

氏名	あべ かつ まさ 阿部 勝 正
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1666号
学位授与の日付	平成20年1月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Enzymatic Studies of Selenocysteyl-tRNA ^{Sec} Biosynthesis (セレノシステイル tRNA ^{Sec} 生合成に関する酵素学的研究)
論文調査委員	(主査) 教授 江崎信芳 教授 植田和光 教授 渡邊隆司

論文内容の要旨

セレンは、哺乳動物ならびにある種のアーキアや細菌の必須微量元素であり、生体内では主にセレンタンパク質のセレノシステイン残基として存在することで生理的に重要な機能を果たしている。セレンは硫黄と同族の元素であり、その化学的性質は硫黄のそれと非常に類似している。しかし生物は、硫黄の1000分の1以下の濃度でしか存在しないセレンを硫黄と厳密に区別しながら代謝し、セレノシステイン残基として翻訳段階でタンパク質中に取り込む。極めて微量にしか存在しないセレンをいかにして特異的に認識し、過不足なくセレンタンパク質を合成し、代謝しているのかを明らかにすることは、生化学的に重要な課題であるとともに、医学や栄養学などの基盤知見としても重要である。セレンタンパク質生合成においてはセレノシステイル tRNA^{Sec} の合成が必須と考えられているが、細菌、アーキア、動物の間でその生合成経路に相違が見られる。以上のような観点から、本研究は、細菌、メタン生成好熱性アーキア、哺乳類のセレノシステイル tRNA^{Sec} 生合成系酵素の解析を行ったものであり、その成果は以下のように要約される。

1. セレノリン酸はセレノシステイル tRNA^{Sec} へのセレン供給源であり、セレノリン酸シテターゼによって合成されると考えられている。*Escherichia coli* のセレノリン酸シテターゼ (SelD) の機能解析を目的として、部位特異的変異によってアミノ酸残基の役割を調べた。その結果、各種細菌の SelD に高度に保存されている Cys17 が本酵素活性に必須であることが判明した。また、*E. coli* のシステインデスルフラゼ (IscS) によって遊離 L-セレノシステインから生成したセレン化合物は SelD の基質となること、両酵素の共役によってセレノリン酸が効率よく生成することを見いだした。その際、IscS と SelD は分子間相互作用することから、L-セレノシステインから生成するセレン化合物の実態は IscS の活性中心チオール基上に生成するペルセレニドであり、そのセレンが SelD の活性中心に移され、セレノリン酸に変換されると推論した。

2. アーキアのセレノシステイル tRNA^{Sec} 生合成においては、セリル tRNA^{Sec} キナーゼ (MJSTK) によりセリル tRNA^{Sec} から O-ホスホセリル tRNA^{Sec} が合成される過程が必須と考えられていた。しかし、メタン生成好熱性アーキア *Methanocaldococcus jannaschii* 由来の SelD, MJSTK, セレノシステインシテターゼ (MJSecS) を用いて反応解析したところ、従来から指摘されている MJSTK を介する経路のほかに、MJSTK を介さず、SelD と MJSecS のみによってセリル tRNA^{Sec} から直接セレノシステイル tRNA^{Sec} を生成する経路も存在することを見いだした。

3. 哺乳類に存在する二つのセレノリン酸シテターゼホモログ SPS1 と SPS2 の機能を *in vitro* および *in vivo* の両面から検討した。マウス肝臓由来 Hepa1-6 細胞を用いた RNA 干渉法によって解析したところ、SPS2 を抑制した場合にはセレンタンパク質の生合成が顕著に抑えられたが、SPS1 を抑制した場合にはこのような現象は観察されなかった。また、*in vitro* でのセレノリン酸合成活性を指標とした評価系においても、SPS2 が顕著な活性を示すのに対して、SPS1 にはそのような活性は認められなかった。以上の結果より、SPS2 はセレノシステイル tRNA^{Sec} 生合成においてセレノリン酸シテターゼとして機能しているが、SPS1 はセレンタンパク質生合成に関与しないことが示された。

4. ヒトセレノシステインシテターゼ (hSecS) の発現系を構築し、その機能解析を行った。hSecS には RNA 結合能が

認められ、それとともにピリドキサル酵素に特徴的な電子スペクトルが示された。^[75Se] セレニドを用いてセレノシステイル tRNA^{Sec} 合成反応を調べた結果、hSecSにはセリル tRNA^{Sec} から直接セレノシステイル tRNA^{Sec} を生成する活性は認められず、O-ホスホセリル tRNA^{Sec} とセレノリン酸からセレノシステイル tRNA^{Sec} が合成されることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

セレンは、生体内において同族の硫黄と厳密に区別されながらセレンタンパク質の特定の部位にセレノシステイン残基の形で取り込まれる。セレンタンパク質はさまざまな生物に存在し、抗酸化、細胞周期制御、甲状腺ホルモン代謝、生殖などに関連する重要な機能を果たしている。セレノシステイン残基はストップコドンによってコードされることなど、セレンタンパク質生合成機構の基本的なことは明らかにされているが、生物ドメイン間の相違などの詳細は十分に解明されていない。本研究は細菌、アーキア、哺乳類を対比しながら、セレンタンパク質生合成の必須過程であるセレノシステイル tRNA^{Sec} 合成に関わる種々の酵素を対象として、それぞれの反応の特性を明らかにしたものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. *E. coli* のセレノリン酸シンターゼ (SelD) について、その活性に必須なアミノ酸残基を同定するなど、本酵素の特性を解明した。また、システインデスルフラナーゼ (IscS) と SelD は、タンパク質間相互作用を介してセレノシステインから効率よくセレノリン酸を生成することを実証した。この成果は、セレンタンパク質生合成の初発反応の実態を初めて明らかにしたものであり、評価できる。

2. メタン生成好熱性アーキア *M. jannaschii* には、セリル tRNA^{Sec} から O-ホスホセリル tRNA^{Sec} を経てセレノシステイル tRNA^{Sec} を生成する経路と、セリル tRNA^{Sec} から直接セレノシステイル tRNA^{Sec} を生成する経路の二つが存在することを明らかにした。この成果は、セレンタンパク質生合成系の生物ドメイン間の相違を理解する上で重要な手がかりを与えたものとして評価できる。

3. 哺乳類のもつ二つのセレノリン酸シンターゼホモログのうち SPS1 はセレンタンパク質生合成には関与せず、SPS2 のみがセレノリン酸シンターゼとして機能することを示した。これは、セレンタンパク質生合成の鍵化合物であるセレノリン酸の合成に関与する酵素を哺乳類において初めて明確にしたものであり、重要な意義がある。

4. ヒトセレノシステインシンターゼを精製し、酵素科学的な諸性質を明らかにするとともに、本酵素によってセレノシステイル tRNA^{Sec} が特異的かつ高効率に生成する反応の実態を明示した。これによって微量にしか存在しないセレンが特異的に化学変換される過程の詳細が明らかとなった。酵素科学的に重要な知見を与えたものであり、評価できる。

以上のように本論文は細菌、アーキア、哺乳類のセレノシステイル tRNA^{Sec} 生合成機構とそれに関与する酵素の機能と特徴を明らかにしたものであり、微生物学、生化学、酵素科学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成19年11月9日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。