

ヒト肺がん細胞のセレノリン酸合成酵素 *Sps1*, *Sps2* の機能解析

田村 隆, 山本真平, 高畑宗明, 田中英彦, 稲垣賢二  
 (岡山大学大学院・自然科学研究科・バイオサイエンス専攻\*)

**Characterization of selenophosphate synthetase homologs  
*Sps1* and *Sps2* from human lung adenocarcinoma cells**

Takashi TAMURA, Shinpei YAMAMOTO, Muneaki TAKAHATA,  
 Hidehiko TANAKA and Kenji INAGAKI  
 Department of Bioresources Chemistry, Graduate School of Natural Science and  
 Technology, Okayama University

Selenium is an essential trace element for mammals, birds, and some bacteria. Its remarkable biological effects in eukaryotes may be related to unique functions of various selenoproteins. Selenoprotein biosynthesis requires monoselenophosphate, which is synthesized from selenide and ATP by selenophosphate synthetase (SPS). In the present study, *Sps1* and *Sps2* genes were cloned from a cDNA library of the lung adenocarcinoma cells NCI-H441. The in-frame TGA codon of the lung *Sps2* was genetically altered to TGT (Cys) to obtain *Sps2Cys* gene. The human lung *Sps* homologs were characterized by an *in vivo* complementation assay using a  $\Delta selD$  mutant host strain. A low-salt medium optimized for *in vivo selD*-complementation assay allowed recombinant *Sps2Cys* to effectively complement the *selD* mutation. In contrast, only a weak complementation by the *Sps1* gene was observed when selenite was the selenium source. Better complementation by *Sps1* was observed with L-SeCys, suggesting the involvement of a selenocysteine  $\beta$ -lyase for mobilization of selenium. The results of the complementation study suggested that *Sps1* encoded enzyme that functions on selenocysteine recycling whereas the *Sps2* enzyme can function as a *de novo* selenite assimilation system.

セレンと硫黄は化学的性質が互によく似ているので、硫黄代謝にセレンが紛れ込み硫黄化合物のセレンアナログが作られ、それが結果的にセレンの激しい毒性として顕れる。逆にUGAコドンによって指示された位置にセレノシステイン残基を挿入してセレントリプトファンを生成するような本来のセレン代謝には1,000倍以上高濃度に存在する硫黄化合物を排除して、セレンだけを特異的に代謝するような選別の仕組みが必要になる。大腸菌では、セレン酵素やセレン含有tRNAの生合成にはselD遺伝子産物が必要とされる<sup>1)</sup>。selD遺伝子がコードする蛋白質は、セレノリン酸合成酵素であり、無機セレンとATPからモノセレノリン酸を生成する<sup>2)</sup>。セレノリン酸合成酵素の触媒作用は、selenideがATPの $\gamma$ -phosphorylグループに移されて、同時に無機リン酸とAMPが形成する<sup>3-4)</sup>。

本研究では、哺乳動物*Sps*ホモログの生理的役割や活性中心残基の触媒機能などを明らかにするために、ヒト肺がん細胞から*Sps1*と*Sps2*をクローニングして機能解析をおこなった。組換え遺伝子*Sps1*, *Sps2Cys*は好氣的条件下で培養すると、大腸菌宿主に対してきわめて毒性が高いことが示されたのでselD欠損大腸菌を用いて、*in vivo*相補アッセイ系を利用してこの二つの遺伝子産物の諸性質を検討した。ヒト肺*Sps*を再現性よく発現させるためにNaCl濃度を下

\*所在地：岡山市津島中3-1-1 (〒700-8530)

げセレンなど微量元素を添加する新たな培地を作った。*Sps2Cys* 遺伝子は大腸菌 WL400 ( $\Delta selD$ ) 内においては、亜セレン酸、L-セレノシステインのいずれのセレン源でも野生株 MC4100 と同程度に強い FDH<sub>H</sub> 活性を示した。それとは対照的に、*Sps1* による相補効果は弱々しく、亜セレン酸を FDH<sub>H</sub> 合成のセレン源として添加した場合には効果が低かった。ところが *Sps1* は培地にセレノシステインをセレン源として添加するとセレノリン酸を供給する活性を示した。

