

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19189

研究課題名(和文)高活性セレンタンパク質発現系の構築と応用

研究課題名(英文)Development and application of expression system for active selenoproteins

研究代表者

三原 久明(Mihara, Hisaaki)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：30324693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：セレンタンパク質には産業上有用なものが多いが、それらは活性中心に珍しいアミノ酸であるセレンシステイン残基を有している。セレンタンパク質の発現は生物種によって異なることから、微生物によるセレンタンパク質の異種高発現系には多くの課題が残っている。本研究では、この問題を解決すべく、大腸菌において機能するSECISを探索するためのルシフェラーゼレポーターアッセイ系を構築した。絶対嫌気性菌由来の9種のセレンタンパク質遺伝子のSECISについて、本レポーターアッセイ系を用いて大腸菌内での機能を調べた。その結果、5種類のSECISについては大腸菌内で機能することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セレンを有するタンパク質(セレンタンパク質)には抗酸化活性や糖尿病に関わるものなどがあり、医学・薬学的にも重要である。セレンタンパク質は哺乳類から細菌、アーキアに至るまで様々な生物に多種類見いだされている。セレンタンパク質を大量に生産することが可能となれば、産業利用が加速されると期待されるが、これまで効率の良いセレンタンパク質生産系は確立されていない。本研究では、産業用タンパク質の生産に広く使われている大腸菌における様々なセレンタンパク質の生産系の基盤を構築する成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Selenoproteins are expected to be useful in industries. Selenoproteins contains a selenocysteine residue in their active sites. Because there are several differences in the mechanisms of selenoprotein biosynthesis among Eukarya, Bacteria, and Archaea, microbial overproduction of heterologous selenoproteins has not been established. In this study, we constructed a luciferase-based reporter assay system that is useful for exploring SECISs that function in Escherichia coli. We examined the function of 9 SECIS structure from 9 selenoproteins genes from an obligately anaerobic bacterium using this reporter assay system in E. coli. We showed that 5 SECIS among 9 can be used as functional SECISs in E. coli.

研究分野：生化学、応用微生物学

キーワード：セレンタンパク質 タンパク質生産系

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

必須微量元素セレン (Se) は、生体内においては主に 21 番目のタンパク質構成アミノ酸として知られるセレノシステイン残基 (Sec) の形で存在する。Sec は、特殊なタンパク質 (セレントンパク質) の活性中心に取り込まれ、抗酸化作用など重要な生理的役割を果たす(1)。Sec は、通常はストップコドンである UGA コドンにコードされている。セレントンパク質 mRNA 上には、Sec 挿入配列 (SECIS) と呼ばれる特殊な二次構造 (39-100 bp) が存在し、この SECIS に特異的な翻訳伸長因子 SelB が結合することにより Sec のポリペプチド鎖への挿入が起こる (図 1) (2)。Sec の化学的性質はシステイン (Cys) に類似しているが、セレンール (-SeH) とチオール (-SH) の pKa の違いから、Sec は通常の生理条件下では、Cys よりも高い求核性を示す。これまで、ヒトでは、チオレドキシシン還元酵素に代表される 25 種類、細菌やアーキアにおいては、ギ酸脱水素酵素など哺乳類とは異なる約 30 種のセレントンパク質遺伝子が見出されている。セレントンパク質の生合成には、上記の特殊な翻訳装置が必要となる上、生物の種類 (ドメイン) により翻訳装置の構成因子や特徴が大きく異なる。そのため、大腸菌など汎用される細菌や酵母を宿主とする真核生物由来セレントンパク質遺伝子の

