

大腸菌ギ酸デヒドロゲナーゼのセレノシステイン残基合成機構

京都大学化学研究所 江崎信芳

セレンは硫黄の同族元素であるが、金属性、非金属性を合わせ持つ点がユニークで、硫黄にはない特異な反応性を示す。生物はこの特殊性を巧みに利用しており、哺乳動物や鳥類、魚類はいずれもセレンを必須微量元素として要求する。大腸菌や *Clostridium* 属細菌も培養条件によってはセレンを要求する。セレンの必須性は大部分、セレンを必須構成成分とする酵素の存在と、その重要な生理作用に起因している。これまでに、哺乳動物ではグルタチオンペルオキシダーゼ、大腸菌ではギ酸デヒドロゲナーゼ、*Cl. sticklandii* ではグリシンレダクターゼなどが含セレン酵素として同定されている。¹⁾ 非常に興味深いことに、これらの含セレン酵素はいずれも活性中心にセレノシステイン残基を含有している。¹⁾

最近、大腸菌のギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子 (*fdhF*) がクローン化され、その塩基配列が解析された。²⁾ 驚いたことに、活性中心のセレノシステイン残基はオパール (TGA) 終止コドンでコードされていた。*fdhF* 遺伝子を含むプラスミド、pFM20 を *fdhF* 欠損変異株に導入すると、ギ酸デヒドロゲナーゼ活性が相補されるとともに、本酵素に相当する分子量 8 万のセレン含有タンパク質も合成された。pFM20 の *fdhF* 遺伝子読み取り枠内の末端あるいは内部を欠除した一連のプラスミドを構築し、大腸菌に導入すると、短鎖のセレン含有ペプチドが生成し、それらの分子量は遺伝子から予測される値とよく一致した。また、*fdhF* 遺伝子断片を *lacZ* の 5' 側に連結した融合遺伝子を構築したところ、嫌気条件下でのみ融合タンパク質が合成され、特に *fdhF* 部分が TGA コドンを含む場合には、融合タンパク質の合成にセレンの存在が必須であった。一方、TGA の上流部分との融合遺伝子の発現にはセレンは要求されないことが証明され、セレノシステインのタンパク質へのとり込みは翻訳段階で起ることが実証された。²⁾

Böck らのグループはその後、FDH へのセレン導入には 4 種の遺伝子が関与していることを突き止め、それぞれ *selA*, *B*, *C*, *D* と命名した。³⁾ このうち、*selC* はセレノシステイン残基をコードする UGA を特異的に認識する特殊な tRNA をコードしている。⁴⁾ 一方、*selB* のコードするタンパク質はグアニンヌクレオチドと 1 対 1 の比で結合し、さらにセレノシステイル tRNA と特異的に結合する。*selB* の DNA 塩基配列は翻訳開始因子、IF-2 および伸長因子 EF-Tu 遺伝子の塩基配列ときわめて類似性が高く、*selB* はアミノ酸特異的に作用する特殊な伸長因子であることが実証された。⁵⁾

大腸菌にはギ酸デヒドロゲナーゼ以外に、5-メチル-2-セレノウリジン ($\text{mn}^{\text{m}}\text{Se}^2\text{U}$) を含有する tRNA が存在する。⁶⁾ このセレン含有 tRNA の生理的意義は不明だが、少なくとも *selC* のコードする tRNA には $\text{mn}^{\text{m}}\text{Se}^2\text{U}$ は含まれない。最近、Leinfelder らは *selD* を欠損させると、ギ酸デヒドロゲナーゼも tRNA も共にセレン化されなくなることを実証した。⁷⁾ この事実はギ酸デヒドロゲナーゼのセレノシステインも $\text{mn}^{\text{m}}\text{Se}^2\text{U}$ も共に共通の酵素あるいは代謝系によって合成されることを示唆している。Leinfelder らは *selD* 遺伝子の DNA 塩基配列を決定し、347 アミノ酸残基のタンパク質をコードすることを示した。⁷⁾ 実際、T7 プロモーターの制御下で *selD* を発現させると、予想される分子量、36,687 と一致するタンパク質の生成が確認された。*selA*, *B* および *D* をすべて欠損する大腸菌変異株を宿主とし、*selA* あるいは *D* 遺伝子をコードするプラスミドを導入して両遺伝子をそれぞれ高発現させた。各菌体抽出液をセレン化ナトリウムおよびセリル-tRNA_{UCA} とともにインキュベートすると、両抽出液を混合した場合にのみセレノシステイル-tRNA_{UCA} の生成が認められた。セリンの取り込みに関与する通常の tRNA のセリルエステルを用いた場合や、セレン化ナトリウムを添加しない場合にはセレノシステイル-tRNA_{UCA} の生成は認められなかった。一方、*selA* 導入菌の抽出液を単独で用いた場合には、セリル-tRNA_{UCA} はセレノシステイル-tRNA_{UCA} 以外の物質に変換していた。この物質は未同定であるが、セリンの OH 基が活性化された、たとえば、O-フォスホセリル-tRNA_{UCA} などではないかと推測されている。*selD* の役割は現段階では不明だが、セレノシステイン残基ならびに $\text{mn}^{\text{m}}\text{Se}^2\text{U}$ の合成に寄与していることは明らかであり、少なくともセレニドからのセレンの受け渡しに関与していることは確かである。セリンがいかにして活性化され、セレノシステインに変換されるのかという化学的な機構の解明が待たれる。

- 1) Stadtman, T. C.: *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 93 (1980).
- 2) Zinoni, F. et al.: *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4650 (1986).
- 3) Leinfelder, W. et al.: *J. Bacteriol.*, **170**, 540 (1988).
- 4) Leinfelder, W. et al.: *Nature*, **331**, 723 (1988).
- 5) Forchhammer, K., Leinfelder, W., Böck, A.: *Nature*, **342**, 453 (1989).
- 6) Wittwer, A. J. et al.: *Biochemistry*, **23**, 4650 (1984).
- 7) Leinfelder, W. et al.: *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 543 (1990).