

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14991

研究課題名(和文) セレンタンパク質生合成におけるセレン供与体の構造決定

研究課題名(英文) Verification of the structure of selenophosphate

研究代表者

小椋 康光 (Ogra, Yasumitsu)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：40292677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：21番目のアミノ酸として知られているセレノシステイン(Sec)は、tRNA上でセリンにセレノール基が供与されることで生合成されると言われている。この際のセレンの供与体として、SPS2という酵素により作られるセレノリン酸が知られているが、その構造は極めて脆弱に示唆されているに過ぎない。そこで本研究では、現在定説とされているセレノリン酸の構造が正しいか検証することを目的とし、セレン代謝の重要な経路の解明に挑んだ。その結果、SPS2で生合成されるセレン供与体が、セレノリン酸という構造を有していないと考えられる結論を得た。

研究成果の概要(英文)：Selenocysteine (Sec) is known as the 21st amino acid, and is required for an active center of several selenoproteins. Sec is biosynthesized on a tRNA charging serine, i.e., the hydroxyl group in serine is substituted to a selenol group from a donor of selenium (Se). Selenophosphate is proposed as the Se donor, however, the identification of selenophosphate is tenuous. The aim of this study is to verify the structure of selenophosphate by unambiguous analytical techniques. Selenophosphate was chemically synthesized. The NMR spectrum of chemically synthesized selenophosphate was not identical to the Se donor synthesized by selenophosphate synthetase 2 or Sel D which was an orthologue of SPS2. This suggests that selenophosphate is not the Se donor. We prepared mutant SPS2 which had a substitution of Sec to cysteine. Recombinant SPS2U60C will be used for the synthesis of Se donor in vitro, and the structure of Se donor will be concretely identified by several mass spectrometry.

研究分野：毒性学

キーワード：セレン セレノリン酸 スペシエーション ICP-MS

1. 研究開始当初の背景

セレンは動物体内で、グルタチオンペルオキシダーゼやチオレドキシシンレダクターゼなどの活性中心に要求される必須微量元素である。セレンは典型元素と金属元素の両方の物理化学的性質を併有した元素であり、酵素の活性中心では、システインの硫黄原子がセレン原子に置き換わったセレノシステインとして、ペプチド鎖に組み込まれた状態で存在している。

セレノシステインを含むセレンタンパク質の生合成機構として、セレノシステインを翻訳するために必要な tRNA の存在が知られており、この tRNA には当初セリンが結合している。このセリンの水酸基の酸素原子が、セレン供与体のセレン原子と置き換わることにより、セレノシステインを翻訳可能な tRNA (セレノシステイニル tRNA) となる。

セレノシステイニル tRNA へのセレン供与体として、セレノリン酸という化合物が機能すると報告されていた。しかし、研究代表者は報告されているセレノリン酸の化学的性質やセレノリン酸の同定に至る研究手法には疑問があることに気づき、従来から報告されているよりも厳格な同定手法により、セレン供与体の構造を明らかにする必要があることを着想した。

2. 研究の目的

従来から報告されているセレノリン酸を化学的に合成し、セレン供与体とされている化合物と同じ、物理化学的性質を示すのかを検討すること、セレン供与体の生合成を *in vitro* で行い、生成したセレン供与体の構造を各種質量分析計や NMR 等を用いて、厳格に構造を同定すること、の 2 点を研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) セレノリン酸の化学合成

現在提唱されているセレノリン酸 (H_3PO_3Se) を化学合成した。すなわち、トリメチルシリル化された亜リン酸に元素状のセレンを加え、50、12 時間還流し、トリメチルシリル化したセレノリン酸を得た。これを DMSO・水中でトリメチルシリル基を除き、セレノリン酸を得た。

(2) セレノリン酸の評価

上述で化学的に合成したセレノリン酸と文献上でセレノリン酸合成酵素 (SPS2) やその大腸菌オルソログの SelD を用いて生合成されたセレン供与体との比較を行った。

(3) 組換え変異型 SPS2 の精製

SPS2 により合成したセレン供与体の化学構造を決めるために必要な SPS2 の組換え体を得ることとしたが、SPS2 自身がセレンタンパク質であり、セレンタンパク質の生合成系を持たない大腸菌では SPS2 の組換え体を得

