

氏 名	くろ かわ すぐる 黒 川 優
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1710 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 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 応 用 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Biochemical Function of Mammalian Selenocysteine Lyase (哺乳類セレノシステインリアーゼの生化学的機能)
論文調査委員	(主 査) 教 授 江 崎 信 芳 教 授 植 田 和 光 教 授 阪 井 康 能

論 文 内 容 の 要 旨

セレノシステインはシステインの硫黄がセレンに置換された構造をもち、21番目のアミノ酸として特定のタンパク質のペプチド鎖中に含まれる。セレンは脊椎動物をはじめとする多くの動物やある種のアーキアあるいは細菌の必須微量元素であり、その必須性はセレノシステイン残基を含有するこれらのタンパク質、すなわちセレンタンパク質が果たす不可欠な作用に起因すると理解されている。バイオインフォマティクスの解析によって、ヒトには合計25種類のセレンタンパク質があると推定されている。しかし、酵素として作用するグルタチオンペルオキシダーゼやチオレドキシンレダクターゼ、あるいはセレンの運搬体として作用するセレノプロテインPなど数種のものを除いて、セレンタンパク質の機能はほとんど明らかにされていない。また、必須微量元素であるセレンを有効に利用するため、L-セレノシステインを分解してセレンを取り出す巧妙な仕組みが存在すると考えられるが、詳細は不明である。セレノシステインリアーゼはセレンタンパク質をもつほとんどの生物に保存されており、L-セレノシステインに特異的に作用して元素状セレンとL-アラニンに分解する反応を触媒するピリドキサル酵素である。本研究は、セレノシステインリアーゼの基質選択機構および細胞内での機能を解析したものであり、その成果は以下のように要約される。

1. ラット肝臓セレノシステインリアーゼのcDNAをクローニングし、大腸菌を宿主とする組換え酵素の発現系を構築するとともに、精製・結晶化し、そのX線結晶構造解析を行った。セレノシステインリアーゼは大小2つのドメインによって構成され、7本の β ストランドよりなる典型的なピリドキサル酵素タイプI構造をもつことが判明した。セレノシステインリアーゼとL-システインとの複合体のX線結晶構造を解析したところ、セレノシステインリアーゼはL-システインとは結合するものの、そのアミノ基はピリドキサルリン酸とシッフ塩基を形成せず、代わりにリジン残基とシッフ塩基を形成しているピリドキサルリン酸のC4AとL-システインのチオール基が結合していることが明らかになった。セレノシステインリアーゼがL-システインに作用しないのは、この特異な相互作用に起因すると推論した。

2. セレノプロピオン酸とセレノシステインリアーゼとの複合体のX線結晶構造解析の結果、セレノールは375番目のシステイン残基のチオールによって認識されることを見いだした。このシステイン残基をアラニンに置換したC375A変異酵素はL-セレノシステイン分解活性を示さないものの、L-セレノシステインとの混合溶液は野生型酵素とL-システインとの混合溶液と同様、350nmに吸収極大を示すことを明らかにした。このような現象は野生型酵素とL-セレノシステインとの混合溶液では観察されないことから、このユニークな吸収はPLPのC4Aにセレノールあるいはチオールが結合した分子種に由来することを明確に示した。これによって、基質セレノール基の認識に375番目のシステイン残基が直接関与することが明らかになった。

3. ^{75}Se 標識セレノプロテインPを調製し、セレン源としてHeLa細胞に与えたところ、RNAiによるセレノシステインリアーゼの発現抑制によってセレンタンパク質への ^{75}Se 取り込みは顕著に抑制されることを見いだした。L-セレノシステインをセレン源として与えた場合にも同様の結果が得られたことから、セレノシステインリアーゼはセレノプロテインP由来

のL-セレノシステインを代謝し、そのセレンをセレンタンパク質に供給していると推論した。

4. Gpx4は精子の形態形成に重要な役割を果たすセレンタンパク質であり、その生合成に果たすセレノシステインリアーゼの役割を明らかにするために組織染色による解析を行ったところ、セレノシステインリアーゼは未分化精原細胞では発現していないが、前期精子細胞へと形態形成が進むに従い強く発現することを見いだした。セレンタンパク質の生合成に必須の役割を果たすSECIS結合タンパク質は精巣で強く発現することが知られるが、SECIS結合タンパク質はセレノシステインリアーゼと全く同様の発現パターンを示すことが明らかになった。これらのことから、セレノシステインリアーゼはSECIS結合タンパク質などと協働し、L-セレノシステインのセレンをセレンタンパク質に供給する酵素として生理的に機能するものと推論した。

論文審査の結果の要旨

セレンタンパク質はさまざまな生物に存在し、必須微量元素セレンをセレノシステイン残基の形で含有し、抗酸化、細胞周期制御、甲状腺ホルモン代謝、生殖など、種々の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、微量元素であるセレンの代謝は十分に解明されていない。本研究はL-セレノシステインに特異的に作用して元素状セレンとL-アラニンに分解するセレノシステインリアーゼの触媒機構ならびに細胞内での機能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. ラット由来セレノシステインリアーゼの立体構造をX線結晶構造解析により明らかにした。また、本酵素とL-システインとの複合体の結晶構造も解析し、L-システインは補酵素ピリドキサルリン酸と Schiff塩基を形成せず、チオール基がピリドキサルリン酸のC4Aと結合するユニークな構造をとることを実証した。セレノシステインリアーゼがL-システインに作用しない分子機構をはじめて解明したものであり、評価に値する。

2. セレノシステインリアーゼとセレノプロピオン酸との複合体のX線結晶構造解析やセレノシステインリアーゼの変異酵素の分光学的解析などを通して、375番目のシステイン残基がL-セレノシステインのセレノールの認識に重要な役割を果たすことを明らかにした。これは、硫黄とセレンを識別する酵素的識別機構の詳細をはじめて明らかにしたものであり、評価できる。

3. RNAiによりセレノシステインリアーゼの発現を抑制すると、各種⁷⁵Se標識セレン化合物、特にセレンタンパク質PとL-セレノシステインからのセレン取り込みが顕著に低下することを見いだした。セレノシステインリアーゼが生理的にL-セレノシステインのセレンをセレンタンパク質に供給することを明らかにしたものであり、重要な意義がある。

4. 精巣におけるセレノシステインリアーゼの局在を組織染色により調べ、セレノシステインリアーゼとSECIS結合タンパク質はいずれも前期精子細胞で強く発現している実態を明示した。これは精巣におけるセレンタンパク質の生合成においてセレノシステインリアーゼが重要な役割を果たす可能性を示すものであり、この分野の発展に重要な示唆を与えたものと評価できる。

以上のように本論文は哺乳類セレノシステインリアーゼの生化学的機能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20年2月12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。