

機関番号：34315

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21780094

研究課題名（和文）セレン転移タンパク質群の機能解析とセレントラフィッキング制御の解明

研究課題名（英文）Function of selenium-delivering proteins and regulation of selenium trafficking

研究代表者

三原 久明（MIHARA HISAAKI）

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：30324693

研究成果の概要（和文）：

本研究では、反応中間体複合体状態の構造解析、速度論解析、質量分析を駆使した解析により、セレン代謝とセレンタンパク質の生合成に関するタンパク質・酵素群が成し遂げる厳密にセレン特異的な化学変換の構造機能の全貌を原子レベルで詳細に明らかにし、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た。

研究成果の概要（英文）：

In this study, proteins and enzymes involved in selenium metabolism and selenoprotein biosynthesis are investigated by crystal structural analysis of proteins in the form of a complex with a reaction intermediate, kinetic analysis, and ESI-MS analysis. Structure-function relationships of selenium-specific chemical reactions by the proteins and enzymes were revealed, establishing a molecular basis for the function of selenium as a trace element.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：セレン、微量元素

1. 研究開始当初の背景

硫黄の同族元素であるセレンは哺乳類を含む多くの生物の必須微量元素であり、タンパク質のセレノシステイン残基として種々の生理機能を発揮する。硫黄を含む化合物に作用するほとんどの酵素がセレンと硫黄とを区別することなく対応するセレン化合物に働いてしまうことが知られており、これがセレンの毒性を特徴づける理由の一つとされている。通常は生体内のセレンの量は硫黄

の 1/100-1/1000 であり、微量なセレンが生理機能を発揮するためには、セレン特異的な系による代謝と利用が必須であると考えられる。セレン特異的な系であるセレンタンパク質生合成では、セレノシステイル-tRNA が合成された後に、リボソーム上で特異的な翻訳因子の介在により本来はストップコドンとして機能する UGA コドンにガイドされてセレノシステイン残基のポリペプチド鎖への挿入が起こる。一見すると単純そうに見える

セレノシステイル-tRNA 合成においては、セレンの反応性の高さ故に、その毒性を発揮させないようにするための特殊な仕組みが存在する。すなわち、セレンの転移に関するタンパク質群である。しかし、いかにして Stop or Go を制御しているのか、多量に存在する硫黄による阻害を免れセレンを特異的に利用する機構はどのようなものなのか、明らかにすべき重要な問題が多い。

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。本申請者が初めて cDNA クローニング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。セレンの量を遙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。ここでは、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。

2. 研究の目的

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) Two-hybrid 解析・pull-down 解析：セレノシステイル-tRNA の生成過程およびセレノシステインの共翻訳的挿入に関与

することが実証されている、あるいは関与する可能性が示唆されているタンパク質(SCL、SPS1、SPS2、SLA/LP、L30、eFsec、SBP2、SBP3)の各々を bait とした two-hybrid スクリーニング、および、タグを付けて発現させた各々のタンパク質を用いた pull-down 解析を行い、これらの因子に相互作用する新規タンパク質を探索した。

(2) セレノシステインが十二指腸から吸収されて血液中へ移行した際の挙動を調べるため、血球細胞との相互作用を調べた。

(3) *G. sulfurreducens* を 0.15, 1.5, 15 mM の MnO_2 , S, Fe_2O_3 , をそれぞれ含む液体培地で培養した。破碎した菌体の上清を用いてウェスタンブロットを行った

(4) セレノシステインリアーゼがセレンと硫黄を識別してセレノシステインのみに作用する機構について、反応中間体複合体状態の構造解析、速度論解析、質量分析を駆使して詳細に解析した。

(5) メタン生成アーキアの SerRS は、ユニークな機能未知 N 末端領域を有する。配列解析の結果、本 N 末端領域がリン酸化酵素である *M. jannaschii* PSTK と相同性をもつことを見出した。*M. jannaschii* SerRS 遺伝子を大腸菌で発現させて得た精製酵素の反応解析を行った。

4. 研究成果

(1) セレノシステイル-tRNA の生成過程およびセレノシステインの共翻訳的挿入に関与することが示唆されているタンパク質(SCL、SPS1、SPS2)の各々を bait とした two-hybrid スクリーニング、および、タグを付けて発現させた各々のタンパク質を用いた pull-down 解析を行い、これらの因子に相互作用するタンパク質を探索し、候補となるタンパク質を得た。