### 実験方法

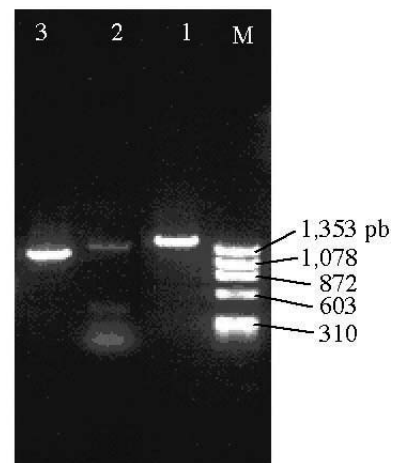
RT-PCR クローニング：ヒト肺腺がん細胞 NCI-H441 から抽出した 3  $\mu$ g の mRNA から Omniscript RT kit (Quiagen) を用いて cDNA ライブラリを調製して、HotStarTaq PCR kit (Quiagen) を用いて *Sps1*, *Sps2* の遺伝子を増幅した。これらの遺伝子は、発現プラスミド pQE30 ベクターのクローニングサイト *Bam*HI-*Hind*III または *Bam*HI-*Sal*I サイトに挿入した。塩基配列は ABI-Prism310 シーケンサーで解読して、*Sps2* 遺伝子のセレノシステイン残基をコードするオパールコドン TGA を Cys 残基をコードする TGT に部位特異的変異処理してこれを *Sps2Cys* 遺伝子とした。配列の比較は NCBI のホームページの Multiple Alignment を利用して行った。

*in vivo* アッセイ：クローニングした *Sps* 遺伝子は大腸菌内で不安定であった。そこで著者らは、*in vivo* 系で *Sps* 遺伝子の発現産物の諸性質を検討した。報告によれば *in vivo* における *selD* 相補試験は *E. coli* のギ酸脱水素酵素 FDH<sub>H</sub> の活性によりセレン蛋白質合成能として評価できる<sup>4,5)</sup>。その方法でヒト肺がん由来 *Sps* の活性測定を行ったが、この方法はヒト肺の *Sps* には再現性が低かった。種々の条件検討の結果、著者らは培地中の塩濃度を低く (NaCl 0.1~0.25%) すると *in vivo* アッセイの感度と再現性が著しく改善されることを見つけた。培地成分の最適化の結果、1.6% (w/v) ポリペプトン、1% 酵母エキス、0.1% NaCl、pH 7、1.5% 寒天に 1  $\mu$ M Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> または 0.5  $\mu$ M L-SeCys を添加した培地を確立してこれを Stadtman 培地と名づけた。形質転換してコロニー形成した大腸菌をこの培地に線引きして、CO<sub>2</sub> で満たした嫌気バックの中に入れて 30℃ でインキュベーションした。IPTG 添加はかえって *in vivo* 活性が弱くなるのでこの実験では誘導剤の添加はしなかった。はっきりとギ酸脱水素酵素の活性を顕すためにはセレン源の添加が必要であった。培地中のセレン添加量は次のような検討の結果、1  $\mu$ M に決定された。つまり、亜セレン酸ナトリウムは 10  $\mu$ M まで添加しても大腸菌の生育に影響しないが、10  $\mu$ M の L-SeCys を培地中に添加すると大腸菌は生育できなかった。L-SeCys 添加は 0.1  $\mu$ M または 1  $\mu$ M までの濃度が適当であった。

### 結果・考察

#### 1. RT-PCR クローニング

*Sps1* は RT-PCR 産物としてアガロースゲル上に強いシグナルを与えた。対照的に *Sps2* のシグナルは極めて微弱でありその増幅には Q-solution (Quiagen) の添加が必要であった。Q solution を添加せずに Mg 濃度や温度プログラムを変更しても *Sps2* の増幅はできなかった。ただし Q-solution を添加して得られるアガロース電気泳動上の PCR シグナルはきわめて弱いものであった (Fig. 1)。*Sps1* と *Sps2* は互いに高い相同性を持つので、この増幅効率の違いは *Sps2* の転写産物が *Sps1* よりもはるかに少ないコピー数であることを示している。



**Fig. 1** RT-PCR of human lung *Sps* genes from NCI-H441. Lane M,  $\phi$ X174/*Hae*III markers; lane 1, Cytosolic thioredoxin reductase (TrxR1) amplified as a positive control; lane 2, *Sps2* gene amplified in the presence of Q-solution; lane 3, *Sps1* gene amplified in the presence of 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> without Q-solution.