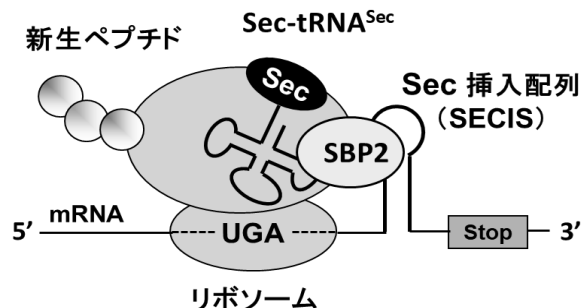


図 1. 細菌におけるセレントンパク質生合成の模式図

の異種発現系は確立されておらず、それらの精製酵素の獲得が非常に困難なことから、セレントンパク質の本来の形である Sec を有する native タンパク質の *in vitro* 解析は遅れている。

欧米、中国では Se が示す高い抗酸化作用に着目し、がんの治療や予防、抗老化などを対象として Se およびセレントンパク質の研究が進められている(1)。これまでもノックダウン細胞やノックアウトマウスを用いて、Se 欠乏やセレントンパク質欠損の影響を解析する細胞生物学的や栄養学的な観点からの研究例は多くなされている。さらに近年、高い抗酸化力を持つセレントンパク質を医薬品として応用する研究が注目されており、大腸菌や酵母を宿主とする真核生物由来セレントンパク質の高発現系の構築や精製タンパク質の獲得が強く望まれている。特に、グルタチオンペルオキシダーゼやセレノプロテイン P など医薬学的に注目される哺乳類のセレントンパク質が標的となっているが、未だ成功には至っていない。

## 2. 研究の目的

近年のゲノム解析技術の飛躍的な向上に伴い、数多くの微生物ゲノムが明らかになっており、その情報から微生物における新たなセレントンパク質がいくつも見出されている。しかし、これらセレントンパク質は細菌におけるコンセンサスな SECIS 配列を指標としたゲノム解析でのみ推測されており(3)、実際にセレントンパク質として実験的に解析されている例はほとんどない。本申請者は、先の探索方法では捉えられなかったセレントンパク質がまだ存在することを明らかにしている(4)。これは、現在考えられているコンセンサスな SECIS 配列が不完全なものであることを意味している。一方で、発現させたいターゲットとなるセレントンパク質遺伝子を、本来その遺伝子を有している生物内でリコンビナント発現させる同種発現系を用いれば、セレントンパク質の精製は基本的には可能であると考えられる。しかし、例えば、*Geobacter sulfurreducens* のような偏性嫌気性菌の場合、嫌気下での培養に手間がかかる上、生育が遅く、また菌密度も低いことから、この系ではセレントンパク質を得るのに非常に多くの時間、労力、費用が必要となる。また、大腸菌などのよく研究されている種以外の細菌においては、遺伝子工学的な実験手法が確立されていない場合も多く、形質転換法の検討など系を確立するところから始めなければならない。さらに、動物細胞やインビトロ翻訳、人工タンパク質合成を用いた系においても、セレントンパク質の獲得は可能であるが、酵素学および構造学的に解析できる量の精製セレントンパク質を得るためには、相当な時間、労力、費用がかかる。

本研究は、触媒反応性の高いセレントンパク質を産業的・医薬的に応用することで、様々な産業分野における生産性や医薬品としての効果を飛躍的に向上させることを最終目標とする挑戦的な研究である。長年、多くのセレントンパク質研究者が試みてきたセレントンパク質の高発現系の確立および精製セレントンパク質の獲得を目指す。ただし、これまで行われてきた研究とは観点を換え、標的を定めず、新たな方法を用いて発現量が高く、効率的に精製可能なセレントンパク質を探索するところから始めるのが本研究の特色である。本研究では、ハイスループットなリードスルーアッセイ系を構築し、大腸菌において発現量が高く、効率的に精製可能なセレントンパク質の探索を行う。哺乳類と同様に、細菌においても多数のセレントンパク質が見出されており、これらの多くは抗酸化酵素として機能していると考えられる。つまり、哺乳類のセレントンパク質でなくても細菌にも産業的・医薬的に利用可能なセレントンパク質が存在するのではないかと考えた。本研究成果により、大腸菌内において機能的な SECIS のコンセンサス配列を決定することができ、これを他のセレントンパク質にも応用できるようになればすべてのセレントンパク質が解析可能となる。さらには、現在、産業利用されている Cys 残基を活性中心と