(2) セレノシステイン、亜セレン酸はいずれも、生体内のセレンタンパク質合成においてセレン源として用いられる。亜セレン酸は血中で赤血球に取り込まれ、還元された後に血漿中に放出されることが知られているが、セレノシステインの動態については明らかにされていない。本研究では、セレノシステインが赤血球に取り込まれることを初めて見出した。さらに、亜セレン酸とは異なり、セレノシステインは血漿成分存在下であっても赤血球から放出されないことが明らかとなった。

(3) *Geobacter sulfurreducens* のセレンタンパク質翻訳に関与すると考えられる SelB をクローニングし、その諸性質を調べた。また、本細菌に存在する新規セレンタンパク質である MHSEP の発現誘導条件を検討したところ、マンガンによって特異的に発現が誘導される可能性が示唆された。

(4) セレノシステインリアーゼの活性中心において基質から奪ったセレン原子を本酵素がどのようにして活性中心外に汲み出し、他のタンパク質へと転移するのかを明らかにした。

(5) *Geobacter sulfurreducens* は細胞の表面から細胞外の電子受容体となる金属化合物へ電子を移動させる能力をもつ。この還元過程で本菌はエネルギーを獲得し生育する。本菌のゲノム配列を解析した結果、サブユニットあたり 5 つのヘム結合部位と 1 つのセレノシステイン残基をもつ新奇タンパク質 MHSEP (multi-heme-containing selenoprotein) が見つかった。Cross over PCR 法により *P. aeruginosa* Cyt *C*₅₅₁ のペリプラズム移行シグナルを組み込んだ MHSEP 遺伝子断片の作製に成功した。また、この断片を pET22b Vector に挿入した同遺伝子発現用 Vector の作製に成功した。これら作製した 2 つの発現 Vector および *E. coli* 由来ヘム生合成系遺伝子の発現 Vector である pEC86 を同時に導入した三重形質転換体の作製に成功した。

(6) メタン生成アーキアの SerRS はアミノアシル化反応により Ser-tRNA^{Sec} を合成し、次いで Ser-tRNA^{Sec} をリン酸化する 2 段階反応により P-Ser-tRNA^{Sec} を合成する新奇二機能性酵素であることが明らかになった。また、その合成には tRNA^{Sec} の G2-C71 塩基対が重要部位の一つであることを見出した。さらに、Ser-tRNA^{Sec} のリン酸化には、*M. jannaschii* SerRS の特徴的な 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 15 件)

1. Kawamoto J, Sato T, Nakasone K, Kato C, Mihara H, Esaki N, Kurihara T. Favourable effects of eicosapentaenoic acid on the late step of the cell division in a piezophilic bacterium, *Shewanella violacea* DSS12, at high-hydrostatic pressures. *Environ Microbiol* In press. (2011) 査読有
2. Hidese R, Mihara H, Kurihara T, Esaki N. *Escherichia coli* dihydropyrimidine dehydrogenase is a novel NAD-dependent heterotetramer essential for the production of 5,6-dihydrouracil. *J Bacteriol* 193:989-993. (2011) 査読有
3. Zhang WJ, Urban A, Mihara H, Leimkuhler S, Kurihara T, Esaki N. IscS Functions as a Primary Sulfur-donating Enzyme by Interacting Specifically with MoeB and

MoaD in the Biosynthesis of Molybdopterin in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 285:2302-2308. (2010) 査読有

4. Omori T, Mihara H, Kurihara T, Esaki N. Distribution of phosphatidyl-D-serine in rat. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74:1953-1955. (2010) 査読有

5. Omi R, Kurokawa S, Mihara H, Hayashi H, Goto M, Miyahara I, Kurihara T, Hirotsu K, Esaki N. Reaction mechanism and molecular basis for selenium/sulfur discrimination of selenocysteine lyase. *J. Biol. Chem.* 285:12133-12139. (2010) 査読有

6. Yasuda MH, Ueda M, Okano K, Mihara H, Esaki N. Enzymatic Synthesis of Unnatural Amino Acids. *Asymmetric Synthesis and Application of -Amino Acids* 1009. (2009) 査読有

7. Yamauchi T, Goto M, Wu HY, Uo T, Yoshimura T, Mihara H, Kurihara T, Miyahara I, Hirotsu K, Esaki N. Serine racemase with catalytically active lysinoalanyl residue. *J. Biochem.* 145:421-424. (2009) 査読有

8. Tobe R, Mihara H, Kurihara T, Esaki N. Identification of proteins interacting with selenocysteine lyase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:1230-1232. (2009) 査読有

