基づいて tRNA^{Sec} と他の tRNA を見分け、tRNA^{Sec} のみをリン酸化して Sec 合成の経路へと導いていることが明らかになった。

(4) セレノシステイン合成酵素(SelA)

Sec 合成の最終段階では、セレノシステイン合成酵素(SelA)が、セレン化リン酸合成酵素(SelD)から供給されるセレン化リン酸(Se-P)を用いて、tRNA^{Sec} に結合した Ser を Sec に変換して Sec-tRNA^{Sec} を完成する (真核生物および古細菌では、PSTK によってリン酸化された P-Ser-tRNA^{Sec} が Sec-tRNA^{Sec} に変換される)。SelA は分子量約 50 kDa のタンパク質であるが、10 分子が会合して分子量 500 kDa の巨大な複合体を形成している。

我々は、好熱性細菌 *Aquifex aeolicus* 由来の SelA の結晶構造の決定に成功した(図)。SelA はホモ二量体を形成し、それが 5 つ集まって巨大な 5 回対称のリング(ホモ十量体)を形成していた。tRNA^{Sec} のアミノ酸受容末端は、それ以外の部分が結合している SelA サブユニットとは別のサブユニットの活性部位に結合していた。つまり、SelA が巨大な 5 回対称のリング構造をとっているのは、tRNA^{Sec} を適切な位置に配置して反応を行うためであることが明らかになった。

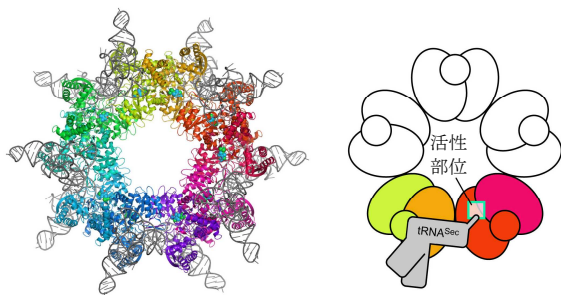


図5. SelA-tRNA^{Sec}複合体(左)およびSelAのサブユニットとtRNA^{Sec}の配置を示す模式図(右)

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計6件)

1. 関根俊一, 横山茂之, “セレンをタンパク質に正確に取り込む:セレノシステイン tRNA 認識の構造基盤”, 生物物理, 51 (6), 272-273 (2011). (査読無)

2. Chiba, S., Itoh, Y., Sekine, S. and Yokoyama, S. “Structural basis for the major role of O-phosphoseryl-tRNA kinase in the UGA-specific encoding of selenocysteine.” *Mol. Cell* 39, 410-420 (2010). (Referred)
3. Itoh, Y., Chiba, S., Sekine, S. and Yokoyama S. “Crystal structure of human selenocysteine tRNA.” *Nucleic Acids Res.* 37, 6259-6268 (2009). (Referred)
4. Itoh, Y., Sekine, S., Matsumoto, E., Akasaka, R., Takemoto, C., Shirouzu, M. and Yokoyama, S.. “Structure of selenophosphate synthetase essential for selenium incorporation into proteins and RNAs.” *J. Mol. Biol.* 385, 1456-1469 (2009). (Referred)
5. Itoh, Y., Sekine, S., Kuroishi, C., Terada, T., Shirouzu, M., Kuramitsu, S. and Yokoyama, S. “Crystallographic and mutational studies of seryl-tRNA synthetase from the archaeon *Pyrococcus horikoshii*.” *RNA Biol.* 5, 169-177 (2008). (Referred)
6. Matsumoto, E., Sekine, S., Akasaka, R., Otta, Y., Katsura, K., Inoue, M., Kaminishi, T., Terada, T., Shirouzu, M. and Yokoyama, S. “Structure of an N-terminally truncated selenophosphate synthetase from *Aquifex aeolicus*.” *Acta Crystallogr. F* 64, 453-458 (2008). (Referred)

〔学会発表〕(計5件)

1. Sekine, S. et al., “Implications for selenophosphate generation by crystal structure of selenophosphate synthetase” IUCR 2008, Aug.23-31, Osaka (2008).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.s.u-tokyo.ac.jp/press/press-2010-34.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 俊一 (SEKINE SHUN-ICHI)

東京大学・大学院理学系研究科・特任准教授
研究者番号: 50321774