する酵素の Cys を Sec に変えることにより、触媒機構における求核性の増大が見込まれ、飛躍的な触媒活性および生産性向上に繋がる可能性もある。

### 3. 研究の方法

複数種の異なるセレンタンパク質をもつ生物において、各々のセレンタンパク質遺伝子が有する SECIS の配列、長さ、形状にはコンセンサス構造が見いだされているものの、多様性が認められる (図 2)。多様な SECIS が存在する一方で SECIS に結合する翻訳伸長因子 (SelB) は宿主に固有のものである。従って、ある特定の生物種のセレンタンパク質遺伝子を異種宿主内で発現させる場合に、異種の SECIS への宿主 SelB の結合がうまく行かずに翻訳が進まないことがある。そこで、様々な生物種のセレンタンパク質の SECIS が大腸菌において機能し得るかどうかを判別するための解析システムの構築を目指した。まず、ゲノム上に 10 種のセレンタンパク質遺伝子を有する *G. sulfurreducens* を対象とし Bioinformatics Web Server for RNA (<http://rtools.cbrc.jp/>) を用いて各セレンタンパク質に対応する SECIS の推定を試みた。

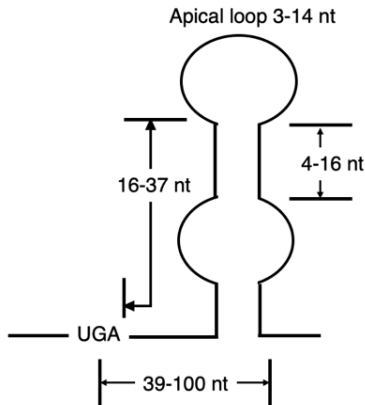


図 2. 細菌における SECIS のコンセンサス構造

次に、大腸菌宿主において、どのような構造の SECIS が機能しやすいのかを定量的に解析するために、大腸菌のセレンタンパク質であるギ酸脱水素酵素遺伝子 (*fdhF*) の開始コドンから SECIS 配列までを含む DNA 断片にホタル由来ルシフェラーゼ遺伝子 (*fLuc*) 断片を連結したコンストラクトを挿入したプラスミド (使用ベクター: pCold IV) を作製した。本プラスミドを大腸菌の野生株と *selB* 欠損株 (ネガティブコントロール) に導入し、解析条件の検討を行った。

さらに、構築したプラスミド内の SECIS 領域を *G. sulfurreducens* に存在する (推定を含む) セレンタンパク質由来の SECIS と入れ替えたものを大腸菌の野生株 (WT) に導入し、リードスルーアッセイを行なった。

### 4. 研究成果

ゲノム上に 10 種のセレンタンパク質遺伝子を有する *G. sulfurreducens* を対象とし Bioinformatics Web Server for RNA を用いて各セレンタンパク質に対応する SECIS の推定を行った結果、9 種のセレンタンパク質遺伝子 (*fdhA*, *hesB-like*, *selD*, *selW-like*, *prx-like*, *trx*, *grx*, *ahpD homolog*, *mhsep*) に対応する SECIS の配列および二次構造の予測を行い、図 3 に示す SECIS 構造を得た。

