

## セレノシステイン生合成系とその種多様性

水谷隆治,\*<sup>a</sup> 大坂享史,<sup>a</sup> 藤原俊伸,<sup>b</sup> M. Shahidzzman<sup>a</sup>

## Biochemical Selenosysteine Synthesis and the Phylogenic Study

Takaharu MIZUTANI,\*<sup>a</sup> Takashi OSAKA,<sup>a</sup> Toshinobu FUJIWARA,<sup>b</sup> and M. Shahidzzman<sup>a</sup>  
<sup>a</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabedori, Mizuho-ku,  
Nagoya 467-8603, Japan, and <sup>b</sup>Graduate School of Engineering, Kobe University,  
1-1 Rokkoudai-cho, Nada-ku, Kobe 657-8501, Japan

(Received April 5, 2008)

Selenium (Se) is an essential trace element. Se is found as selenocysteine (Sec) in Se-proteins. Sec is the 21<sup>st</sup> amino acid, because Sec has its tRNA, the codon UGA and those components in its translational machinery. Sec UGA codon shares with major stop codon UGA. We purified Sec synthesizing enzymes, such as seryl-tRNA synthetase (SerRS), Sec synthetase (SecS) and selenophosphate synthetase (SePS). I described the procedures to prepare Sec tRNA, SerRS, SecS, SePS and [<sup>75</sup>Se]H<sub>2</sub>Se in detail. We clarified that SecS composed of two proteins, SecS $\alpha$  and SecS $\beta$ . Sec synthesizing and incorporating systems present in *Monela*, *Animalia* and *Protoctista* but not in *Plantae* and *Fungi*. We showed that protozoa had Sec tRNA on which Sec was synthesized from Ser-tRNA by bovine and protozoa SecS. Some worms, such as *Caenorhabditis elegans* and *Fasciola gigantica*, also had Sec tRNA on which Sec was synthesized by bovine liver SecS or *C. elegans* enzymes. We showed recognition sites of mammalian Sec tRNA by SecS. The identity units of Sec tRNA are 9 bp aminoacyl- and 6 bp D-stems. This recognition is not the base-specific manner but the length-specific manner. From comparison of the phylogeny trees of Sec synthesizing system and translation system, we concluded that the evolution of Sec synthesizing system is older than that of the translation system.

**Key words**—selenocysteine; selenocysteine synthase; selenophosphate; selenophosphate synthetase; selenium

## 1. はじめに

Seに関連する最初の記述はマルコポーロの東方見聞録である。若いマルコポーロが叔父とともに敦煌近くの肅州〔現在の甘肅省酒泉市〕を通ったときに、その地方では毒草を食べた馬のひづめが抜けるという記述がある。<sup>1)</sup> このひづめが抜けるという事象は1930年代に米国で毒草を食べた家畜のひづめが抜けたという事象と一致する。米国でのこの毒草はゲンゲ属植物の *Astragalus bisulcatus* で、Seを3000 ppmまで集積したとされる。これらのことから、Seは毒物として知られるようになり、現在も毒物と指定されている。さて、元素Seの発見は1817年にスウェーデンの化学者で、タンパク質を

第Iの物質 Protein と名付けたことでも知られる Berzelius が彼の硫酸製造工場の鉛室の底に赤い沈殿として発見した。Berzelius については尿素合成で知られる Wöhler が若い頃に Berzelius の研究室を訪れた思い出を1875年の *Chemische Berichte* (名古屋市立大学図書館所蔵) に記載している。さて、亜硫酸ガスを酸化して硫酸にする酸化条件で元素状のSeとして存在することから、Seは還元方向と考えられる。Seは毒物と考えられてきたが、1957年に Schwarz と Foltz により、動物の肝壊死を防ぐ必須物質 Factor 3 として発見され、これがSeであった。<sup>2)</sup> ヒトでは1979年に、中国東北部の風土病である克山病がSe欠乏によることが報告された。<sup>3)</sup> 克山病は心肥大などの心臓病でヒトが若くして死亡する風土病である。これはSe濃度の低い土壌で育ったSe濃度の低い主食のとうもろこしに起因した。克山病患者では毛髪などのSe含量が低く、これは亜セレン酸の投与により回復した。Se欠乏で心臓病になる理由としては、心臓病を起こす

<sup>a</sup>名古屋市立大学大学院薬学研究科医薬品代謝解析学分野 (〒467-8063 名古屋市瑞穂区田辺通3-1), <sup>b</sup>神戸大学大学院工学研究科 (〒657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1)

\*e-mail: takaharu@mbr.nifty.com

本総説は、平成19年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

ウイルスが virulent なウイルスに変異するのを Se 含有のグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) が抑えているため、Se 欠乏で GPx が減ると virulent なウイルスが増殖して心臓病になるとする説がある。<sup>4)</sup> GPx 中で Se はセレノシステイン (Sec) として存在しており、1953 年に Stadtman により発見された。Sec の -SeH は中性では  $\text{Se}^-$  と解離しており、イオウより反応性が高い。ヒトには約 10 mg の Se が含まれており、このレベル (0.2 ppm) は地球表層の土壌の含量比に近い。<sup>5)</sup> また、ヒトは毎日 50–200  $\mu\text{g}$  の Se を摂取している。

