

## 大腸菌の亜セレン酸同化は、チオレドキシン還元系に依存する

高畑 宗明<sup>1)</sup>, 田村 隆<sup>1)</sup>, 阿部 勝正<sup>2)</sup>, 三原 久明<sup>2)</sup>,  
江崎 信芳<sup>2)</sup>, TC. Stadtman<sup>3)</sup>, 稲垣 賢二<sup>1)</sup>  
(<sup>1)</sup>岡大院 自然化学\*, (<sup>2)</sup>京大院 化学研\*\*, (<sup>3)</sup>NHLBI, NIH, USA)

### Thioredoxin Reductase-Dependent Assimilation of Selenite into FDH<sub>H</sub> in *Escherichia coli*

Muneaki TAKAHATA<sup>1)</sup>, Takashi TAMURA<sup>1)</sup>, Katsumasa ABE<sup>2)</sup>, Hisaaki MIHARA<sup>2)</sup>,  
Nobuyoshi ESAKI<sup>2)</sup>, Thressa C. STADTMAN<sup>3)</sup> and Kenji INAGAKI<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>Dept. of Bioresource, Faculty of Agriculture, Okayama Univ.,  
<sup>2)</sup>Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., <sup>3)</sup>NHLBI, NIH, USA

#### Summary

A labile selenium donor compound, selenophosphate, is synthesized from selenide and ATP by selenophosphate synthetase (SPS). Selenophosphate is required by several bacteria and by mammals for the specific incorporation of selenium into selenoproteins and modified seleno-tRNAs. Although free selenide can be used *in vitro* for synthesis of selenophosphate, the physiological selenium substrate has not been identified. To identify the selenite-reducing system in *E. coli*, we constructed a *gor* mutant strain and a *trxB* mutant strain of *E. coli* MC4100. Active FDH<sub>H</sub> can be detected by monitoring benzyl viologen reduction. In the cells growing under fermentative condition on low-salt-medium in the absence of formate at pH 7.5, the activity of FDH<sub>H</sub> was optimum. The wild-type strain MC4100 and the *gor* mutant strain were able to produce an active FDH<sub>H</sub>, but the *trxB* mutant strain failed to show FDH<sub>H</sub> activity. When  $\Delta selD$  mutant strains were complemented by human lung *Sps2Cys*, the *trxB* mutant strain couldn't generate active FDH<sub>H</sub>. We suggest that reduction of selenite *in vivo* is not dependent upon the glutathione-reducing system, but instead on the thioredoxin-reducing system.

セレンは人体にとっての必須微量元素であるが、必要摂取量のわずか10倍程度の過剰摂取で強い毒性を示す。そのため、セレン代謝は細胞内で厳密に制御されていると考えられる。セレンは他の微量元素とは異なり、独自の遺伝コードを持ちセレノシステイン残基としてセレントリシステイン残基中に直接挿入される。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タンパク質はセレノリン酸合成酵素であり、セレン源とATPからモノセレノリン酸を生成する<sup>2)</sup>。しかし、セレノリン酸合成酵素の基質となるセレン源の形態は未だ不明瞭である。

以前、亜セレン酸 ( $SeO_3^{2-}$ ) が細胞内チオールと反応しセレノトリスルフィド (-S-Se-S-) を形成することが報告された<sup>3)</sup>。セレノトリスルフィドは、無機セレンを高い反応性を持つセレン化合物に変換する過程で中間体となりうることが示唆された。多くのバクテリアや真核生物において、グルタチオン (GSH) が細胞内チオールとしての役割を果たす。*in vitro* では、亜セレン酸とGSHとの反応の研究がなされている<sup>4)</sup>。4 : 1のモル比でGSHと  $SeO_3^{2-}$  は非酵素的に反応し、

\*所在地：岡山市津島中1-1-1 (〒700-8530)

