

セレン代謝における NifS ホモログの役割

三原久明¹⁾, 加藤伸一郎¹⁾, Gerard M. Lacourciere²⁾, Thressa C. Stadtman²⁾,
栗原達夫¹⁾, 徳本梅千代³⁾, 高橋康弘³⁾, 江崎信芳¹⁾

(¹⁾京都大学化学研究所*, (²⁾NHLBI, National Institutes of Health**, (³⁾大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻***)

Role of NifS homologs in selenium metabolism

Hisaaki MIHARA¹⁾, Shin-ichiro KATO¹⁾, Gerard M. LACOURCIERE²⁾, Thressa C. STADTMAN²⁾, Tatsuo KURIHARA¹⁾,
Umechiyo TOKUMOTO³⁾, Yasuhiro TAKAHASHI³⁾, and Nobuyoshi ESAKI¹⁾

¹⁾Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, Japan

²⁾Laboratory of Biochemistry, NHLBI, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA

³⁾Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka University,
1-1 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan

Three NifS-like proteins, IscS, CSD, and CsdB, from *Escherichia coli* catalyze the removal of sulfur and selenium from L-cysteine and L-selenocysteine, respectively, to form L-alanine. These enzymes are proposed to deliver a sulfur atom for iron-sulfur cluster, thiamin, 4-thiouridine, biotin, and molybdopterin. It was reported that selenium mobilized from free selenocysteine is incorporated specifically into a selenoprotein and tRNA *in vivo*, supporting the involvement of the NifS-like proteins in selenium metabolism. We here report evidence that a strain lacking IscS is incapable of synthesizing mnm⁵se²U and its precursor mnm⁵s²U in tRNA, suggesting that the sulfur atom released from L-cysteine by the action of IscS is incorporated into mnm⁵s²U. The lack of IscS also caused a significant loss of the selenium-containing formate dehydrogenase H. Together, these results suggest a dual function of IscS in sulfur and selenium metabolism.

大腸菌の3つのNifSホモログ (IscS¹⁾, CSD²⁾, CsdB³⁾) は、L-システイン、L-セレノシステインから硫黄、セレンをそれぞれ脱離し、L-アラニンを生成する反応を触媒するピリドキサール酵素である⁴⁾。これらの酵素は、鉄-硫黄クラスター⁵⁾、チアミン⁶⁾、ピオチン⁷⁾、4-チオウリジン⁶⁾、モリブドプテリン⁸⁾に硫黄を供給する役割を担うと考えられている。さらに、本酵素群はセレンタンパク質およびセレン含有tRNAへのセレン供与系として機能することが示唆されている^{9,10)}。本研究では、3つのNifSホモログが、セレンタンパク質生合成およびセレン含有tRNA生合成に関与するかを明らかにすることを目的とした。

実験方法

IscS, CSD, CsdBをコードする遺伝子 (*iscS*, *csdA*, *csdB*) の内、各一つを破壊した大腸菌変異株 (*iscS* 欠損株, *csdA* 欠損株, *csdB* 欠損株) を作製した。これらを⁷⁵Se]Na₂SeO₃を含む培地で培養し、菌体破碎により得られた抽出液をSDS-PAGEおよびPhosphorImagerにて分析した。また、各変異株から、⁷⁵Seまたは³⁵SでラベルされたtRNAを抽

*所在地：宇治市五ヶ庄 (〒611-0011)

**所在地：Bethesda, Maryland 20892, USA

***所在地：豊中市待兼山1-1 (〒560-0043)

出し^{11,12)}, 加水分解後得られたヌクレオシドをHPLCにて分析した¹³⁾。

結果と考察

3つの大腸菌変異株 (*iscS*欠損株, *csdA*欠損株, *csdB*欠損株) において, tRNAへのセレンの取り込みが起こるかどうか調べるために, [⁷⁵Se]Na₂SeO₃を含む培地で培養した各変異株より粗抽出液を得, これをSDS-PAGEおよびPhosphorImagerにて分析した。その結果, *iscS*欠損株以外の全ての株において, セレノ-tRNAに相当する放射性バンドが確認された (Fig. 1)。従って, *iscS*欠損株はtRNAにセレンを取り込むことが出来ないが, これに対して, *csdA*欠損, *csdB*欠損はtRNAへのセレンの取り込みには影響を与えないことが明らかとなった。*iscS*欠損株がtRNAへセレンを取り込むことが出来ないことは, HPLCを用いた解析によっても確認された (Fig. 2)。⁷⁵Se]Na₂SeO₃を含む培地で培養した*iscS*欠損株よりtRNAを抽出し, P1ヌクレアーゼとホスファターゼで処理した後, 逆相クロマトグラフィーに供した。*iscS*欠損株においては, 保持時間3.7分付近に溶出される[⁷⁵Se]5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン (mnm⁵se²U) のピークが見られなかった。以上のことから, IscSは, 5-メチルアミノメチル-2-チオウリ

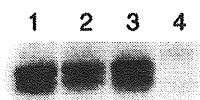


Fig. 1 Effect of *csdA*, *csdB*, and *iscS* deletions on the formation of ⁷⁵Se-labeled tRNAs. Cell extracts from *E. coli* wild-type (lane 1), *csdA*⁻ (lane 2), *csdB*⁻ (lane 3), and *iscS*⁻ (lane 4), grown anaerobically in LB containing 0.1 μM Na₂SeO₃ and 20 μCi of Na₂⁷⁵SeO₃, were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and PhosphorImager detection.