## 2. Sec tRNA

ノーベル賞受賞者の Nirenberg の弟子の Hatfield によって、1970 年に遺伝暗号 UGA に対合するセリンの tRNA の存在が明らかにされた。<sup>6)</sup> UGA はヒトで 3 種ある Stop 暗号のうち 50% の使用頻度の終止暗号である。同年に Seryl-tRNA をリン酸化する tRNA キナーゼ活性が報告され、筆者らはその精製を試みた。<sup>7)</sup> 1980 年頃から筆者は Seryl-tRNA 合成酵素 (SerRS) の研究を行っていた。<sup>8)</sup> セリンは解糖系に隣接し、スフィンゴシンの骨格となっている重要なアミノ酸である。この UGA 対応の tRNA の構造は 1981 年に決定された。<sup>9)</sup> この 2 次元構造モデルでは aminoacyl (AA) stem を 7 塩基対に組んだために T $\psi$  stem にバルジを含んでいた。1986 年になり Se 含有の GPx の DNA 配列が決定され、この中で Sec に相当する暗号は UGA であった。<sup>10)</sup> これらの状況から UGA に対応するセリン tRNA が Sec の tRNA であろうと想像され、tRNA 上でセリンから Sec に変換されることが考えられた。もちろん、Sec が活性化されて直接 tRNA に着く可能性もあったが、生体内には単体のアミノ酸としての Sec 濃度は低かったため、tRNA 上での変換の可能性が高いと思われた。筆者らは UGA 対応のセリン tRNA が Sec-tRNA に変換されることを実証するため、ウシ肝からフェノール法で粗 tRNA を調製し、これを BD-cellulose を支持体としたイオン交換クロマトグラフィーで分離し、UGA 対応のセリン tRNA が溶出する位置の高塩濃度で溶出するセリン tRNA 画分を得た。この tRNA と SerRS, Ser, ATP, cytosol, [<sup>75</sup>Se]H<sub>2</sub>Se と反応させ、生じた tRNA 上の [<sup>75</sup>Se] アミノ酸を 2 次元 TLC で分析し、京都大学化学研究所の左右田先生より供与され

た合成 Sec と同じ位置に [<sup>75</sup>Se] のスポットを確認した。<sup>11)</sup> このように名古屋市立大学薬学部の研究室で *in vitro* で Sec 生合成系を確立したが、いまだに世界で *in vitro* で Sec を生合成できる研究室はない。Sec 生合成関連酵素類の紹介の前にこの生合成系について詳しく述べる。

## 3. *In vitro* Sec 合成

[<sup>75</sup>Se] Sec の生合成は以下のものである。1.5  $\mu\text{l}$  のエッペンドルフ・チューブに以下の液を取る。

tRNA (0.2 mg/ml) (注 1)	1 $\mu\text{l}$
ATP (50 mM, pH を中性に調整)	5 $\mu\text{l}$
Ser (40 mM)	0.5 $\mu\text{l}$
Mercaptoethanol (ME)	0.05 $\mu\text{l}$
SerRS (数 mg/ml in 50% glycerol)	2 $\mu\text{l}$
(注 2)	
Sec 合成酵素類	10–20 $\mu\text{l}$
Buffer (0.2 M Hepes–20 mM MgCl <sub>2</sub> –20 mM AcOK, pH 7.4)	30–20 $\mu\text{l}$
[ <sup>75</sup> Se]H <sub>2</sub> Se (注 3)	1 $\mu\text{l}$
Total	50 $\mu\text{l}$

反応は 30°C, 2 時間

反応後、冷エタノール 110  $\mu\text{l}$  を加えて、遠心 (8000 rpm), 上清は捨て、沈殿に分解液 (10% アンモニア+20% ME) 5  $\mu\text{l}$  を加えて混ぜ、37°C で 30 分間反応し、tRNA 上のアミノ酸を tRNA から脱アミノ酸し、次に冷エタノール 11  $\mu\text{l}$  を加えて tRNA を沈殿し、15000 rpm で遠心し、tRNA から外れたアミノ酸を含む上清すべてを 1.5  $\mu\text{l}$  ずつ Merck のプラスチックシリカゲルプレート (10×20 cm) の下から 1 cm に 1 cm 間隔で乾かしながらスポットした。この薄層を n-Butanol : 酢酸 : 水 (4 : 1 : 1) で展開 (2 時間) 後、乾燥し、サララップで包んで 1 晩イメージングプレートに露光し、Fuji BAS2500 で分析する。

**注 1. Sec tRNA の調製** Sec 生合成に用いる tRNA は 2 種ある。1 つは天然の tRNA で、これはあとで述べる T7 合成の tRNA より安定である。フェノール法で抽出した粗 tRNA でも活性は測定できるが、少なくとも Sephacryl S-200 のゲルろ過で Kd=0.5 付近に溶出する画分を使う。通常の精製は粗 tRNA を Benzoylated-DEAE-cellulose (BD-cellulose) 又は DEAE-Sephadex を支持体としたイオン交換クロマトを行う。支持体 1 リットルに対して

tRNA 1 g を分離できる. tRNA 液 (10 mg/ml) をカラムに添加し, 低塩濃度 (0.3–1 M NaCl) で溶出したのち, 1 M NaCl–1.5 M NaCl+20%エタノールの gradient で溶出するピークに Sec tRNA は含まれる. この画分中の Sec tRNA の含量は 10% 程度である. ここで得られたアルコール沈殿の乾燥粉末は室温の保存で長年活性が失われない.