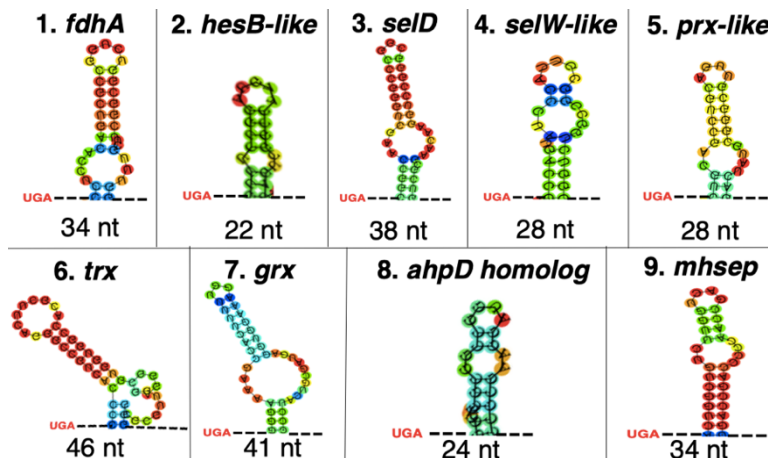


図 3. *G. sulfurreducens* ゲノムに見いだされた 9 種のセレンタンパク質遺伝子の推定 SECIS 構造

大腸菌宿主において、どのような SECIS が機能しやすいのかを定量的に解析するために、大腸菌のセレンタンパク質であるギ酸脱水素酵素遺伝子 (*fdhF*) の開始コドンから SECIS 配列までを含む DNA 断片にホタル由来ルシフェラーゼ遺伝子 (*fLuc*) 断片を連結したコンストラクトを挿入したプラスミドを作製した (図 4)。本コンストラクトを導入した大腸菌において、SECIS が機

能し UGA コドンのリードスルーが起こると、ルシフェラーゼレポーターを含む完全長の融合タンパク質が翻訳されるが、SECIS が機能しない場合は、UGA コドンで翻訳は停止し、ルシフェラーゼ領域を欠いた不完全なタンパク質が合成される。従って、ルシフェラーゼの活性を発光基質で感度良く測定することによって、本コンストラクトに挿入された SECIS の機能を評価することが可能であると考えた。実際に本コンストラクト（プラスミド）を大腸菌の野生株と *selB* 欠損株に導入し解析した結果、*selB* 欠損株では野生株の半分以下に発光強度が低減した。また、本解析コンストラクト上の Sec 挿入コドンである UGA を他の終止コドンである UAA になるよう変異を導入した pTAA、および、SECIS 領域を His-tag 配列に置換した pHis を作製した（図 5）。

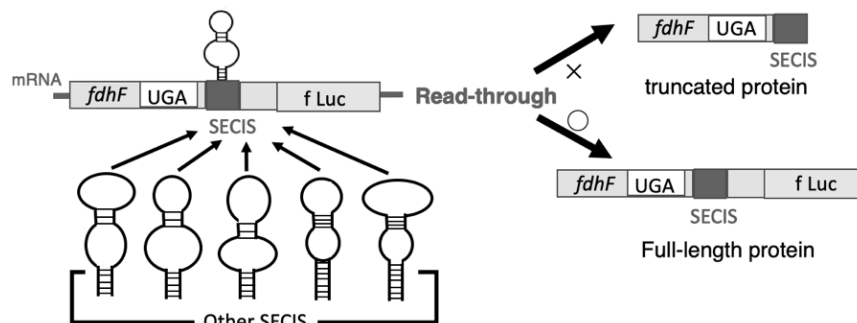


図 4. SECIS の機能評価を行うためのコンストラクトの模式図

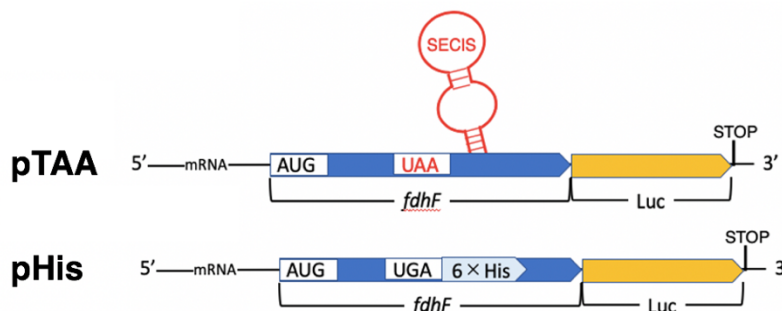


図 5. SECIS 機能評価用コンストラクトの変異型の模式図

作製した各 SECIS 機能評価用コンストラクトを大腸菌の野生株に導入して得られた菌体について、ルシフェラーゼアッセイを行なったところ、pTAA では発光が野生株の 1/9 に減少し、pHis では、発光が野生株の 1/2 に減少した（図 6）。これらの結果より、本アッセイ系が SECIS の機能の評価に利用可能なことが示された。