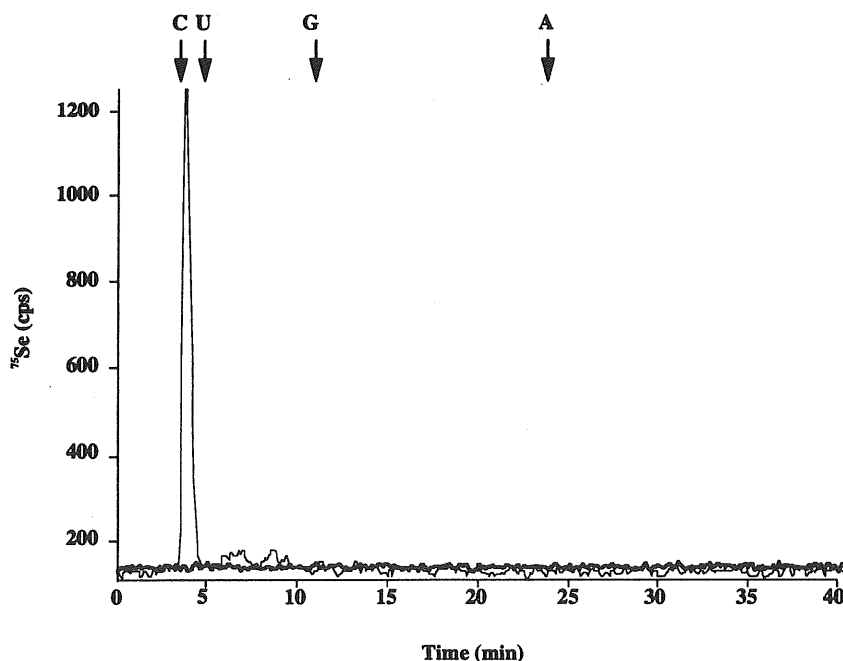


Fig. 2 HPLC analysis of nucleosides from ⁷⁵Se-labeled bulk tRNA from *E. coli* wild-type (thin line) and *iscS*⁻ (thick line). Elution positions of the four major nucleosides are indicated by arrows.

ジン ($\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$) から $\text{mnm}^5\text{se}^2\text{U}$ への変換あるいは、 $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$ の生成自体に関与していることが示唆された。

次に、*iscS* 欠損が $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$ の生合成に与える影響を調べるため、 ^{35}S で標識した *iscS* 欠損株由来の tRNA を P1 スクレアーゼとホスファターゼで処理した後、逆相クロマトグラフィーに供した。野生型株では、2つの主要な ^{35}S 標識されたヌクレオシドのピークが見られ、8.3分のピークは $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$ に、27.1分のもは 4-チオウリジン (s^4U) に対応していた (Fig. 3)。一方、*iscS* 欠損株から調製した tRNA には、 ^{35}S [$\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$] も ^{35}S [s^4U] も存在していないことが明らかとなった。以上の結果より、IscS は $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$ と s^4U の両方に硫黄を供給する働きがあることが示された。

セレノホスフェートシンターゼの触媒作用により生成されるセレノホスフェートは、セレンタンパク質と $\text{mnm}^5\text{se}^2\text{U}$ へセレンを供給することが知られている¹⁴⁾。大腸菌の3つの NifS ホモログ (IscS, CSD, CsdB) は、セレノホスフェートシンターゼの基質を生成することが示されている⁹⁾。そこで、*iscS* 欠損株においてセレンタンパク質であるギ酸脱水素酵素へのセレノシステイン挿入が起こるかどうかを調べた。 ^{75}Se [Na_2SeO_3] を含む培地で培養した野生型株と *iscS* 欠損株の粗抽出液を SDS-PAGE と PhosphorImager により分析した。野生型株においては、ギ酸脱水素酵素に対応する 79 kDa の位置に放射性同位体で標識されたバンドが確認された。セレノシステインを培地に加えた場合、ギ酸脱水素酵素への ^{75}Se の取り込みが著しく減少するので、セレノシステインに由来するセレンはギ酸脱水素酵素に取り込まれると考えられる。野生型株で得られた結果に対して、*iscS* 欠損株においては、 ^{75}Se で標識されたギ酸脱水素酵素はセレノシステイン非存在下で顕著に減少していた (Fig. 4)。これらの結果は、*iscS* 欠損が、セレノシステインを有するギ酸脱水素酵素の生合成に影響を与えることを示しており、IscS が *in vivo* においてセレンの代謝に関与することを示唆するものである。