第 2 の方法は T7 RNA polymerase を用いる方法である. Sec tRNA 遺伝子を含むベクター DNA は T7 の promoter 配列を含みその下流に Sec tRNA 配列を含む合成 DNA を sense と antisense の 2 本購入し, annealing 後, これを pUC19 の SmaI 分解, 脱リン酸したものに ligation し, competent cell に入れる. この Sec tRNA 遺伝子を含む大腸菌は神戸大学工学部の藤原俊伸准教授の研究室に保存されている. この大腸菌を培養して調製した plasmid DNA を用いて, 以下のように tRNA を調製する.

前段階として plasmid DNA を分解する.

Plasmid DNA	25 $\mu$ g
×10 Buffer	5 $\mu$ l
×100 BSA	0.5 $\mu$ l
BstN1	5 $\mu$ l
水	40 $\mu$ l
計	50 $\mu$ l

60°C, 2 時間反応

この反応液を用いて T7 RNA polymerase で RNA 合成を以下のように行う.

上記反応液	50 $\mu$ l
×10 T7 buffer	50 $\mu$ l
20 mM NTP	50 $\mu$ l
T7 RNA polymerase	15 $\mu$ g
水	350 $\mu$ l
計	500 $\mu$ l

37°C, 2 時間

反応後, これに 0.5 M EDTA (pH 8.0) を 25  $\mu$ l 加える. フェノール処理し, その上清に 50  $\mu$ l の 3 M 酢酸 buffer を加えたのち, アルコールを 2 倍量加えて, 沈殿として得る. この粗画分には NTP なども含むので Sephacryl S-200 のゲルろ過で精製して, [<sup>75</sup>Se]Sec の生合成反応に用いる. ポリアクリルアミドのゲル電気泳動で精製度の高い Sec tRNA が得られるが量が少ない. Sephacryl S-200 のゲルろ過法は大量の調製に適する.

**注 2. SerRS の調製** ウシの肝からの SerRS の調製法を述べる. 肝をミンチし, 石英砂でつぶしてから, 4 倍量の 10 mM Tris-HCl–5 mM MgCl<sub>2</sub>–10 mM ME–5% glycerol からなる buffer A (pH 7.5) で 0°C, 30 分間かく拌する. この時, NaOH で中性に保つ. この抽出液を 600 g で遠心し, その上清を超遠心 (150000 g, 1 時間) し, 得られた上清 (cytosol) を DEAE-cellulose カラムにかける. 上記 buffer A 中, KCl 濃度 0–0.5 M で溶出し, 0 から 0.3 M KCl で溶出する範囲の画分について, SerRS 活性 (後述) を測定する. 特に 0.1 から 0.15 M KCl で溶出する画分はていねいに測定する. 活性ピークを狭く集め, 飽和硫酸を加えて, 0.45 飽和とし, 遠心後の上清に飽和硫酸を加えて, 硫酸 0.6 飽和とし, 遠心により得られた沈殿をできるだけ少量の buffer A に溶かし, Sephacryl S-300 のカラムでゲルろ過を行い SerRS の活性ピークを得る. ついでこの活性ピークを hydroxylapatite カラムで分離する. リン酸 buffer 中, リン酸 K 濃度 0–1 M で溶出する. この溶出活性画分を 50% glycerol に透析し, –80°C で保存する. この SerRS は長期に安定な製品として使用可能であった. この製品を [<sup>75</sup>Se]Sec 活性に用いる場合は, 濃いグリセロールと濃いリン酸 buffer を含むことに留意する.

SerRS 活性は 10 mg/ml のフェノール抽出 tRNA を 1  $\mu$ l, 5 mM ATP–[<sup>14</sup>C]Ser (0.05 mM, 25 Ci/mol) 44  $\mu$ l に酵素液を 5  $\mu$ l 加えて, 37°C, 10–30 分間反応させ, 反応後, 反応液をろ紙に着け, そのろ紙を冷 10% TCA 液に浸漬し, ついで冷 0.1 N HCl 中で 3 回 15 分間洗い, 最後にエーテル–エタノール (1 : 1) で脱水し, 乾燥後, 液体シンチレーションカウンターで測定する. 測定後バイアルからろ紙を除けばまたバイアルは再度使える.

**注 3. [<sup>75</sup>Se]H<sub>2</sub>Se の調製** あらかじめ, RI 施設で [<sup>75</sup>Se] が使用可能であることを確かめる. ミズーリ大学の研究用 Reactor で調製された亜セレン酸を注文・購入 (事前に問い合わせて新しく比活性の高い製品を得る, E-mail address: GarlandN@missouri.edu) し, 容量は数 10  $\mu$ l in 28% nitric acid であるので, これに計算量の水を加えて 1 mCi/100  $\mu$ l とする. ときに容器外側が汚染されていることがあるので注意!