## 2. *Sps2Cys*発現プラスミドの構築

*Sps2* 遺伝子の配列解析の結果, *Sps2* の 1.347bp には二ヶ所の点突然変異が存在し, そのうちのひとつ A901G 変異は Thr301Ala のアミノ酸置換を生じたが, G1221A はアミノ酸置換のないサイレントな変異であった。この *Sps2* 遺伝子の TGA (SeCys) コドンを TGT (Cys) コドンに変異導入して, その結果得られたプラスミドを pCR*Sps2Cys* とした。pCR-*Sps2Cys* を *Bam*HI, *Hind*III 消化して 1.2 kb 断片を pQE30 にライゲーションして発現プラスミド pQE30*Sps2Cys* を調製した。

## 3. 配列比較

大腸菌セレノリン酸合成酵素 SPS の活性中心残基 Cys-17 はグリシンリッチな配列 -Gly16-Cys17-Gly18-Cys19-Lys20-Ile21-Ser22-Pro23 の中に位置している。細菌, アーキア, 真核生物の SPS 配列のマルチプルアライメントにより大腸菌 SPS のグリシンリッチな配列が高度に保存されていることが明らかになった (**Fig. 2**)。Cys17 の前の Gly16 はすべての酵素で保存されている。Gly18-Cys19 も多くの SPS ホモログにあるが, 細菌やアーキアの *Sps* では Ala に置換されたものも多い。大腸菌 SELD では Lys20 が触媒上必要な残基である<sup>6)</sup>, これもすべての SPS ホモログに高度に保存されている。この Lys20 の次には疎水性アミノ酸 Val, Ile, Leu のいずれかが入り Pro が 22 または 23 番目に入るのも共通した配列上の特徴である。もしも Gly16 から Ile/Val/Leu21 が  $\alpha$ ヘリックスまたはループ構造をとれば Lys20 は Cys17 に近い位置にあって, pKa を低下させてチオール基の解離を促進すると考えられる。

Eukaryote*...*			
HL_	<i>Sps2</i>	58	KGUGCKVPQE 68
Mmus	2	67	KGUGCKVPQE 77
HL_	<i>Sps1</i>	27	KGTGCKVPQD 37
Mmus	1	27	KGTGCKVPQD 37
Dmel	1	47	KGRGCKVPQD 57
Dmel	2	17	TGUSCKIPQK 27
Cele		31	KGCGCKVPRN 41
Cbri		31	KGCGCKVPRD 41
Archaea *...*			
Mkan		14	HGUACKLPQG 24
Mjan		17	HGUACKLPST 26
Bacteria*...*			
Ecol		15	AGCGCKISPK 25
Styp		15	AGCGCKISPK 25
Ypes		15	AGCGCKISPK 25
Hinf		15	AGUGCKISPK 25
Rmel		14	GGCGCKLAPS 24
Aaeo		15	SGCAAKVGP 25
Cjej		15	AGCAAKLSPG 25
Gsul		14	AGUAAKLGPA 24
Tten		14	AGCAAKIGPE 24
Eacil		16	SGCAAKIGPE 26
Eaci2		36	AGCAAKLGPE 46

**Fig. 2** Amino acid sequence alignment of SPS homologs from the human lung cancer cell (HuLung), mouse (Mmus), *Drosophila melanogaster* (Dmel), *Caenorhabditis elegans* (Cele) and *C. briggsae* (Cbri), *Methanopyrus kandleri* (Mkan), *Methanococcus jannaschii* (Mjan), *Escherichia coli* (Ecol), *Salmonella typhimurium* (Styp), *Yersinia pestis* (Ypes), *Haemophilus influenzae* (Hinf), *Rhizobium meliloti* (Rmel), *Aquifex aeolicus* (Aaeo), *Campylobacter jejuni* (Cjej), *Geobacter sulfurreducens* (Gsul), *Thermoanaerobacter tengcongensis* (Tten), *Eubacterium acidaminophilum* (Eacil and Eaci2).