\*\*所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

セレンジグeltaチオン (GSSeSG) を形成する。その後、GSSeSGは主にグルタチオン還元酵素 (GR) 系により還元され、グルタチオニルセレンジオアニオン (GSSe<sup>-</sup>) が産生する。これらGSSeSGおよびGSSe<sup>-</sup>はセレン代謝経路において重要な中間体であると考えられている。

しかし、中性pH付近ではGSSeSGは非常に不安定であり、ただちに末端産物である元素セレンが析出するため、亜セレン酸還元系の間mediateとして疑問が残る。また、GSSeSGは直接生理的条件下で使用されるにはあまりに不安定であり、このことはとくに過剰のGSHが存在する場合に顕著である。このため、SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup>が何らかの形でタンパク質に結合し、安定した形でセレンを還元する経路が存在すると推測された。

大腸菌の細胞内レドックス制御を行う還元系として、チオレドキシシン還元系が存在する<sup>5)</sup>。これまでの報告の中に、チオレドキシシン (Trx) が硫黄受容体としてシステイン残基に硫黄を結合し、チオレドキシシン還元酵素 (TrxR) の還元力により硫黄転移酵素のロダネースに基質として硫黄を供給することが示されている<sup>6)</sup>。このことから安定的な亜セレン酸還元経路として、Trxのシステイン残基がSeO<sub>3</sub><sup>2-</sup>をS-Se結合で結合して有機体の形でセレンリン酸合成酵素に運搬し、NADPH依存のTrxRの還元力によってセレンをTrxからセレンリン酸合成酵素の活性中心に受け渡すのではないかと仮定した。この仮説を基にTrx系とSeO<sub>3</sub><sup>2-</sup>代謝経路との関わりを検証するため、チオレドキシシン還元系とグルタチオン還元系を個別に破壊した菌株を作製し、*in vivo*でのセレンタンパク質合成能を検討した。

## 実験方法

遺伝子破壊株作製：大腸菌MC4100および大腸菌WL400 ( $\Delta selD$ ) の *trxB* 遺伝子、*gor* 遺伝子への抗生物質耐性マーカーの挿入は、P1バクテリオファージを用いた形質導入法で行った。*gor* 遺伝子破壊株はテトラサイクリン含有培地、*trxB* 遺伝子破壊株はカナマイシン含有培地で選抜した。抗生物質耐性マーカー挿入の確認はPCR法で行った。

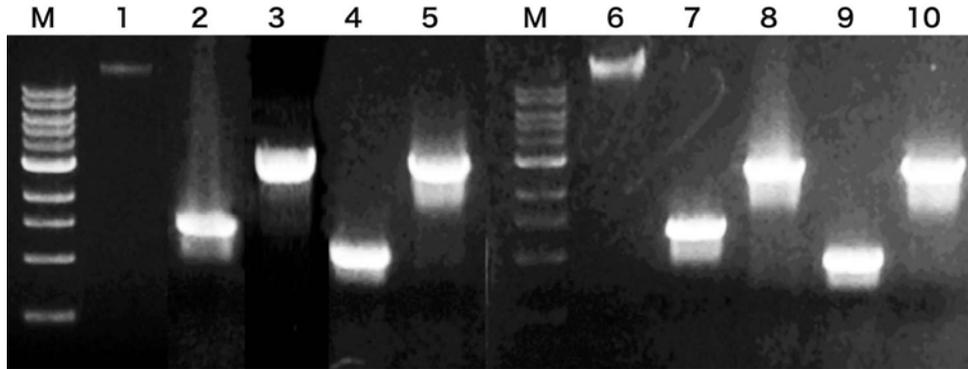
Sps2クローニング：ヒト肺がん細胞NCI-H441からRT-PCRで増幅した *Sps2* 遺伝子を、pTrcHis-TOPOベクター (*invitrogen*) にTAクローニングした。塩基配列はABI-Prism310シーケンサーで解読し、*Sps2* 遺伝子のセレンシステイン残基をコードするオパールコドンTGAを、Cys残基をコードするTGTに部位特異的変異処理をしてこれを *Sps2Cys* とした。