1.5 ml のエッペンドルフ・チューブに以下のもの

を加える。

0.2 M HEPES-20 mM	
MgCl <sub>2</sub> -20 mM AcOK	1 ml
1 mM SeO <sub>2</sub>	5 μl
[ <sup>75</sup> Se]SeO <sub>2</sub> (1 mCi/100 μl)	2 μl (20 μCi)
ME	10 μl (final 100 mM)

Mixして (Mixの瞬間に赤くなる), 冷蔵庫で1夜放置後, H<sub>2</sub>Se液として使用する. 確認のためにこの液をTLCで分析すると, H<sub>2</sub>Seは先端に, SeO<sub>2</sub>は原点に留まる. 最初は1 mCi/100 μlであるが, 1-2年後に調製するときには放射比活性を保つため, 20 μCiにするために加える [<sup>75</sup>Se]の容量が多くなり, [<sup>75</sup>Se]液の硝酸の量が無視できなくなるので, その量に合わせて, 硝酸量に打ち勝つMEの量と硝酸をNaOHで中和してpHを保つように注意する. 上記のH<sub>2</sub>Se液を20倍に色素液でうすめて1 μl (1 μCi, 0.25 pmol) ずつをろ紙に打ち, 位置と量のマーカーとする.

#### 4. Sec合成酵素の研究

前章で紹介した assay 法を用いて, Sec合成酵素類を調べた. assay系には精製したSec tRNAと精製したSerRSを用いた. マウス肝 cytosol を酵素原料として, この中に [<sup>75</sup>Se]Sec合成活性を見い出した.<sup>11)</sup> これは2次元TLCで京都大学化学研究所の左右田先生より供与された化学合成Sec (ニンヒドリン発色)と同じ位置に [<sup>75</sup>Se]のスポットを見い出したものである. 以後の assay では1次元 (*n*-Butanol: 酢酸: 水=4:1:1)でRf=0.3付近の [<sup>75</sup>Se]のスポットを確認定量することで実験を進めた. マウスの cytosol を DEAE-cellulose クロマトで分離すると, 活性は消失したが, 各溶出画分を混合 (compensation assay) することで, 活性を見い出すことができた. その2つの画分は0.13 M KClで溶出するSerRSより低塩濃度で溶出する画分 (0.10 M KCl)と高塩濃度で溶出する画分 (0.2 M KCl)であった. この濃い塩濃度で溶出する画分はH<sub>2</sub>SeとATPからSePを生合成するSePSであることを確認した.<sup>12,13)</sup> これにより低塩濃度で溶出する画分がSecSと考えられた. その後, SecSを大量に得るため, 材料をウシ肝に変更して行った. Figure 1に各種動物細胞の cytosol の Sephacryl S-300でのクロマトのパターンを示した. ウシやCos7細胞

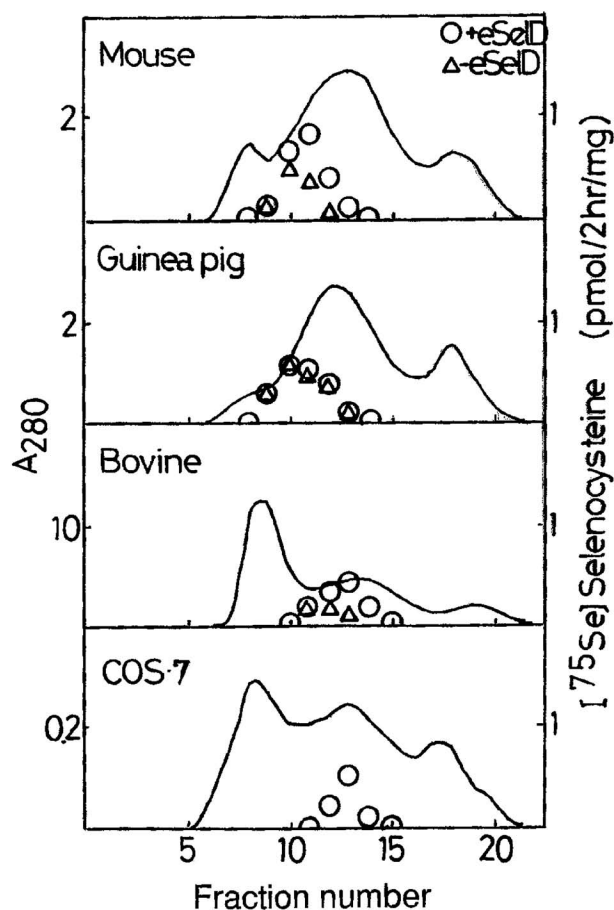


Fig. 1. Elution Patterns of Cytosols on Sephacryl S-300  
Circles and triangles are in the presence and absence of bovine SePS.

(サル)ではFraction 13付近にSePS存在下でSecS活性が見い出された. これに比し, マウスやモルモットではSePSがなくても活性があり, Fraction 10-11の高分子量の溶出位置で溶出し, SecSとSePSがcomplexを作っていると考えられた. これはアミノアシル tRNA合成酵素類がcomplexを作っていることから異常なことではない. このように哺乳類の中でも, マウス, モルモットとウシ, サルでSec合成酵素活性成分の分子篩クロマトでパターンでその挙動が異なった.