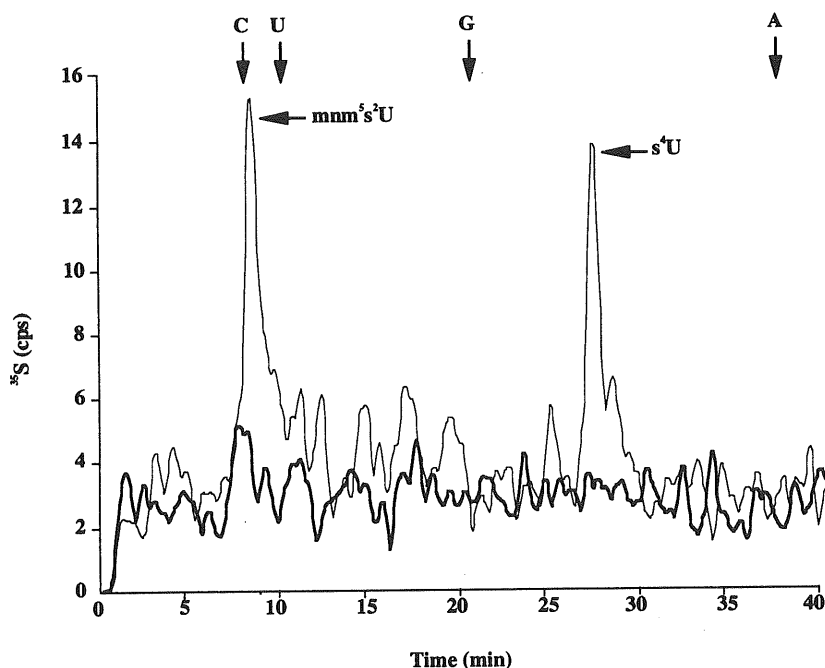


Fig. 3 HPLC analysis of nucleoside from ^{35}S -labeled bulk tRNA from *E. coli* wild-type (thin line) and *iscS*⁻ (thick line). Elution positions of the four major nucleosides are indicated by arrows. tRNA labeled with ^{35}S was digested to nucleosides and analyzed by HPLC at a flow rate of 0.5 ml/min.

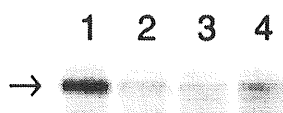


Fig. 4 Incorporation of ^{75}Se into FDH_H polypeptide in the wild-type (lanes 1 and 2) and iscS^- (lanes 3 and 4) strains in the presence (lanes 2 and 4) or absence (lanes 1 and 3) of added L-selenocysteine ($0.2 \mu\text{M}$). Cells were grown anaerobically in LB media containing $0.1 \mu\text{M}$ Na_2SeO_3 and $20 \mu\text{Ci}$ of $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_3$ in the presence or absence of L-selenocysteine and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and PhosphorImager detection.

文 献

- 1) Flint, D.H. (1996) J. Biol. Chem. 271 : 16068 - 16074.
- 2) Mihara, H., T. Kurihara, T. Yoshimura, K. Soda and N. Esaki (1997) J. Biol. Chem. 272 : 22417 - 22424.
- 3) Mihara, H., M. Maeda, T. Fujii, T. Kurihara, Y. Hata and N. Esaki (1999) J. Biol. Chem. 274 : 14768 - 14772.
- 4) Mihara, H., T. Kurihara, T. Yoshimura and N. Esaki (2000) J Biochem. (Tokyo) 127 : 559 - 567.
- 5) Zheng, L., V.L. Cash, D.H. Flint and D.R. Dean (1998) J. Biol. Chem. 273 : 13264 - 13272.
- 6) Lauhon, C.T. and R. Kambampati (2000) J. Biol. Chem. 275 : 20096 - 20103.
- 7) Tse Sum Bui, B., F. Escalettes, G. Chottard, D. Florentin and A. Marquet (2000) Eur. J. Biochem. 267 : 2688 - 2694.
- 8) Leimkuhler, S. and K.V. Rajagopalan (2001) J. Biol. Chem. 276 : 22024 - 22031.
- 9) Lacourciere, G.M., H. Mihara, T. Kurihara, N. Esaki and T.C. Stadtman (2000) J. Biol. Chem. 275 : 23769 - 23773.
- 10) Lacourciere, G.M. and T.C. Stadtman (1998) J. Biol. Chem. 273 : 30921 - 30926.
- 11) Wittwer, A.J., L. Tsai, W.M. Ching and T.C. Stadtman (1984) Biochemistry 23 : 4650 - 4655.
- 12) Lacourciere, G.M. (2002) J. Bacteriol. 184 : 1940 - 1946.
- 13) Gehrke, C.W., K.C. Kuo, R.A. McCune, K.O. Gerhardt and P.F. Agris (1982) J. Chromatogr. 230 : 297 - 308.
- 14) Glass, R.S., W.P. Singh, W. Jung, Z. Veres, T.D. Scholz and T.C. Stadtman (1993) Biochemistry 32 : 12555 - 12559.