FDH<sub>H</sub>活性測定：大腸菌を嫌気培養した際に産生されるギ酸脱水素酵素H (FDH<sub>H</sub>) の酵素活性を測定した。FDH<sub>H</sub>によるBenzyl viologenのギ酸依存還元反応を指標とし、600 nmの吸光度測定により評価した<sup>7)</sup>。前培養として大腸菌を5 mLのLB培地に植菌し、37℃で一晩好氣的に培養した。その後滅菌済みの培地を5 mL容のバイアルに充填し、前培養した菌体を100  $\mu$ L ( $\Delta trxB$ 株は300  $\mu$ L) 添加した。その後Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup>およびNa<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>をそれぞれ1  $\mu$ M、10  $\mu$ Mとなるように培地に添加し、30℃で20時間嫌氣的に培養した。嫌気培養を行ったサンプルからエッペンドルフチューブに1 mL添加し、遠心分離 (14,000  $\times$  rpm, 1 min) して集菌した。沈殿を100 mM Tris-phosphate (pH 7.5, 5 mM MgSO<sub>4</sub>含む) に懸濁し洗浄後、再度同様に懸濁しサンプルとした。サンプルを全量プラスチックセルに充填し、酸化型Benzyl viologenを終濃度2 mMとなるように添加した。100 mM phosphate (pH 7.0) に溶解した1 Mギ酸ナトリウムを終濃度20 mMとなるように添加し反応を開始した。反応開始後10分~15分後の傾きを計算に使用した。1 unitは1分間に還元された酸化型Benzyl viologen 1 mmolに相当する。また、benzyl viologenのモル吸光係数は7,400 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>である。5% SDSで溶菌した菌体の全タンパク質量測定にはLowry法を用いた。

## 結果

### 1. 遺伝子破壊株作製

大腸菌MC4100および大腸菌WL400 ( $\Delta selD$ ) 株のグルタチオン還元酵素遺伝子 (*gor*)、チオレドキシシン還元酵素遺伝子 (*trxB*) をそれぞれ個別に破壊した株を作製した。非破壊株および破壊株の各遺伝子断片をPCRで増幅し、アガロースゲル電気泳動で確認した (Fig. 1)。MC4100とMC4100 ( $\Delta gor$ ) を比較した場合、MC4100 ( $\Delta gor$ ) のゲノムDNAを鋳型とした *gor* 遺伝子増幅断片で、抗生物質耐性マーカー導入による断片長の伸長が確認された。同様にして



**Fig. 1** Generation of *E. coli* *gor* and *trxB* mutant Strains. PCR of *gor* and *trxB* genes from *E. coli* genomic DNA. Lane M, 1 kb markers; lane 1 and 6, genomic DNA from MC4100 and WL400; lane 2 and 7, *gor* gene from MC4100 and WL400; lane 3 and 8, *gor::tet* gene from MC4100 ( $\Delta$ *gor*) and WL400 ( $\Delta$ *gor*); lane 4 and 9, *trxB* gene from MC4100 and WL400; lane 5 and 10, *trxB::kan* gene from MC4100 ( $\Delta$ *trxB*) and WL400 ( $\Delta$ *trxB*).

MC4100 ( $\Delta$ *trxB*), WL400 ( $\Delta$ *selD*,  $\Delta$ *gor*), WL400 ( $\Delta$ *selD*,  $\Delta$ *trxB*) の遺伝子断片を確認した。