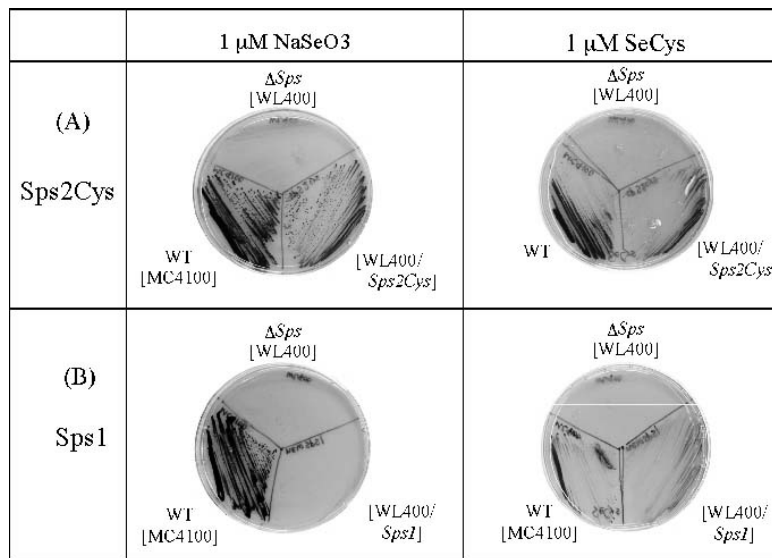
## 4. 大腸菌での *Sps* 遺伝子の発現

ヒト肺 *Sps* 遺伝子を大腸菌細胞中での発現はまったく成功しなかった。検討したベクターは pQE30 のほかに pUC18, pKK233-3, pET32a。宿主としては, JM109, DH5 $\alpha$ , BL21 (DE3) と M15。いずれも蛋白質としての発現が確認できなかった。*E. coli* ABLE-K 株 (Toyobo) は, 通常の宿主大腸菌に比べて plasmid コピー数を 10 分の 1 に抑制する。そこ

でpQE30*Sps1*とpQE30*Sps2Cys*の宿主としてABLE-K株を検討したが、SPS蛋白質の大きさに相当するCoomassie blue-stainedバンドはやはり認められなかった。

### 5. ヒト肺*Sps1*, *Sps2Cys*による*selD*の相補実験

pQE30ベクターにクローニングされたヒト肺*Sps1*, *Sps2Cys*は、大腸菌の*selD*欠損を相補する能力が異なっていた。*Sps2Cys*遺伝子は1  $\mu$ M亜セレン酸を添加した培地上で大腸菌WL400(*selD*欠損)株に強いFDH<sub>H</sub>活性を示した。その発色は野生株MC4100と同じくらい強かった。セレン源として1  $\mu$ MのL-セレノシステインが与えられると、FDH<sub>H</sub>活性は亜セレン酸を与えたときよりもやや弱い発色を示した。*Sps2Cys*にとって亜セレン酸はL-セレノシステインよりも良好なセレン源であることが示唆された (**Fig 3**)。これらの結果とは対照的に*Sps1*遺伝子を形質転換した大腸菌では亜セレン酸をセレン源とする条件できわめて弱いFDH<sub>H</sub>活性しか生産されなかった。興味深いことに、L-セレノシステインがセレン源として与えられると、*Sps1*を形質転換した大腸菌が明らかなFDH<sub>H</sub>活性が現れた。セレノシステインのセレン源が高いFDH<sub>H</sub>活性につながるのは、L-セレノシステインから遊離したセレンが*Sps1*の基質になることを示している。細菌のセレン蛋白質合成にセレノシステイン $\beta$ リアーゼが関わっていることが最初に示されたのは、セレノプロテインA (*Clostridium sticklandii*のグリシン還元酵素複合体)の生合成研究である。このセレン蛋白質の<sup>75</sup>Se標識セレノシステイン由来のセレンは<sup>75</sup>Se標識亜セレン酸よりも効率よく<sup>75</sup>Se標識セレノプロテインAに取り込まれた<sup>7)</sup>。さらに*Azobactor vinelandii*<sup>8)</sup>のNifS蛋白質や大腸菌NifS様蛋白質がセレノシステインからセレンを遊離させて、そのセレンがSPSによるセレノリン酸合成の基質になることが報告されている。さらに、大腸菌においてセレノシステインから遊離するセレンが特異的に大腸菌FDH<sub>H</sub>に取り込まれることが報告されている<sup>9)</sup>。NifS様蛋白質は活性中心付近に保存性の高いCys残基を持っており、そのシステイン残基は基質セレンを結合してSPSのようなセレンを基質とする酵素に供給すると考えられている<sup>10)</sup>。著者らの実験においてヒト肺*Sps1*も*E. coli*の代謝系を利用して蛋白質に結合したセレンを基質として利用していると考えられる。これと同様に、大腸菌SEL<sub>D</sub>の活性中心Cys17をセリン残基に置換した変異酵素がやはりセレノシステインをセレン源とした場合には微弱ではあるが酵素活性を示すと報告されている。セレン基質の要求性という観点から、大腸菌酵素Cys17/Serはヒト*Sps1*とアナログであると考えられる。