ウシのSecSはDEAE-celluloseのイオン交換クロマトでSerRSより早く溶出し, この画分をさらに精製を進めたところ, Blue-Sepharoseで2つの画分に分離し, compensation assayを行った結果, タンパクピークの前後のフラクションを混合することで活性が見い出された. このmain peakの前部分をSecSβと名付け, ピークの後部分に溶出する画分をSecSαと名付けた. このSecSαとSecSβについて

Sec 合成での反応順序を調べたところ, Ser-tRNA と SecS $\alpha$  の反応産物をアルコール沈殿で得, ついでこれに SecS $\beta$  と SePS を加えることにより, Sec が合成されることを見出した. 一方, その逆 (SecS $\beta$ →SecS $\alpha$ ) の順序では Sec は合成できなかった. これらの結果をまとめた模式図を Fig. 2 に示した. これは, Ser-tRNA (○) は SecS $\alpha$  の上でアミノアクリル-tRNA (▲) (未確認) となり, ついで SecS $\beta$  上で tRNA のアミノアクリル基と SeP から Sec-tRNA (■) ができると考えた. Cytosol の DEAE-cellulose パターン上で SecS 活性の前に SecS $\alpha$  を加えると Sec 合成活性が現れる画分があり, これが SecS $\beta$  と考えられた. この結果, SecS $\beta$  と SecS $\alpha$  は 1 部重なりあいながら, DEAE-cellulose パターン上で溶出されることが分かった.

このように哺乳類では SecS 活性が 2 つの成分 (SecS $\alpha$  と SecS $\beta$ ) からなることが分かったが, 両者は残念ながら未精製である.<sup>14)</sup> また, 自己免疫性肝炎<sup>15)</sup> やその他で Sec tRNA に生体内で結合しているタンパク質が SerRS や Sec tRNA 特異的伸長因

子以外にも報告されており, それらを文献<sup>16)</sup> にまとめた. このうち SLA/LP が SecS であるとの報告<sup>17)</sup> がされたが, これが SecS $\alpha$  なのか SecS $\beta$  なのかは不明である. われわれは SLA/LP に SecS 活性は見い出せなかった.<sup>18)</sup>

### 5. 生物 5 界説

生物は 5 Kingdoms (5 界) からなるとされ, それはモネラ界, 原生動物界, 菌界, 植物界, 動物界である. この 5 生物界で Se-タンパク質とその生合成系が存在しているのは動物界とモネラ界の 1 部である. 一方, シロイヌナヅナのゲノム配列から植物には Sec 合成系と取り込み系はなかった, また酵母を含む菌界にもない (無 Se 培地で培養した酵母を動物の飼料として使う, 酵母に Se は必須でない). それでいまだ不明だったのが原生動物界であった. 原生動物は葉緑素の有無から, 原生動物と原生植物に分けられる. われわれは原生動物 (動物) のハダカフタヒゲムシ (*Oxyrrhis marina*, 赤潮の原因生物) 中の Sec の存在について調べた結果,<sup>19)</sup> ウシの精製 SecS により *O. marina* tRNA 中に Sec tRNA

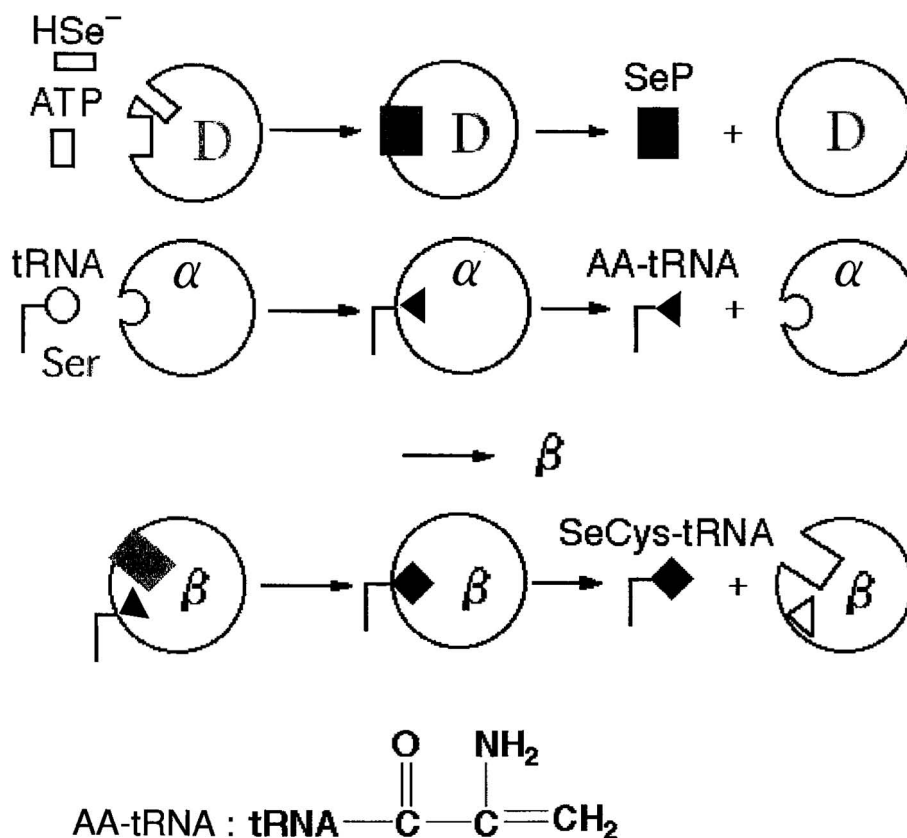


Fig. 2. Schematic Presentation of Successive Sec Synthesis by Two Components (SecS $\alpha$  and SecS $\beta$ ) of Bovine Sec Synthase and SePS (D)