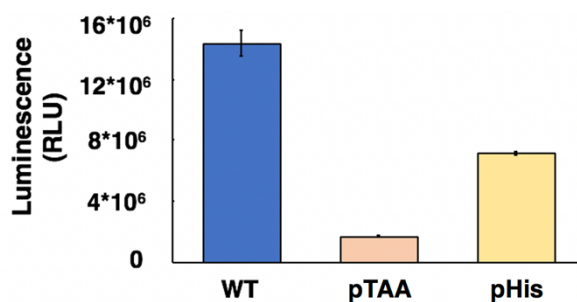


図 6. SECIS 機能評価用コンストラクトのルシフェラーゼアッセイ

そこで次に、図 3 に示した *G. sulfurreducens* が有する 9 種のセレンタンパク質遺伝子に対応する SECIS を、本コンストラクトの SECIS 部分に各々導入したプラスミドを作製した。これら各 SECIS 機能評価用プラスミドを大腸菌の野生株に導入し、ルシフェラーゼアッセイ系を用いて解析を行った。その結果、解析した SECIS の内、*selD*、*selW-like*、*prx-like*、*grx*、*ahpD homolog* の 5 種については、pHis よりも高いルシフェラーゼ活性が認められた。このことから、これら 5 種の SECIS は大腸菌内で機能する可能性があることが示唆された（図 7）。しかし、いずれの場合においても、元々の SECIS である大腸菌の *fdhF* 由来の SECIS (Control) と比較した場合、リードスルー効率は低いことが示唆された。よって、今後さらに詳細な解析が必要であると考えられた。