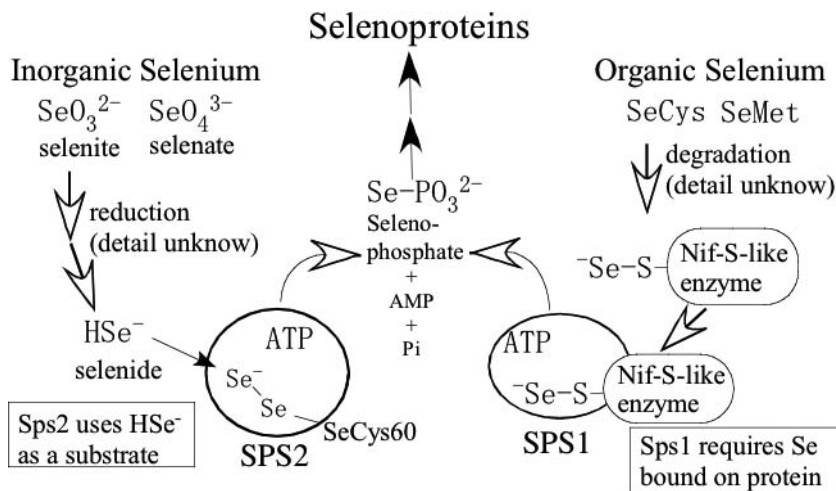
**Fig. 3** *SelD*-complementation by human lung *Sps* genes. *E. coli* MC4100 (wild-type), WL400 ( $\Delta selD$ ), and WL400 transformed with pQE30*Sps2Cys* (A) or with pQE30*Sps1* (B) were grown anaerobically at 30°C on a plate containing 10  $\mu$ M sodium molybdate and 1  $\mu$ M sodium selenite or 1  $\mu$ M L-selenocysteine. Soft agar containing 0.75% agar, 1 mg/ml of benzyl viologen, 0.25 M sodium formate, and 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> was laid over the culture. Colonies with active FDH<sub>H</sub> reduced benzyl viologen, which develops a deep blue color.



## 6. 基質特異性の違いと生理的意義

ヒト肺 *Sps* 遺伝子の基質特異性の違いに基づいてこれらの生理的役割を考察した (Fig. 4)。まず, *Sps2* はセレン源として亜セレン酸を利用できる酵素であり, 細胞内では亜セレン酸が還元されて生成するセレニドを基質にすると考えられる。謎とされていた活性中心 SeCys60 の役割とは, 還元されたセレニドに結合して酵素基質複合体を形成する残基として考えられる。また, *Sps1* はセレン源としてセレノシステインが与えられると活性を示した。ほ乳類細胞でも NifS 様蛋白質が関与するセレノシステイン  $\beta$  リアーゼが関わっていると考えられるので, これはセレノシステインのリサイクル経路が考えられる。L-セレノシステインはシステイン合成系で非特異的に生成すると可能性があるが, セレン酵素が分解されて生成することもあり得る。この肺腺がん細胞では C 末端から 2 番目にセレノシステイン残基を持つチオレドキシ還元酵素が正常肺細胞の百倍以上の以上高発現している<sup>11)</sup>。セレン酵素の代謝回転で生じる遊離セレノシステインがリサイクルされる経路の中で *SPS1* が関わる可能性がある。