の存在を示すことができた, また  $[^{75}\text{Se}]$  の取り込みによる Se-タンパクの存在と Western blot 法により伸長因子の存在も明らかにした. このように原生生物中に Sec translation machinery が存在することが分かった. また, 面白いことに *O. marina* の cytosol を用いて, Sec 合成を検討すると, ウシよりも *O. marina* の tRNA でより多量の Sec を合成した. これらの結果はウシ, *O. marina* とも, それぞれ種特異的な Sec 生合成系を持つことも明らかとなった. このように原生生物 (動物) にもそれぞれ自身の Se-タンパク合成のための tRNA, Sec 合成酵素, ペプチド伸長因子が存在することを示した.<sup>19)</sup> 一方, 葉緑素を含む原生植物のミドリムシにも Sec 系が存在することが報告されている.

続いて, 動物界での比較について述べる. 哺乳動物で cytosol 中の酵素類のクロマト上での挙動が違うことを先に述べた. ウシ, *Fasciola gigantica* (肝蛭), *Caenorhabditis elegans* (線虫) から tRNA をフェノール法で抽出し, Sephacryl S-200 のゲルろ過で調製した. ムシの酵素は cytosol を用いた. ウシは部分的に精製した tRNA と酵素を用いた. これらの系で生合成した  $[^{14}\text{C}]$  Seryl-tRNA と  $[^{75}\text{Se}]$  Sec-tRNA 量を Table 1 に示した. *F. gigantica* や *C. elegans* 中に Sec tRNA やその生合成系が存在する. *F. gigantica* の tRNA は *C. elegans* 及びウシの酵素により Serylation 及び Selenylation を受ける. *C. elegans* の Sec tRNA はウシの SecS により認識されるが, ウシの Sec tRNA は *C. elegans* の SecS により認識され難い. このように, 虫と哺乳類の種の間

Table 1. Serylation and Selenylation Activities of tRNA and Enzymes

tRNA	Enzymes	Activities	
		Serylation (dpm/A <sub>260</sub> )	Selenylation (PSL)
<i>F. gigantica</i>	<i>F. gigantica</i>	100	3.2
	<i>C. elegans</i>	115	6.7
	Bovine liver	105	16.3
<i>C. elegans</i>	<i>F. gigantica</i>	115	3.0
	<i>C. elegans</i>	750	4.5
	Bovine liver	610	107
Bovine liver	<i>F. gigantica</i>	90	14.4
	<i>C. elegans</i>	500	5.5
	Bovine liver	450	269

で tRNA と Sec 合成酵素の交換は効くが, 一部反応しない場合もある. Figure 3 に Sec tRNA の系統樹を示した. *Archaea* や *Eukarya* で Sec tRNA は 9/4 (AA stem の塩基対数/T $\psi$  stem の塩基対数) 構造であるが, *Bacteria* では 8/5 構造である. どちらにしても Sec tRNA の両 stem の合計塩基数は 13 であり, 他の通常の tRNA ではそれが 12 である. われわれの研究では哺乳類, 虫, 及び原生生物で, 活性を測定したが, Sec 系を有する 3 界間 (動物界, モネラ界, 原生生物界) での比較が必要である.

分子進化の進化系統樹の解析から, Sec 生合成系 (tRNA, SecS, SePS) と Sec 取り込み系 (伸長因子, mRNA 上の Sec 取り込み情報) の分子進化の比較をしたが, この両系は別々に発達したと考えられた (未発表). この結果では, Sec 生合成系は進化的に古く, Sec 取り込み系はより新しかった.

## 6. Sec tRNA Identity

70 種類ほどある tRNA の中でそれぞれのアミノ酸特異性を現し, それぞれの特異的 aminoacyl-tRNA 合成酵素によって認識される部位を identity と呼ぶ. Sec tRNA はまず SerRS に認識され, セリンを受容した Seryl-tRNA が SecS に認識され Sec-tRNA に変換される. このように Sec tRNA には SerRS と SecS に認識される 2 種の identity 部位がある. SerRS は 3 種のセリン tRNA (アンチコドンに IGA を持つ Ser tRNA と GCU を持つ Ser tRNA そして Sec tRNA) 上の discrimination (73 番目) 塩基の G と長い extra arm をその identity 部位として認識する. この 3 種の tRNA から Sec tRNA のみが SecS に認識される. この SecS に対する identity (認識) 部位を明らかにするため, 多くの Sec tRNA 変異体を本総説の前半に述べた T7 RNA polymerase 法で作製した. 初めに Sec tRNA の identity に関与するであろう部位を変化させて失活させることにより調べた. その結果 Sec tRNA を失活させる identity 部位は 9 塩基対の AA stem と 6 塩基対の D stem であった.<sup>20-23)</sup> 9 塩基対と 6 塩基対を持たない Sec tRNA 変異体は Sec 受容能がなくなった. ついでこれを証明するため, 主要な Ser tRNA でアンチコドンに IGA を持つ tRNA を 9 塩基対+6 塩基対型の Sec tRNA に変異すると Sec 受容能が生まれた. これにより Sec tRNA 上の Sec 合成酵素に対する identity 部位が 9 塩基対の AA stem