## 2. FDH<sub>H</sub>最適発現条件検討

セレンは大腸菌のギ酸脱水素酵素FDH<sub>H</sub>のポリペプチド鎖に、セレンシステイン残基として挿入される<sup>8)</sup>。よって *in vivo*における大腸菌FDH<sub>H</sub>活性を指標とし、セレンタンパク質合成能を評価することができる。まず培地条件の検討を行った。以前著者らは、プレート上での *in vivo*アッセイ培地成分の最適化を行い、塩濃度を低く設定したStadtman培地を確立した<sup>9)</sup>。この条件を主体とし、グルコース添加の有無がFDH<sub>H</sub>活性に与える影響を検討した。また、セレン源として1  $\mu$ M亜セレン酸を添加し、培養時のpHを6.5および7.5に設定した。その結果、培養温度を30℃に設定しグルコースを添加しない場合に高いFDH<sub>H</sub>活性を得た (Table 1)。報告によれば、ペプトンを主体とした培地条件で高いFDH<sub>H</sub>活性が確認されている<sup>10)</sup>。また、ペプトン培地条件下でギ酸添加がFDH<sub>H</sub>活性を増加させることが報告されている<sup>11)</sup>。よってギ酸含有ペプトン培地を基本としグルコース添加の影響を検討した結果、培養温度を30℃に設定しグルコースを添加した場合に最も高いFDH<sub>H</sub>活性が確認された (Table 2)。またグルコースを添加しない条件では、大腸菌の生育が著しく阻害された。これはペプトン培地においてグルコースが主な炭素源として用いられるためと考えられる。また、ペプトン培地に0.5%グルコースを添加した条件でギ酸添加の影響を検討した結果、ギ酸を添加しない場合は活性がほぼ1/2に低下した (データ非掲載)。さらに、Stadtman培地にグルコースを添加した条件で、ギ酸添加の影響を検討した。その結果ギ酸添加は活性の上昇に影響を与えなかった。またグルコースを除いた条件でも同様にギ酸添加によるFDH<sub>H</sub>活性の上昇は確認されなかった (Table 3)。Table 1およびTable 2の結果ともに、同等のFDH<sub>H</sub>活性が確認されたが、ペプトン培地にグルコースを添加した条件では炭酸ガスの発生が多く内圧の上昇による容器の破損が多く見られたため、Table 1の条件で培養を行うことに決定した。

**Table 1** Effects of glucose on FDH<sub>H</sub> activity in *E. coli* MC4100 grown under anaerobic condition at 30°C or 37°C in Stadtman medium

Growth condition	FDH <sub>H</sub> activity ( $\mu$ mol/min/mg protein)
30°C	0.102 $\pm$ 0.014
30°C (+ 0.5 % glucose)	0.062 $\pm$ 0.003
37°C	0.049 $\pm$ 0.004
37°C (+ 0.5 % glucose)	0.059 $\pm$ 0.007

Stadtman medium containing 1.6 % peptone, 1.0 % yeast extract, 0.1 % NaCl, 10  $\mu$ M Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ M sodium selenite and 0.1 M potassium phosphate (pH 6.5).

**Table 2** Effects of glucose on FDH<sub>H</sub> activity in *E. coli* MC4100 grown under anaerobic condition at 30°C or 37°C in peptone medium

Growth condition pH 7.5	FDH <sub>H</sub> activity ( $\mu$ mol/min/mg protein)
30°C	ND
30°C (+ 0.2 % glucose)	0.110 $\pm$ 0.011
37°C	ND
37°C (+ 0.2 % glucose)	0.095 $\pm$ 0.014

Peptone medium containing 2 % peptone, 0.5 % NaCl, 30 mM sodium formate, 10  $\mu$ M Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ M sodium selenite and 0.1 M potassium phosphate (pH 7.5).  
ND, not determined.