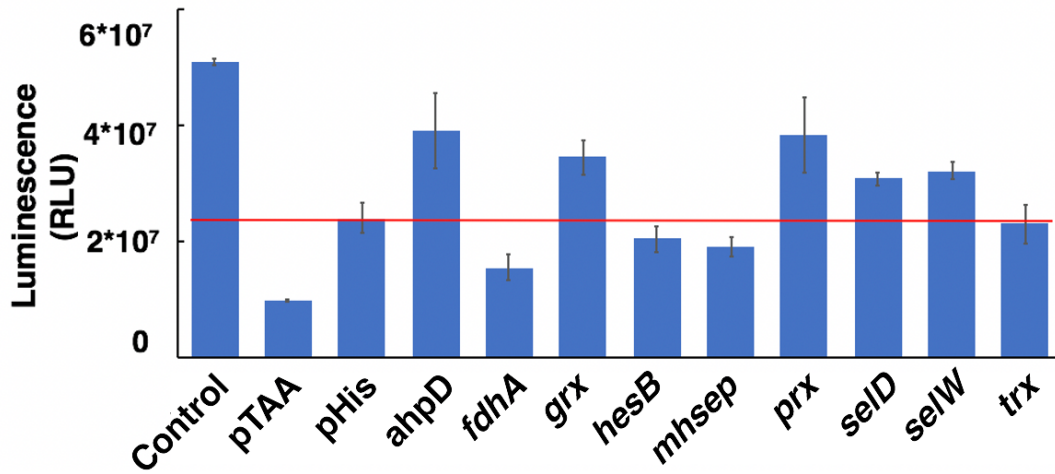


図7. 大腸菌における *G. sulfurreducens* の SECIS の機能評価

<引用文献>

- (1) M.P. Rayman, Selenium and human health, *Lancet* 379 (2012) 1256-1268. 10.1016/S0140-6736(11)61452-9.
- (2) T. Stock, M. Rother, Selenoproteins in Archaea and Gram-positive bacteria, *Biochim Biophys Acta* 1790 (2009) 1520-1532. 10.1016/j.bbagen.2009.03.022.
- (3) Y. Zhang, V.N. Gladyshev, An algorithm for identification of bacterial selenocysteine insertion sequence elements and selenoprotein genes, *Bioinformatics* 21 (2005) 2580-2589. 10.1093/bioinformatics/bti400.
- (4) M. Fujita, H. Mihara, S. Goto, N. Esaki, M. Kanehisa, Mining prokaryotic genomes for unknown amino acids: a stop-codon-based approach, *BMC Bioinformatics* 8 (2007) 225. 10.1186/1471-2105-8-225.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tobe Ryuta, Mihara Hisaaki	4. 巻 1862
2. 論文標題 Delivery of selenium to selenophosphate synthetase for selenoprotein biosynthesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 2433 ~ 2440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2018.05.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jahan Mst. Ishrat, Juengwiwattanakit Panudeth, Izu Yukiko, Tobe Ryuta, Imai Tomoya, Mihara Hisaaki	4. 巻 516
2. 論文標題 Selenite uptake by outer membrane porin ExtI and its involvement in the subcellular localization of rhodanese-like lipoprotein ExtH in Geobacter sulfurreducens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 474 ~ 479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.06.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jin Yunjung, Chung Youn Wook, Jung Min Kyo, Lee Jea Hwang, Ko Kwan Young, Jang Jun Ki, Ham Minju, Kang Hyunwoo, Paek Chan Gi, Mihara Hisaaki, Kim Ick Young	4. 巻 77
2. 論文標題 Apolipoprotein E-mediated regulation of selenoprotein P transportation via exosomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 2367 ~ 2386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-019-03287-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計25件（うち招待講演 4件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 R. Tobe, A. Shimizu, S. Hagita, T. Ogawa, Y. Hirose, N. T. Prakash, T. Kurihara, H. Mihara
2. 発表標題 Functional analysis of thioredoxin in selenium delivery in bacteria
3. 学会等名 The 7th International Selenium Conference (Se2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸部隆太, 川上百香, 三原久明
2. 発表標題 タンパク質の工学的創製と高活性セレンタンパク質
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Champas, M. Yamauchi, R. Tobe, H. Mihara
2. 発表標題 Characterization of the substrate-binding protein DlcA of D-lysine transporter from Pseudomonas putida KT2440
3. 学会等名 第36回日本微量元素学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Champas, M. Yamauchi, R. Tobe, H. Mihara
2. 発表標題 Substrate specificity of DlcA of D-lysine ABC transporter from Psuedomonas putida
3. 学会等名 日本農芸化学会関西・中部支部2019年度合同神戸大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daiki FUJITA, Ryo NISHIDA, Ryuta TOBE, H. MIHARA
2. 発表標題 The NsrR is essential for the function of selenate/tellurate reductase via activation of the moeA gene in Escherichia coli
3. 学会等名 The 1st International Workshop on Metallomics and Nanoparticles (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Jakkaphan, R. Tobe, H. Mihara
2. 発表標題 Purification of glyoxylate oxidase from <i>Gluconobacter dioxyaceticus</i> A15
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 P. Juengwiattanakitti, M. I. Jahan, Y. Izu, Y. Ishido, R. Tobe, H. Mihara