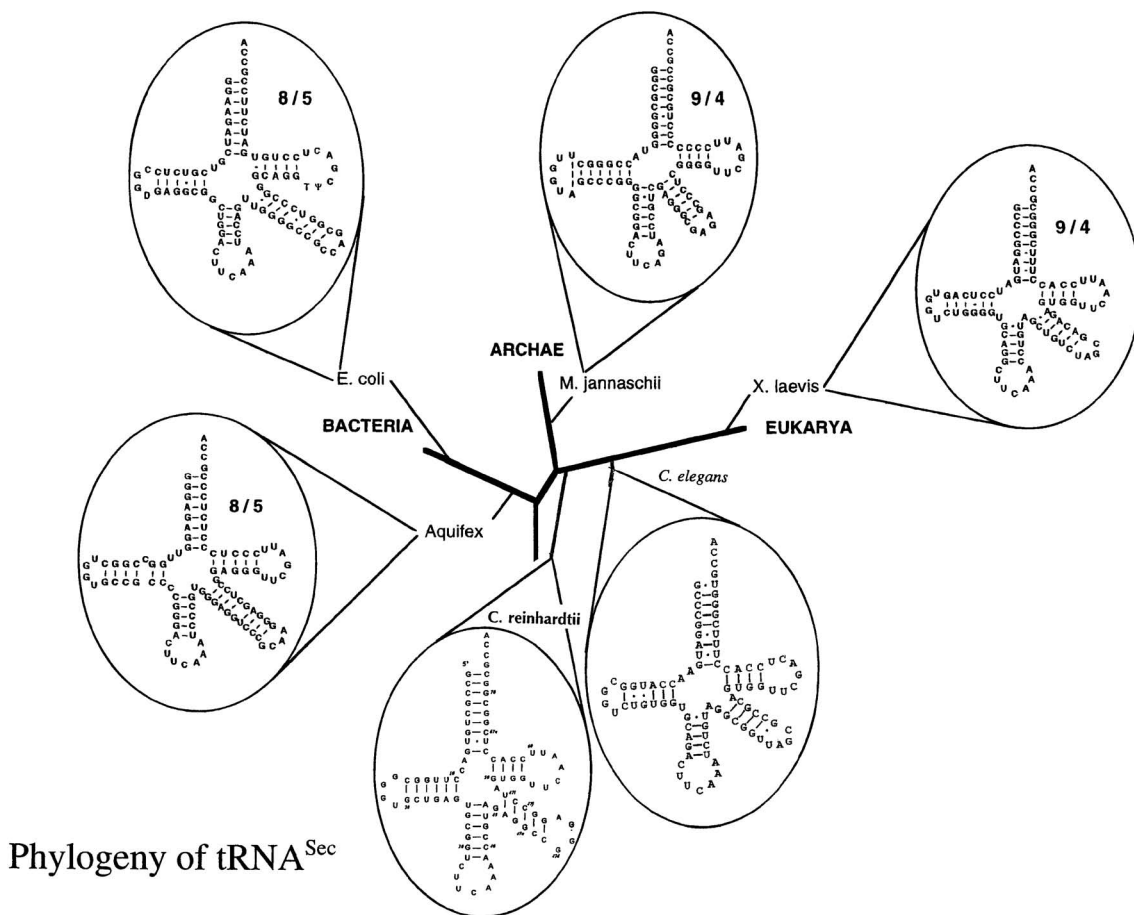


Fig. 3. Phylogeny of Sec tRNA Structure

と6塩基対のD stemであることを明らかにすることができた。これは安定な SerRS, 豊富な Sec tRNA, 放射比活性の高い [<sup>75</sup>Se] が入手できたことにより成功したものである。

Table 2 に Serylation と Selenylation に及ぼす AA stem と Tψ stem の塩基対数の関連を示した。Serylation をみても、総塩基対数が X33 の 14 では活性がなく、Y11 の 11 でも活性がない。12-13 塩基対だと活性がある。また、AA stem や Tψ stem の長さはそれぞれ 7-9 塩基対や 3-5 塩基対でも活性があり、これらの長さ自体はあまり関係がなく、総塩基数が重要である。一方、Selenylation は AA stem が 7-8 塩基対では活性がなく、9 塩基対であることが活性発現に重要であることが分かる。以上の結果から、L 字型の tRNA をイメージする場合、SecS は L 字型の内側から入って認識し、SerRS は L 字型の上から認識する。

7. 終わりに

Sec の研究ではこのほかに、ストラスプールの

Table 2. The Influence of Length of AA-+T-Stems on Serylation and Selenylation

tRNA	Length	Relative $V_{max}/K_m$ value Serylation	Selenylation
Native Sec tRNA (9 bp AA+4 bp T)		1.00	1.00
X33 (9 bp AA+5 bp T)		0.015	0.20
X34 (9 bp AA+3 bp T)		0.96	0.35
Native Ser tRNA (7 bp AA+5 bp T)		1.00	0
Y8K (8 bp AA+5 bp T)		0.48	0.003
Y11 (7 bp AA+4 bp T)		0	0

From Ref. 22).