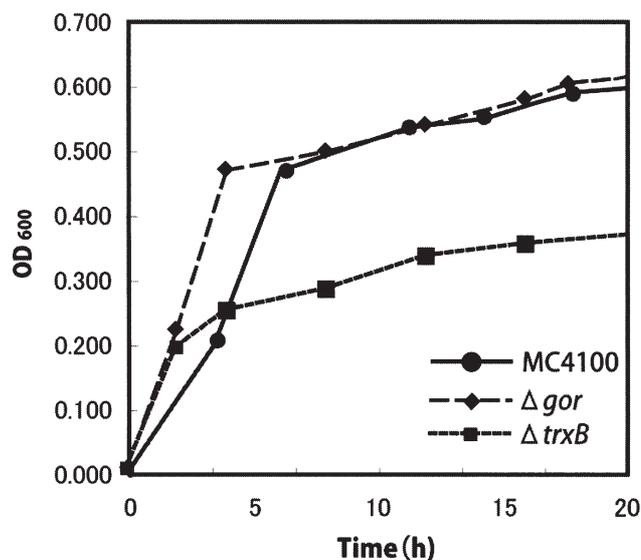
**Table 3** Effects of formate on FDH<sub>H</sub> activity in *E. coli* MC4100 grown under anaerobic condition at 30°C or 37°C in Stadtman medium

Growth condition pH 7.5	FDH <sub>H</sub> activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)
30°C	0.060 $\pm$ 0.005
30°C (+ 30 mM formate)	0.055 $\pm$ 0.007
37°C	0.046 $\pm$ 0.005
37°C (+ 30 mM formate)	0.034 $\pm$ 0.003

Modified Stadtman medium containing 1.6 % peptone, 1.0 % yeast extract, 0.1 % NaCl, 10  $\mu\text{M}$  Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1  $\mu\text{M}$  sodium selenite, 30 mM sodium formate and 0.1 M potassium phosphate (pH 7.5).

### 3. 遺伝子破壊株の細胞増殖曲線

Table 1で決定した培養条件を用い、野生株の大腸菌MC4100および*gor*欠損株、*trxB*欠損株の細胞増殖曲線を作製した (Fig. 2)。野生株、*gor*破壊株は同様の増殖パターンを示したが、*trxB*破壊株は培養開始4時間以降に増殖が緩やかとなり、15時間でほぼ一定となった。GR、TrxRともに生体内の酸化還元反応に深く関与しているが、おそらく嫌気培養時によりTrxRの方が細胞増殖に影響を与えるのではないかと考えられる。FDH<sub>H</sub>活性測定時に菌体量を揃えるため、*trxB*破壊株は前培養から本培養へ添加する菌体量を野生株、*gor*破壊株の3倍とした。



**Fig. 2** The growth curve of *E. coli* MC4100 wild-type, *gor* and *trxB* mutants. The cells were grown in Stadtman medium containing 1.6 % peptone, 1.0 % yeast extract, 0.1 % NaCl, 10  $\mu\text{M}$  Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1  $\mu\text{M}$  sodium selenite at 30°C under anaerobic condition.

### 4. 培養時間に伴うFDH<sub>H</sub>活性の変化

最適培養時間を検討するため、野生株を用い培養時間ごとのFDH<sub>H</sub>活性を測定した (Table 4)。培養開始後12時間程度で活性の上昇が緩やかになり、20時間でほぼ一定となった。よってFDH<sub>H</sub>活性測定の際、培養時間は20時間と決定した。

**Table 4** Effect of growth time on FDH<sub>H</sub> activity in *E. coli* wild-type MC4100

Time (h)	O.D. 600	FDH <sub>H</sub> activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)
3	0.214	0.021
6	0.483	0.066
12	0.534	0.095
14	0.560	0.098
16	0.511	0.085
18	0.592	0.101
20	0.597	0.114

The cells were grown in Stadtman medium containing 1.6 % peptone, 1.0 % yeast extract, 0.1 % NaCl, 10  $\mu\text{M}$  Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1  $\mu\text{M}$  sodium selenite at 30°C under anaerobic condition.