9. Omori T, Mihara H, Kurihara T, Esaki N. Occurrence of phosphatidyl-D-serine in the rat cerebrum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382:415-418. (2009) 査読有

10. Mihara H. Discrimination between selenium and sulfur by enzymes [Japanese]. *Biomed. Res. Trace Elem.* 20:218-225. (2009) 査読有

11. Jitsumori K, Omi R, Kurihara T, Kurata A, Mihara H, Miyahara I, Hirotsu K, Esaki N. X-Ray Crystallographic and Mutational Studies of Fluoroacetate Dehalogenase from *Burkholderia* sp Strain FA1. *J. Bacteriol.* 191:2630-2637. (2009) 査読有

12. Imai T, Mihara H, Kurihara T, Esaki N. Selenocysteine is selectively taken up by red blood cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:2746-2748. (2009) 査読有

13. Imai T, Mihara H, Kurihara T, Esaki N. Possible Role of Red Blood Cells in Selenocysteine Metabolism *Trace Nutri. Res.* 26:22-25. (2009) 査読有

14. Hidese R, Mihara H, Esaki N. 大腸菌由来新規 NADH 依存性ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼの機能解析. *ビタミン* 83:528-532. (2009) 査読有

15. Goto M, Yamauchi T, Kamiya N, Miyahara I, Yoshimura T, Mihara H, Kurihara T,

Hirotzu K, Esaki N. Crystal Structure of a Homolog of Mammalian Serine Racemase from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 284:25944-25952. (2009) 査読有

〔学会発表〕(計 27 件)

- 1.三原久明, 今井岳志, 栗原達夫, 江崎信芳. 血球細胞へのセレノシステインの取り込み. 日本微量栄養学会第 26 回学術集会. 2009 年 6 月 5 日. 京都リサーチパーク(京都府)
- 2.三原久明, 戸部隆太, 栗原達夫, 江崎信芳. セレンタンパク質生合成におけるセレン特異的運搬. 第 20 回日本微量元素学会学術集会. 2009 年 7 月 3 日. 京王プラザホテル(東京都)
- 3.三原久明, 戸部隆太, 栗原達夫, 江崎信芳. セレンタンパク質生合成におけるメタン生成アーキア由来セリル tRNA 合成酵素の新機能. 2009 年度酵素・補酵素研究会. 2009 年 7 月 10 日. アジュール奈良(奈良県)
- 4.三原久明. 含硫黄・含セレンバイオフィクターの生成に関わる酵素の機能・構造解析. BioJapan 2009. 2009 年 10 月 7 日. パシフィコ横浜(神奈川県)
- 5.三原久明, 栗原達夫, 江崎信芳. セレノシステイン残基の生成機構: セレノシステイル tRNA の生成を担う酵素群の解析. 第 82 回日本生化学会大会. 2009 年 10 月 22 日. 神戸国際会議場(兵庫県)
- 6.秀瀬涼太, 三原久明, 栗原達夫, 江崎信芳. ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ活性に影響を与える遺伝子の探索. 第 82 回日本生化学会大会. 2009 年 10 月 23 日. 神戸国際会議場(兵庫県)
- 7.田村隆, 佐藤久美, 今井岳志, 三原久明, 江崎信芳, 稲垣賢二. セレン輸送体はモノチオール型ではなくジチオール型蛋白質である. 第 82 回日本生化学会大会. 2009 年 10 月 23 日. 神戸国際会議場(兵庫県)
- 8.奥河内貴大, 田村隆, 高畑宗明, 三原久明, 江崎信芳, 稲垣賢二. セレノリン酸合成酵素 Sps1 は Sps2 抑制型アンチザイム機能を持つ. 第 82 回日本生化学会大会. 2009 年 10 月 23 日. 神戸国際会議場(兵庫県)
- 9.Zhang W, 三原久明, 栗原達夫, 江崎信芳. モリブドプテリン合成酵素と特異的に相互作用するシステインデスルフラゼの同定. 第 82 回日本生化学会大会. 2009 年 10 月 23 日. 神戸国際会議場(兵庫県)
- 10.大森勇門, 三原久明, 栗原達夫, 江崎信芳. ラットにおけるホスファチジル-D-セリンの同定. 2009 年度合同沖縄大会(日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部, 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部, 日本食品科学工学西日本支部). 2009 年 10 月 31 日. 琉球大学千原キャンパス(沖縄県)

11.三原久明, 江崎信芳. 必須微量元素セレンのタンパク質取込に関連するタンパク質の機能. ビタミン B 研究委員会シンポジウム. 2010 年 2 月 5 日. 千里ライフサイエンスセンター(大阪府)

