

氏名	三原久明
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1081号
学位授与の日付	平成11年9月24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	農学研究科農芸化学専攻
学位論文題目	Enzymological Studies of Cysteine Desulfurase and Selenocysteine Lyase (システインデスルフララーゼとセレノシステインリアーゼの酵素学的研究)

論文調査委員 (主査) 教授 江崎信芳 教授 清水昌 教授 關谷次郎

論文内容の要旨

硫黄とセレンは互いに同族元素で、各々対応する含硫化合物と含セレン化合物は互いに、物理的および化学的に似ている。しかし、セレン代謝においては、含セレン化合物に特異的に作用する酵素が重要な役割を果たしていると考えられる。

セレノシステインリアーゼは、ピリドキサル5'-リン酸 (PLP) を補酵素とし、L-セレノシステインに特異的に作用してL-アラニンとセレンに分解する反応を触媒する。一方、システインデスルフララーゼは、これと同様な反応を触媒するが、L-セレノシステインとL-システインの両者に作用してL-アラニンを生成する。これら両酵素の構造-機能相関の比較研究により、セレンと硫黄の酵素的識別機構に関する有益な知見が得られると期待される。本研究は、哺乳類と大腸菌のセレノシステインリアーゼおよびシステインデスルフララーゼの遺伝子クローニング、精製、性質の解明を行うとともに、構造と機能の関連、特に、セレンと硫黄に対する触媒作用機構の違いを明らかにしたものである。研究の具体的成果の概要は次のとおりである。

1. マウス肝臓セレノシステインリアーゼの cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した。本酵素は *Azotobacter vinelandii* の *nifS* 遺伝子がコードするシステインデスルフララーゼ (NifS) と一次構造上有意な相同性を示すことが明らかとなった。本酵素は、L-セレノシステインに高い特異性を示した。マウスにおける本酵素遺伝子の発現を RT-PCR とウエスタンブロット法により調べた結果、肝臓、腎臓、精巣で強く発現していることが見いだされた。

2. 大腸菌のもつ3種の *nifS* 相同遺伝子 (*csdA*, *csdB*, *iscS*) を各々クローン化して高発現させ、酵素を精製してその酵素化学的性質を調べた。*csdA* がコードする CSD は基質に対する特異性が最も低く、L-セレノシステインやL-システインスルフィン酸を良好な基質とした。*csdB* がコードする CsdB はL-セレノシステインに対する特異性が高く、*iscS* がコードする IscS のL-システインスルフィン酸に対する活性は、3酵素の中で最も低かった。いずれの酵素も、副反応として基質アミノ酸と補酵素 PLP との間のアミノ基転移反応を触媒し、活性のないピリドキサミン5'-リン酸型酵素に変換されることが示された。また、これらの酵素が触媒するL-セレノシステインの分解反応はいずれも、ピルビン酸によって促進されるが、活性化の程度は酵素によって大きく異なることを見いだした。一方、L-システインの分解反応においては、3酵素いずれも、ピルビン酸によってほとんど活性化されなかった。

3. NifS においては、活性中心にある325位のシステイン残基 (Cys 325) が基質-PLP 反応中間体の C4' にプロトンを渡すことでアニオン化され、これが基質L-システインのスルフヒドリル基を求核攻撃し、酵素結合型ペルスルフィドを形成すると推論されている。CSD, CsdB および IscS の3種の酵素について、NifS の Cys 325 に対応するシステイン残基を各々アラニン残基に置換した変異酵素を作製したところ、いずれの酵素においてもL-システインに対する活性が特異的に消失した。従って、これらのシステイン残基はL-システインを基質とする場合には触媒残基として重要であるが、L-セレノシステインを基質とする場合には必須ではないことが明らかになった。

4. CsdB ならびにその基質(または基質類似体)複合体の立体構造を X 線結晶構造解析により決定した。ネイティブ酵素

の構造モデルは、分解能 2.8 Å で、結晶学的 R 値 19.9% まで精密化した。蒸気拡散法により調製したネイティブ酵素結晶を、L-システインスルフィン酸、L-アスパラギン酸、L-β-クロロアラニン、あるいはL-プロパルギルグリシンを含む母液に各々浸漬した。それぞれの複合体結晶を差フーリエ法により 2.8 Å 分解能で X 線結晶解析した。いずれの場合も、基質または基質類似体の α-アミノ基は PLP の C4' と酵素外シッフ塩基を形成しており、α-カルボキシル基は 379 位のアルギニン残基によって認識されることが判明した。NifS 相同酵素間で保存されている 364 位のシステイン残基は、基質の γ 位近傍に位置していた。これらの構造モデルから、55 位のヒスチジン残基も何らかの重要な機能を果たしている可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

セレンは必須微量元素であるとともに、毒性の高い元素でもある。酵素によるセレンと硫黄の識別機構を解明することは、セレンの生理的役割を理解する上で意義深い。本研究は、L-セレノシステインに特異的に作用するセレノシステインリアーゼと、L-セレノシステインにも L-システインにも作用するシステインデスルフラゼを対象に、マウスおよび大腸菌から各々の酵素遺伝子をクローニングし、酵素学的諸性質を解明するとともに、X 線結晶構造解析と部位特異的変異による解析を通して、L-セレノシステインと L-システインに対する酵素の作用機構の相違点を明らかにしたものであり、評価すべき点は次のとおりである。

1. マウス肝臓よりセレノシステインリアーゼの cDNA をクローニングし、本酵素がシステインデスルフラゼと一次構造上の相同性を示すことを明らかにした。これは、哺乳動物のセレノシステインリアーゼの構造を明らかにした最初の例である。また、本酵素遺伝子は、肝臓、腎臓、精巣で特に強く発現していることを実証した。

2. 大腸菌の 3 種の *nifS* 相同遺伝子 (*csdA*, *csdB*, *iscS*) をクローン化して高発現させ、酵素を精製して酵素化学的性質を調べ、各々の基質特異性の違いを明らかにした。また、これら 3 酵素はいずれも、ピルビン酸によって活性化される現象を見だし、各酵素が有するセレノシステインリアーゼ活性とシステインデスルフラゼ活性へのピルビン酸の影響を比較することで、L-セレノシステインと L-システインの分解反応が各々異なる機構で進行することを明らかにした。

3. 大腸菌のもつ 3 種の NifS 相同酵素について、共通して保存されているシステイン残基の役割を調べ、これらのシステイン残基は基質が L-システインの場合にのみ活性残基として重要な役割を果たすことを見いだした。この事実からも、L-セレノシステインと L-システインが各々相異なる触媒機構で分解されることが実証された。

4. X 線結晶構造解析により、CsdB ならびにその基質（または基質類似体）複合体の立体構造を明らかにした。基質（または基質類似体）や補酵素と相互作用する本酵素のアミノ酸残基を特定することに成功した。

以上のように本論文は、L-セレノシステインと L-システインの代謝に関与する新規酵素の触媒特性と立体構造を明らかにするとともに、これまで不明であったセレンと硫黄の酵素的識別機構を明らかにするなど、酵素化学、構造生物学、タンパク質工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 11 年 7 月 8 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。