#### 5. *gor*および*trxB*破壊が大腸菌の亜セレン酸還元に与える影響

*gor* 遺伝子破壊株および*trxB* 遺伝子破壊株を用いて、亜セレン酸還元に与える影響を検討するためFDH<sub>H</sub>活性測定を行った。セレン源として培地中に1  $\mu\text{M}$ 亜セレン酸を添加した場合、大腸菌野生株MC4100は高いFDH<sub>H</sub>生産能を示した。これまで亜セレン酸還元系は主にグルタチオン還元系に依存していると考えられてきた。しかしながら、*gor*破壊株は野生株とほぼ同等の強いFDH<sub>H</sub>活性を示した。このことから、亜セレン酸還元がグルタチオン還元酵素に非依存的であると推察される。一方興味深いことに、亜セレン酸をセレン源とした際に*trxB*破壊株では著しくFDH<sub>H</sub>活性が減少した。ほ乳類セレノリン酸合成酵素2 (SPS2)は大腸菌セレノリン酸合成酵素 (SELD) に相当し、セレン源として亜セレン酸を利用できる酵素である<sup>12)</sup>。著者らがクローニングしたヒト肺がん細胞由来*Sps2Cys*で、大腸菌WL400 ( $\Delta selD$ )の*selD*欠損を相補し同様の実験を行った。その結果大腸菌*selD*を指標とした場合と同様に、非破壊株および*gor*破壊株では高いFDH<sub>H</sub>活性を示したのに対し、*trxB*破壊株では極めて弱いFDH<sub>H</sub>活性しか生産されなかった。

**Table 5** Effect of *gor* and *trxB* mutation on FDH<sub>H</sub> activity

Strains	FDH <sub>H</sub> activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)
MC4100 (wild-type)	0.113 $\pm$ 0.011
MC4100 ( $\Delta gor$ )	0.094 $\pm$ 0.009
MC4100 ( $\Delta trxB$ )	0.008 $\pm$ 0
WL400 ( $\Delta selD$ )	< 0.000
WL400 / <i>Sps2Cys</i>	0.097 $\pm$ 0.014
WL400 ( $\Delta gor$ ) / <i>Sps2Cys</i>	0.084 $\pm$ 0.008
WL400 ( $\Delta trxB$ ) / <i>Sps2Cys</i>	0.006 $\pm$ 0

The cells were grown in Stadtman medium containing 1.6 % peptone, 1.0 % yeast extract, 0.1 % NaCl, 10  $\mu\text{M}$  Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1  $\mu\text{M}$  sodium selenite at 30°C under anaerobic condition.

## 考 察

これまでの研究から、セレン代謝は有機体セレンと無機セレンとは異なる同化経路が存在することが明らかになりつつある。有機体セレンのL-セレノシステインからは、NiS様タンパク質によりセレンが遊離し、タンパク質に結合したセレンをセレノリン酸合成酵素が利用すると考えられている<sup>13)</sup>。無機セレンの亜セレン酸は、細胞内で還元され生成するセレニドがセレノリン酸合成酵素の基質となると考えられている。従来から細胞内に取り込まれた亜セレン酸は非酵素的にGSHと結合し、その後主にグルタチオン還元系によって還元されると考えられてきた<sup>4)</sup>。しかし生理的条件下ではこの反応系は非常に不安定であり、直ちに元素状のセレンが析出する。このため亜セレン酸の還元系にはまだ未解明な点が多く存在している。近年、セレン結合能を持つタンパク質の候補としてグリセルアルデヒド三リン酸脱水素

酵素<sup>14)</sup>, 3-メルカプトピルビン酸転移酵素<sup>14)</sup>, ロダネース<sup>14, 15)</sup>などが提唱されているが, 細胞内でこれらのタンパク質が実際にセレンを結合しているかは不明である。またタンパク質にセレンが結合した後, この結合を切り離すメカニズムも提唱されていない。このため, 細胞内で亜セレン酸がどのように還元されSPSの基質となるかを検討する必要がある。