ることができないため、SPS2 のセレノシステイン残基をシステインに置き換えた変異型 SPS2U60C を得ることとした。なお、SPS2U60C は SPS2 と比べて 50% 程度の活性を有していることから、本実験の目的に使用するには問題ないものと判断した。

4. 研究成果

化学的にセレノリン酸を合成することに成功した。化学的に合成したセレノリン酸は、非常に不安定な化合物で、脱気条件下においても容易に Se が脱離、分解し、リン酸が生じた。一方、DTT などの還元剤の非存在下では、Se-Se 結合を持った二量体に酸化はされるものの、種々の分析を行うことができた。

質量分析の結果から、既報で想定されていた構造のセレノリン酸を合成できたものの、その NMR スペクトルは、文献上でセレノリン酸合成酵素 (SPS2) やその大腸菌オルソログの SelD を用いて生合成されたセレン供与体とは一致しなかった。

化学的に合成したセレノリン酸は、既報の Sel D により生合成されたセレン供与体と異なる ^{31}P NMR のスペクトルを示したことから、Sel D により生合成されるセレン供与体は、これまで提唱されてきたセレノリン酸の構造を有していないと考えられた。実際に今回化学合成したセレノリン酸は極めて反応性が高く、不安定であり、生体内においても制御が極めて難しいと考えざるを得なかった。

従って、SPS2 や Sel D で生合成されるセレン供与体は、セレノリン酸とは異なる化学形を有しているものと結論した。

SPS2U60C は、SPS2 に変異を導入し、発現ベクターを構築するに至った。今後は引き続き、SPS2U60C を利用して、各種機器分析と組み合わせて、セレン供与体の構造の完全解明に挑む。

挑戦的萌芽研究として着手した本研究は、従来から永らく信じられていたセレノリン酸がセレンの供与体として機能するという事実を覆すに足りる成果に結びついた。意義ある挑戦であったと自己評価している。

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)(全て査読有)

1. K. Takahashi, N. Suzuki and Y. Ogra: Bioavailability comparison of nine bioselenocompounds *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Mol. Sci.* (2017) **18**(3), 506 10.3390/ijms18030506
2. Y. Ogra, Y. Ogihara and Y. Anan: Comparison of metabolism of inorganic and organic selenium species between two selenium accumulator plants, garlic and Indian mustard. *Metallomics* (2017) **9**, 61-68 10.1039/C6MT00128A
3. M. Verdugo, Y. Ogra, and W. Quiroz: Mechanisms underlying the toxic effects of

- antimony species in human embryonic kidney cells (HEK-293) and their comparison with arsenic species. *J. Toxicol. Sci.* (2016) **41**, 783-792
4. Y. Anan, M. Kimura, M. Hayashi, R. Koike and Y. Ogra: Detoxification of selenite to form selenocyanate in mammalian cells. *Chem. Res. Toxicol.* (2015) **28**, 1803-1814 10.1021/acs.chemrestox.5b00254
 5. Y. Ogra, Y. Ogihara and Y. Anan: Metabolism of trimethylselenonium ion in selenium accumulator, *Allium sativum*. *Fundam. Toxicol. Sci.* (2015) **2**, 95-99
 6. Y. Anan, G. Nakajima and Y. Ogra: Complementary use of LC-ICP-MS and LC-ESI-Q-TOF-MS for selenium speciation. *Anal. Sci.* (2015) **31**, 561-564
 7. Y. Ogra, Y. Awaya and Y. Anan: Comparison of accumulation of four metalloids in *Allium sativum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (2015) **94**, 604-608 10.1007/s00128-015-1508-6