ICBM の Krol 博士との共同研究で Sec-tRNA 特異的ペプチド伸長因子の探索を行い、eEFsec (mSelB) の存在と配列を明らかにした。<sup>24)</sup> これとは別にわれわれの研究室では以前から伸長因子の存在を示していた。<sup>25,26)</sup> この伸長因子の認識に Sec tRNA の AA stem 上の G : U 塩基対が含まれることを示した。<sup>27)</sup> 以上筆者による Sec 研究の 1 部を示

したが、このほかにも多くの協同研究者による Sec についての研究結果があるが省いた。また、筆者は Sec の研究以外にも「固相表面への高分子吸着の研究」、「筋ジストロフィー病因の研究」、最近の「薬物代謝酵素の研究」を行ってきたがこれらも省いた。筆者が係わった多くの研究は熱意のある協同研究者の努力によりなり立ったものである。

**謝辞** 本研究は設置者の名古屋市からの研究費及び施設・機器によりなり立ったものであり、ここに設置者の名古屋市当局に深く感謝するものである。

#### REFERENCES

- 1) "The Travels of Marco Polo" Translated by Latham R. E., Penguin Books, London 1958, p90; "Tohokenbunroku 1" Marco Polo, Translated by Matsuo A., Heibonsha, Tokyo, 1970, p133.
- 2) Schwarz K., Foltz C. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3292-3293 (1957).
- 3) Keshan Disease Research Group, *Chin. Med. J.*, **92**, 477-482 (1979).
- 4) Beck M. E., Esworthy R. S., Ho Y. S., Chu F.-F., *FASEB J.*, **12**, 1143-1149 (1998).
- 5) Mizutani T., Kanaya K., Osaka T., *J. Health Sci.*, **47**, 407-413 (2001).
- 6) Hatfield D., Portugal F. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **67**, 1200-1206 (1970).
- 7) Mizutani T., Hashimoto A., *FEBS Lett.*, **169**, 319-324 (1984).
- 8) Mizutani T., Narihara T., Hashimoto A., *Eur. J. Biochem.*, **143**, 9-13 (1984).
- 9) Diamond A., Dudock B., Hatfield D., *Cell*, **25**, 497-506 (1981).
- 10) Chambers I., Frampton J., Goldfarb P., Affala N., McBain W., Harrison P., *EMBO J.*, **5**, 1221-1227 (1986).
- 11) Mizutani T., Kurata H., Yamada K., Totsuka T., *Biochem. J.*, **284**, 827-834 (1992).
- 12) Mizutani T., Kanaya K., Tanabe K., *BioFactors*, **9**, 27-36 (1999).
- 13) Furumiya K., Kanaya K., Tanabe K., Tanaka Y., Mizutani T., *Mol. Biol. Rep.*, (in press).
- 14) Mizutani T., Goto C., Totsuka T., *J. Health Sci.*, **46**, 399-404 (2000).
- 15) Mizutani T., Shinoda M., Tanaka Y., Kuno T., Hattori A., Usui T., Kuno N., Osaka T., *Drug Metab. Rev.*, **37**, 235-252 (2005).
- 16) Goto C., Osaka T., Mizutani T., *BioFactors*, **14**, 25-35 (2001).
- 17) Yuan J., Palioura S., Salazar J. C., Su D., O'Donoghue P., Hohn M. J., Cardoso A. M., Whitman W. B., Söll D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 18923-18927 (2006).
- 18) Tanaka Y., Osaka T., Hattori A., Murakami Y., Matsufuji T., Matsufuji S., Shinkawa T., Isobe T., Mizutani T., *J. Health Sci.*, **53**, 682-691 (2007).
- 19) Osaka T., Beika A., Hattori A., Kohno Y., Kato K. H., Mizutani T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 236-240 (2003).
- 20) Sturchler-Pierrat C., Hubert N., Totsuka T., Mizutani T., Carbon P., Krol A., *J. Biol. Chem.*, **270**, 18570-18574 (1995).
- 21) Amberg R., Mizutani T., Wu X.-Q., Gross H. J., *J. Mol. Biol.*, **263**, 8-19 (1996).
- 22) Mizutani T., Kanaya K., Ikeda S., Fujiwara T., Yamada K., Totsuka T., *Mol. Biol. Rep.*, **25**, 211-216 (1996).
- 23) Mizutani T., Goto C., *FEBS Lett.*, **466**, 359-362 (2000).
- 24) Fagegaltier D., Hubert N., Yamada K., Mizutani T., Carbon P., Krol A., *EMBO J.*, **19**, 4796-4805 (2000).
- 25) Yamada K., *FEBS Lett.*, **377**, 313-317 (1995).
- 26) Fujiwara T., Busch K., Gross H. G., Mizutani T., *Biochimie*, **81**, 213-218 (1999).
- 27) Mizutani T., Tanabe K., Yamada K., *FEBS Lett.*, **429**, 189-193 (1998).