本研究では, まず大腸菌のセレンタンパク質であるFDH<sub>H</sub>の最適活性条件検討を行った。確立した条件を元に, 細胞内での代表的な酸化還元系のグルタチオン還元系とチオレドキシン還元系に着目し, それぞれの還元系がセレンタンパク質発現に与える影響について検討した。その結果*gor*破壊株ではFDH<sub>H</sub>活性に影響がなかったが, *trxB*破壊株では著しいFDH<sub>H</sub>活性の減少を示した。ヒト肺由来の*Sps2Cys*で大腸菌*selD*欠損を補完した場合も, 同様に*trxB*破壊株のみFDH<sub>H</sub>活性が消失した。大腸菌Trxは活性中心に2つのCys残基を持っており, ジスルフィド結合を形成することでタンパク質の還元を行っている。亜セレン酸代謝においては, このCys残基が亜セレン酸と結合するのではないかと考えられる。Trxに結合した亜セレン酸はNPDPH依存的にTrxRによって還元され, セレノリン酸合成酵素に基質として安定的にセレンを供給している可能性がある。ヒト由来*Sps2Cys*で*selD*欠損を補完した場合も同様の結果になったことより, 大腸菌チオレドキシン還元系はSELDのみではなくほ乳類*Sps2Cys*とも何らかの相互作用をしていると示唆される。チオレドキシン還元系と亜セレン酸代謝との関連をさらに詳細に検討するため, 今後の課題として<sup>75</sup>Se標識亜セレン酸を用いたRIトレーサー実験を行う必要がある。またチオレドキシン還元系とセレノリン酸合成酵素が直接作用していることを証明するため, *in vitro*でのセレノリン酸合成能の確認等が課題である。

#### 参考文献

- 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) Ganther HE (1968) Selenotrisulfides. Formation by the reaction of thiols with selenious acid. Biochemistry 7: 2898 - 2905.
- 4) Hsieh HS, Ganther HE (1975) Acid-volatile selenium formation catalyzed by glutathione reductase. Biochemistry 14: 1632 - 1636.
- 5) Holmgren A (1979) Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action. J Biol Chem 254: 9113 - 9119.
- 6) Ray WK, Zeng G, Potters MB, Mansuri AM, Larson TJ (2000) Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. J Bacteriol 182: 2277 - 2284.
- 7) Sawers RG, Ballantine SP, Boxer DH (1985) Differential expression of hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli* K-12: evidence for a third isoenzyme. J Bacteriol 164: 1324 - 1331.
- 8) Sliwowski MX, Stadtman TC (1985) Incorporation and distribution of selenium into thiolase from *Clostridium kluyveri*. J Biol Chem 260: 3140 - 3144.
- 9) 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.
- 10) Barramyan K, Mnatsakanyan N, Poladian A, Vassilian A, Trchounian A (2002) The roles of hydrogenases 3 and 4, and the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase, in H<sub>2</sub> production by *Escherichia coli* at alkaline and acidic pH. FEBS Letters 516: 172 - 178.
- 11) Mnatsakanyan N, Vassilian A, Navasardyan L, Bagramyan K, Trchounian A (2002) Regulation of *Escherichia*

- coli* formate hydrogenlyase activity by formate at alkaline pH. *Current Microbiolo* 45: 281 - 286.
- 12) Kim IY, Guimaraes MJ, Zlotnik A, Bazan JF, Stadtman TC (1997) Feral mouse selenophosphate synthetase 2 (SPS2): characterization of the cysteine mutant from overproduced in a baculovirus-insect cell system. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 418 - 421.
  - 13) Lacourciere GM, Mihara H, Kurihara T, Esaki N, Stadtman TC (2000) *Escherichia coli* NifS-like proteins provide selenium in the pathway for the biosynthesis of selenophosphate. *J Biol Chem* 275: 23769 - 23773.
  - 14) Ogasawara Y, Lacourciere GM, Ishii K, Stadtman TC (2005) Characterization of potential selenium-binding proteins in the selenophosphate synthetase system. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 1012 - 1016.
  - 15) Ogasawara Y, Lacourciere GM, Stadtman TC (2001) Formation of a selenium-substituted rhodanese by reaction with selenite and glutathione: possible role of a protein perselenide in a selenium delivery system. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9494 - 9498.