本研究の結果, ほ乳類のセレン代謝として有機態セレンと無機セレンでは異なるセレン同化経路と異なる *Sps* アイソザイムが関わる可能性が提案された<sup>12)</sup>。このことは, サプリメント開発などセレンの生理活性を積極的に利用する目的の下に疫学的調査, 代謝研究を行う際には, セレンの供給源として有機態セレンと無機セレンを意識的に区別する必要性を示唆する重要な意味を持つ。セレン代謝経路をさらに詳しく研究するためには, 今後の課題として, *SPS1* にセレンを運ぶタンパク質を同定することや *SPS2*/大腸菌 SELD での SeCys/Cys 残基の触媒上の役割を分子レベルで証明する課題が残されている。



**Fig. 4** Selenium assimilation routes proposed for the lung adenocarcinoma cell NCI-H441. Up-regulation of SPS2, capable of using selenide-derived from selenite, provides a bypass route, which directly converts selenide into monoselenophosphate, leading to an increased cellular selenium pool. The SeCys-60 residue in *Sps2* is proposed to provide a selenide binding site for enzyme-substrate complex formation. SPS1 that lacks a SeCys or Cys residue in the corresponding glycine-rich sequence would require a selenium-delivery system, in which activated selenium is supplied as a perselenide (-S-SeH) derivative.

## 文 献

- 1) Rosenfeld I, Beath OA (1964) Selenium, Geobotany, biochemistry, toxicity and nutrition. New York, Academic Press.
- 2) Schwarz K, Foltz CM (1957) Selenium as an integral part of Factor 3 against dietary necrotic liver degradation. J. Am. Chem. Soc. **79**, 3292 - 3293.

- 3) Cone JE, Del Rio RM, Davis JN, Stadtman TC (1976) Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. Proc Natl. Acad. Sci USA, **73**, 2659 - 2663.
- 4) Apei H (1937) Report of etiological survey on Keshan disease. Research Reports of Continental Academy **1**, 1-10 (in Japanese).
- 4) Speranza ML, Ronchi S, Minchiotti T (1973) Purification and characterization of yeast thioredoxin reductase. Biochim. Biophys. Acta **327**, 274 - 281.
- 5) Chen CC, Moore EC, McCall BLB (1987) Comparison of thioredoxin reductases from Novikoff ascites hepatoma cells and normal liver of rats. Cancer Res. **38**, 1885 - 1888.
- 6) Luthman M, Holmgren A (1982) Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. Biochemistry **21**, 6628 - 6633.
- 7) Chen CC, McCall BLB, Moore, EC (1977) Purification and properties of bovine thioredoxin system. Prep. Biochem. **7**, 165 - 177.
- 8) Tsang MLS, Weatherbee JA (1981) Thioredoxin, Glutaredoxin, and Thioredoxin Reductase from Cultured HeLa Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 7478 - 7482.
- 9) Martinez-Galisteo E, Padilla CA, Garcia-Alfonso C, Lopez-Barea J, Barcena, JA (1993) Purification and properties of bovine thioredoxin system. Biochimie **75**, 803 - 809.
- 10) Leinfelder W, Forchhammer K, Veprek B, Zehelein E, Boeck A (1990) In vitro Synthesis of Selenocysteinyl-tRNAUCA from Seryl-tRNAUCA: Involvement and Characterization of the selD Gene Product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 543 - 547.
- 11) Tamura T, Stadtman TC (1996) A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells; purification, properties, and thioredoxin reductase activity, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 1006 - 1011.
- 12) Tamura T, Yamamoto S, Takahata M, Sakaguchi H, Tanaka H, Stadtman TC (2004) Selenophosphate synthetase genes *Sps1* and *Sps2* from lung adenocarcinoma cells; *Sps1* for recycling L-selenocysteine and *Sps2* for selenite assimilation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**, 16162 - 16167.