12.谷川昌寛, 矢野成和, 三原久明, 立木隆, 若山守. 乳酸菌由来 N-メチル-L-アミノ酸オキシダーゼの大腸菌での発現と諸性質. 日本農芸化学会 2010 年度大会. 2010 年 3 月 28 日. 東京大学駒場 I キャンパス(東京都)

13.Zhang W, Mihara H, Kurihara T, Esaki N. Discovery of a novel heme-containing selenoprotein from *Geobacter sulfurreducens*. 9th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine (Selenium 2010). 2010 June 1. Kyoto University (Kyoto, Japan)

14.Okugochi T, Tamura T, Takahata M, Mihara H, Kurokawa S, Abe K, Esaki N, Inagaki K. Why Sps1 and Sps2 differ in their catalysis?: Identification of an internal sequence region catalytically essential for the human lung selenophosphate synthetase 2. 9th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine (Selenium 2010). 2010 June 1. Kyoto University (Kyoto, Japan)

15.Kurokawa S, Winfrey V, Takehashi M, Tanaka H, Mihara H, Kurihara T, Tanaka S, Olson G, Hill K, Burk R. Physiological function and regulation of mammalian selenocysteine lyase. 9th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine (Selenium 2010). 2010 June 2. Kyoto University (Kyoto, Japan)

16.Imai T, Mihara H, Kurihara T, Esaki N. The uptake of selenium compounds by RBCs and selenite reduction by glutathione reductase. 9th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine (Selenium 2010). 2010 June 2. Kyoto University (Kyoto, Japan)

17.三原久明, 張万皎, 栗原達夫, 江崎信芳. *Geobacter sulfurreducens* 由来新奇マルチヘムセレンプロテイン. 特殊環境微生物セミナー. 2010 年 7 月 16 日. 京都大学宇治キャンパス(京都府)

18.三原久明, 張万皎, 栗原達夫, 江崎信芳. *Geobacter sulfurreducens* 由来新奇マルチヘムセレンプロテイン. 2010 年度酵素・補酵素研究会. 2010 年 9 月 11 日. 西日本総合展示場(福岡県)

19.谷泰史, 道本麻衣, 斎藤茂樹, 三原久明. レアメタル資源回収システムの開発を目指した新奇金属代謝微生物の研究. 第 2 回メタロミクス研究フォーラム. 2010 年 11 月 2 日. 京都薬科大学(京都府)

20. 秀瀬涼太, 三原久明, 栗原達夫, 江崎信芳. *Pseudomonas putida* KT2440 由来ジドロピリミジンデヒドロゲナーゼの酵素学的性質と生理的役割. *BMB2010*. 2010年12月7日. 神戸ポートアイランド(兵庫県)
21. 福山貞伸, 栗原達夫, 川端潤, 三原久明, 上田誠, 江崎信芳. 好熱性嫌気性細菌由来2,4-ジアミノペンタン酸デヒドロゲナーゼの機能解析. *BMB2010*. 2010年12月7日. 神戸ポートアイランド(兵庫県)
22. 三原久明. 鉄硫黄クラスターおよびセレンタンパク質の生合成を司る硫黄・セレン脱離酵素群の発見と分子機能解析. *BMB2010*. 2010年12月9日. 神戸ポートアイランド(兵庫県)
23. 今井岳志, 三原久明, 栗原達夫, 江崎信芳. 亜セレン酸還元経路の探索. *BMB2010*. 2010年12月10日. 神戸ポートアイランド(兵庫県)
24. 三原久明. 微生物によるレアメタルの回収. 立命館グローバル・イノベーション研究機構(R-GIRO)材料研究拠点シンポジウム. 2011年3月3日. 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県)
25. 秀瀬涼太, 三原久明, 栗原達夫, 江崎信芳. 鉄硫黄クラスター生合成機構の新規な解析法. 日本農芸化学会2011年度大会. 2011年3月26日. 京都女子大学(京都府)
26. 斎藤茂樹, 谷泰史, Prakash T, 三原久明. *Bacillus* 属細菌のセレン酸還元メカニズムの解析. 日本農芸化学会2011年度大会. 2011年3月27日. 京都女子大学(京都府)
27. 三原久明. 金属汚染浄化とレアメタル資源回収システムの開発を目指した新規金属代謝微生物の研究. 長瀬科学技術振興財団平成22年度研究成果発表会. 2011年4月21日. 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三原 久明 (MIHARA HISAAKI)
立命館大学・生命科学部・准教授
研究者番号: 30324693