2. 発表標題 Interaction between rhodanese-related sulfurtransferase ExtH and outer membrane porin ExtI in <i>Geobacter sulfurreducens</i>
3. 学会等名 第5回日本セレン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Mihara
2. 発表標題 Selenium metabolism in bacteria
3. 学会等名 The 1st International Workshop on Metallomics and Nanoparticles (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 . Mihara, M. I. Jahan, M. Jinno, N. Shimamoto, Y. Ishido, P. Juengwiattanakitti, Y. Izu, R. Tobe
2. 発表標題 A novel selenite-reducing system in the dissimilatory metal-reducing bacterium <i>Geobacter sulfurreducens</i>
3. 学会等名 Goldschmidt 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 H. Mihara, M. I. Jahan, P. Juengwiwattanakitti, Y. Izu, R. Tobe
2. 発表標題 Role of outer membrane porin ExtI in selenite reduction in a metal-reducing bacterium
3. 学会等名 The 8th International Selenium Conference (Se2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuta Tobe, T. Yoshizawa, Y. Izu, M. I. Jahan, B. Yoshimura, H. Matsumura, H. Mihara
2. 発表標題 Function and structure of multiheme-containing selenoprotein
3. 学会等名 The 8th International Selenium Conference (Se2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三原久明
2. 発表標題 Pseudomonas putidaのD-リジントランスポーターの基質特異性
3. 学会等名 第458回ビタミンB研究協議会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三原久明, 大場杏奈, 吉田吉孝, 石田哲夫, 戸部隆太
2. 発表標題 大腸菌ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼの触媒特性について
3. 学会等名 第457回ビタミンB研究協議会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大場杏奈, 吉田吉孝, 石田哲夫, 戸部隆太, 三原久明
2. 発表標題 大腸菌ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼが触媒する複数反応
3. 学会等名 日本ビタミン学会第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸部隆太, 吉澤拓也, 伊豆由記子, 吉村文太, 松村浩由, 三原久明
2. 発表標題 Geobacter sulfurreducensのマルチヘムセレンタンパク質型亜セレン酸還元酵素の機能・構造解析
3. 学会等名 第5回日本セレン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊樹, 戸部隆太, 三原久明
2. 発表標題 Bacillus subtilisのテルル酸還元メカニズムの解明
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊樹, 生田帆河, 戸部隆太, 川本純, 栗原達夫, 広瀬侑, 今井友也, N. T. Prakash, 三原久明
2. 発表標題 Bacillus属細菌のテルル酸還元酵素の同定
3. 学会等名 第30回日本微量元素学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中麻衣, 今井岳志, 戸部隆太, 三原久明
2. 発表標題 ペルオキシダーゼ活性を有するTruncated hemoglobin (Yjbl) の過酸化水素に対する反応
3. 学会等名 日本生物高分子学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石戸雄大, 山根祥延, 戸部隆太, 三原久明
2. 発表標題 Geobacter sulfurreducens由来のロダネーゼ様酵素ExtHの精製条件検討と諸性質解析
3. 学会等名 第62回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葛野侑香, 戸部隆太, 三原久明
2. 発表標題 Bacillus sp. NTP-1由来新奇DMSOレダクターゼファミリー酵素の研究
3. 学会等名 酵素・補酵素研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田大樹, 戸部隆太, 三原久明
2. 発表標題 大腸菌におけるセレン酸・テルル酸還元関連遺伝子群の解析
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田大樹, 森聡美, 西田亮, 安間友香理, 田島寛隆, 戸部隆太, 三原久明
2. 発表標題 大腸菌におけるセレン酸・テルル酸還元関連遺伝子群の解析
3. 学会等名 第36回日本微量栄養素学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三原久明, S. Champas, 山内美咲, 戸部隆太
2. 発表標題 Pseudomonas putida KT2440株由来D-リジントランスポーターによる基質認識
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸部隆太, 牧村康平, 坂本暁紀, T. N. Prakash, 三原久明
2. 発表標題 セレン耐性菌 Cellulomonas sp. D3a 株における亜セレン酸還元機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田大樹, 西田亮, 戸部隆太, 三原久明
2. 発表標題 転写調節因子 NsrR のモリブデン補因子生合成における役割
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究者データベース  
<http://research-db.ritsumeai.ac.jp/Profiles/64/0006361/profile.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	戸部 隆太  (Tobe Ryuta)  (00758823)	立命館大学・生命科学部・講師    (34315)	