

氏名	高畑 宗明
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第3915号
学位授与の日付	平成21年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	セレン代謝に関わるセレノリン酸合成酵素系の新機能解析
論文審査委員	教授 稲垣 賢二 教授 上村 一雄 准教授 田村 隆

### 学位論文内容の要旨

原子番号 34 のセレンは、ヒトの必須微量元素である。セレンは独自の遺伝コードを持ち、セレノシステイン (SeCys) 残基としてセレンタンパク質中に挿入される点で非常にユニークである。近年、ヒトでは 25 種類のセレンタンパク質が発見され、レドックス、免疫賦活、ホルモン調節、抗がんなど様々な生理機能を持つことが知られてきた。しかし、セレンは生体内での適量範囲が非常に狭く、過剰症や欠乏症が懸念されている。セレンの毒性を回避しつつ、その多様な生理作用を享受するためには、セレン代謝特性の解明が不可欠である。セレンが SeCys に変換されセレンタンパク質に挿入されるには、必ず必須代謝中間体のセレノリン酸 (SeP) 合成を必要とする。本研究では、SeP を合成するセレノリン酸合成酵素 (SPS) アイソザイムの機能解析を中心に、セレン代謝特性の解明を目的とした。

無機セレン化合物の亜セレン酸は、従来グルタチオン還元系によって還元され、SPS の基質となると考えられてきた。しかし、グルタチオン還元系で生じると考えられる中間体は生理的条件下で非常に不安定であり、セレノリン酸合成には関与しない可能性が高い。そこで、チオレドキシ還元系に着目し、大腸菌を細胞モデルとしてグルタチオン還元酵素遺伝子 (*gor*) およびチオレドキシ還元酵素遺伝子 (*trxB*) を破壊し、亜セレン酸代謝に与える影響を検討した。SPS 活性測定は、大腸菌のセレンタンパク質であるギ酸脱水素酵素 H (FDH<sub>H</sub>) 活性を指標とした。野生株および *gor* 欠損株では活性型 FDH<sub>H</sub> が合成されたが、*trxB* 欠損株では FDH<sub>H</sub> 活性は消失した。これらの結果より、亜セレン酸はグルタチオンシステムにより還元されるとの従来の定説を覆し、チオレドキシ還元系に依存するという新たな知見を提供した。

ほ乳類 SPS は大腸菌などのバクテリアや古細菌とは異なり、2 種類のアイソザイムを保持している。しかし、SPS アイソザイムの存在意義や機能的差異は未だ解明されていない。SPS2 は活性中心に Cys を保持し大腸菌 SelD 欠損を補完し FDH<sub>H</sub> 合成能を示すが、SPS1 は活性中心残基が Thr であり酵素活性を示さない。SPS アイソザイムは極めて一次構造の相同性が高いが、SPS2 には活性部位下流に特有の内部アミノ酸配列 (*int2*) が存在する。*int2* が SPS2 活性に与える影響を検討するため、SPS1 に *int2* を挿入した変異体を作製し活性測定をおこなった。その結果、*int2* を挿入しさらに活性中心残基を Cys に置換した SPS1Cys-*int2* でのみ FDH<sub>H</sub> 合成能が上昇した。SPS1 および SPS2 の立体構造予測の結果、*int2* 配列はループ構造をとることが示唆された。酵素活性を示す他の菌株由来の SPS 間には、*int2* 様の配列は保存されていない。本研究により、ほ乳類 SPS2 にのみ存在する重要な触媒ドメインを初めて同定した。

さらに SPS1 のセレン代謝における役割を解明するため、SPS1 と SPS2 の大腸菌内共発現系を構築した。その結果、FDH<sub>H</sub> 活性が顕著に抑制された。また、酵母を用いてタンパク質間相互作用を解析したところ、SPS1 と SPS2 が相互作用を持つ可能性が示された。SPS アイソザイムの精製酵素を用いて native-PAGE およびゲル濾過クロマトグラフィーに供した結果、SPS1 および SPS2 はそれぞれダイマー構造をとることが示唆された。これらの結果より、SPS1 は SPS2 に対してアンチザイム様の機能を持ち、SPS2 とヘテロダイマーを形成することで SeP 合成を抑制するのではないかと推察された。

以上より、本研究ではセレン代謝における亜セレン酸還元系の解明と、セレノリン酸合成酵素アイソザイムの存在意義について重要な知見を提供した。これを基盤とすることで、セレンおよびセレンタンパク質を指標とした健康産業や医療分野へのさらなる応用が期待される。

## 論文審査結果の要旨

原子番号34のセレンは、ヒトの必須微量元素である。近年、ヒトでは25種類のセレン含有酵素が発見され、がん予防効果などの様々な生理機能を持つことが知られてきた。しかし、セレンは生体内での適量範囲が非常に狭く、過剰症や欠乏症が懸念されている。本論文で著者は、セレンがどのような代謝を受けてセレン含有酵素に同化されるかについて、亜セレン酸塩( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ )の還元的代謝機構の解明、およびセレノリン酸合成酵素アイソザイムの機能解析に取り組んだ。

亜セレン酸は食品に含まれる無機セレンの中で最も主要な成分であるが、これは細胞内でグルタチオンによって還元されるとの説が広く受け入れられてきた。しかし大腸菌チオレドキシ還元酵素遺伝子を破壊すると、亜セレン酸同化が顕著に抑制された。このことから、亜セレン酸還元反応はグルタチオン還元系ではなくチオレドキシ還元系によるものであることを明らかにした。

セレン代謝の必須代謝中間体であるセレノリン酸は、セレノリン酸合成酵素 (SPS) によって合成される。ほ乳類ではSPSのアイソザイムが二種類存在しており、SPS2は高い触媒能を持つが、もう一方のSPS1は触媒としての作用を示さない。タンパク質工学により二つの酵素をシステムチックにキメラ化して解析をした結果、本酵素に必須の配列モチーフを新たに同定した。さらに立体構造予測の結果、SPS2特有のモチーフはループ構造を形成することを発見した。また、SPS1とSPS2を共発現させるとセレン含有酵素の合成が顕著に抑制され、さらに両酵素はタンパク質間相互作用をすることを示した。これらより、これまでその存在意義が全く不明であったSPS1がSPS2の触媒能を抑制するアンチザイムとして機能するという新知見を見出した。

上記の論文内容、発表会における応答を総合的に審査した結果、博士の学位に値するものと判断した。