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 鈴木 紀行、渡邊 弘樹、堂浦 智裕、小椋 康光: セレンの酸化還元反応に基づく新規 ROS 蛍光プローブの開発. 日本薬学会第 137 年会、仙台、平成 29 年 3 月 27 日
2. 高橋 一聡、鈴木 紀行、小椋 康光: 血清セレンタンパク質に対するバイオセレン化合物の効果. 日本薬学会第 137 年会、仙台、平成 29 年 3 月 27 日
3. 小林 浩宜、鈴木 紀行、小椋 康光: バイオセレン化合物の変異原性評価. 日本学会第 137 年会、仙台、平成 29 年 3 月 27 日
4. Noriyuki Suzuki, Yasumitsu Ogra: Recent advances in analytical techniques for selenium compounds: 2016 Japan/Korea Joint Symposium on Pharmaceutical Health Science and Environmental Toxicology, Tokyo, Sept 10, 2016
5. 高橋一聡、鈴木紀行、小椋 康光: 天然由来セレン化合物の栄養的価値と生体活性の評価. フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー、東京、平成 28 年 9 月 10 日
6. Koichi Endo, Noriyuki Suzuki, Tomohiro Doura, Yasumitsu Ogra: Synthetic Study of a Novel Organoselenium Compound "Selenoneine": The 13th International Conference on the Chemistry of Selenium and Tellurium, Gifu, May 24, 2016
7. Hiroki Watanabe, Noriyuki Suzuki, Tomohiro Doura, Yasumitsu Ogra: Development of Fluorescent Probe for Reactive Oxygen Species Based on Selenium Redox Reaction: The 13th International Conference on the Chemistry of Selenium and Tellurium, Gifu, May 24, 2016
8. Yasumitsu Ogra (invited), Kazuaki Takahashi and Noriyuki Suzuki: Evaluation of naturally occurring selenocompounds on their nutritional availability. The International Selenium Seminar (ISS 2016), October 20-23, 2016, Guangzhou-Shenzhen, China
9. 小椋 康光 (依頼講演): LC-ICP-MS による化学形態分析 - 生物学的試料での応用 -、プラズマ分光分析研究会. 2016 筑波セミナー in 幕張、千葉幕張、平成 28 年 9 月 6 日
10. 小椋 康光 (依頼講演): 質量分析法を基盤としたセレノメタボローム解析. 第 43 回 BMS コンファレンス、静岡熱海、平成 28 年 7 月 5 - 6 日
11. 畠山鉄平、鈴木紀行、小椋 康光: 化学的アプローチによるセレノリン酸の構造の再評価. 日本薬学会第 136 年会、横浜、平成 28 年 3 月 29 日
12. 鈴木紀行、Shiow-Shih Tang、小椋 康光: 高空間分解能イメージング質量分析法によるセレノプロテインの可視化. フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー、神戸、平成 27 年 9 月 18 日
13. Yasumitsu Ogra (invited): Biosynthesis and biological role of selenocyanate. The 5th International Selenium Seminar 2015, September 21-25, 2015, Moscow-Yaroslavl, Russia
14. Yasumitsu Ogra (keynote): Identification of a novel selenium metabolite and elucidation of its biological and toxicological roles. 5th International Symposium on Metallomics, September 9-12, 2015, Beijing, China
15. 鈴木紀行、Shiow-Shih Tang、Claude Lechene、小椋 康光: 高空間分解能イメージング質量分析法によるセレノプロテインの可視化. 日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年、仙台、平成 27 年 6 月 11 日

〔図書〕(計 5 件)

1. Y. Ogra: Speciation and identification of chalcogen-containing metabolites. In: *Metallomics - Recent Analytical Techniques and Applications -*, Y. Ogra and T. Hirata (eds.), Springer, Tokyo, pp. 43-61 (2017)
2. N. Suzuki and Y. Ogra: ⁷⁷Se NMR spectroscopy for speciation analysis of selenium compounds. In: *Metallomics - Recent Analytical Techniques and Applications -*, Y. Ogra and T. Hirata (eds.), Springer, Tokyo, pp. 147-155 (2017)
3. Y. Ogra: Selenium metabolism. In: *Diversity of Selenium Functions in Health and Disease*, R. Brigelius-Flohé and H. Sies

- (eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp.19-30 (2015)
4. Y. Ogra: Identification of selenometabolites in animals and plants by mass spectrometry. In: *Food and Nutritional Components in Focus No. 9, Selenium: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, V.R. Preedy (ed.), The Royal Society of Chemistry, London, pp.158-172 (2015)
 5. Y. Ogra: Selenohomolanthionine and its potential use in medicine and nutrition. *Food and Nutritional Components in Focus No. 9, Selenium: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, V.R. Preedy (ed.), The Royal Society of Chemistry, London, pp.354-362 (2015)

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/yobou/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小椋 康光 (OGRA, Yasumitsu)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：4 0 2 9 2 6 7 7