

Title	Functional expression of rat thioredoxin reductase : Selenocysteine insertion sequence element is essential for the active enzyme
Author(s)	藤原, 範子
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43007
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	藤原範子
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 14966 号
学位授与年月日	平成 11 年 9 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Functional expression of rat thioredoxin reductase: Selenocysteine insertion sequence element is essential for the active enzyme (活性を有するラットチオレドキシ還元酵素の発現: セレノシステイン挿入配列は活性のある酵素の発現に必須である)
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之 (副査) 教授 高井 義美 教授 中村 敏一

論文内容の要旨

[目的]

チオレドキシ還元酵素 (TR) は NADPH 依存的にチオレドキシンを還元する酵素で FAD を含む。哺乳類の TR はサブユニット当たりの分子量が 55000 の二量体であることと C 末端から 2 番目のアミノ酸がセレノシステインである点で、大腸菌の TR (分子量が 35000 の二量体でセレノシステインを含まない) とは構造的に異なる蛋白質である。セレノシステインは普通は停止コドンとして働く UGA コドンにコードされている。従って、セレノシステイン残基を蛋白質中に挿入するためには、哺乳類では 3' 非翻訳領域中に存在するセレノシステイン挿入配列 (SECIS エlement) が必要である。このセレノシステイン残基やセレンが TR の酵素活性に必要なことは 2、3 報告があるが、酵素活性を有する哺乳類のリコンビナント TR の発現はまだ報告されていない。また大腸菌で発現させた TR には酵素活性が認められていない。本研究では、活性を有する TR 酵素を得ることと TR 活性に対するセレンの影響を明らかにするために、ラットの TR 遺伝子をクローニングし、COS-1 細胞にトランスフェクションして TR 酵素の発現を行った。さらに 3' 非翻訳領域を削除した cDNA を 4 種類作製し、コンセンサス配列より予想される SECIS エlement (1856-1915 bp) がセレノシステインの挿入や TR 活性に実際に必要であるかどうかを検討した。

[方法ならびに成績]

TR を高発現しているヒト肺癌細胞である A549 細胞を大量培養し、TR とチオレドキシ (TRX) を精製し、ウサギに免疫してそれぞれの抗体を作製した。

ラット腎 cDNA ライブラリー (λ gt 10) とラット肝 cDNA ライブラリー (λ ZAPII) より全長 3.3 kb の TR cDNA クローンを得た。またラット肝臓から抽出した mRNA より RT-PCR 法で TRX の cDNA をクローニングし、ノーザンブロットングのプロープとして用いた。

まず TR 活性に対する培養液中のセレン濃度の影響を調べるために A549 細胞を種々の牛胎児血清 (FBS) 濃度および $1 \mu\text{M}$ の亜セレン酸ナトリウムを添加した培養液中で 3 週間培養し、TR 活性ともう一つのセレン含有酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) 活性を測定した。培養液中で唯一のセレン源であると考えられる FBS のセレン

ン濃度は0.48 μM であった。TR活性はFBS濃度の低下に伴って減少し、セレンの添加で上昇した。しかし、ノーザンブロットングで検出したTRのmRNAレベルは逆にセレンの添加で減少していた。ウエスタンブロットングによって検出したTR蛋白質のレベルはTR活性と同様の傾向を示し、FBSの減少に伴って低下し、セレンの添加で増大した。一方、GPX活性はFBS濃度を低下させてもあまり変化は認められなかったが、セレンを添加すると活性は著しく上昇した。またGPXのmRNAレベルはセレンの添加で増大し、活性とよく一致していた。なお、TRXのmRNAレベルはFBSの低下とセレンの添加で減少したが、TRX蛋白質レベルに変化は認められなかった。以上より、セレンによるTRとGPXの発現制御機構は異なることが示唆された。

クローニングしたラットTR cDNA (WT TR) をCOS-1細胞にエレクトロポレーション法でトランスフェクションを行い、種々のセレン濃度の培養液で3日間培養し、細胞抽出液のTR活性を測定した。セレン濃度の上昇に伴ってTR活性は増大し、0.5 μM で上限に達した。5 μM ではセレンの毒性による細胞死が認められた。ウエスタンブロットングで確認したTR蛋白質の産生量はセレン濃度を上昇させても変化はなく、TR活性の上昇はTR蛋白質の量的増大によるものではないことが明らかになった。

3'非翻訳領域中の推定されているSECISエレメント(1856-1915 bp)より下流を600 bp残して3'側を削除したcDNA (ΔTR1)、100 bp残して3'側を削除したcDNA (ΔTR2)、SECISエレメントを完全に削除したcDNA (ΔTR3)、SECISエレメントを逆向きに挿入したcDNA (ΔTR4)を作製し、全長のcDNA (WT TR)と同様にエレクトロポレーション法でCOS-1細胞にトランスフェクションを行った。その結果、SECISエレメントを含むcDNAのトランスフェクタント(WT TR、 ΔTR1 、 ΔTR2)ではTR活性が認められたが、SECISエレメントを削除したcDNA (ΔTR3)とSECISエレメントを逆向きに挿入したcDNA (ΔTR4)のトランスフェクタントにはTR活性は認められなかった。さらにこれらのcDNAをトランスフェクションしたCOS-1細胞に ^{75}Se 亜セレン酸ナトリウムを添加して3日間培養し、各々の細胞抽出液のSDS-PAGEを行い、オートラジオグラフィーにてTR蛋白質への ^{75}Se の取り込みを検討した。その結果、TR活性の認められたWT TR、 ΔTR1 、 ΔTR2 にのみセレンシステイン残基の挿入を示す ^{75}Se の取り込みが認められた。以上の結果より、TR活性には3'非翻訳領域中に正しい向きで存在するSECISエレメントを介したセレンシステイン残基の挿入が必要であることが明らかになった。

[総括]

哺乳類のチオレドキシ還元酵素はセレンシステイン残基をC末端から2番目にもつセレン含有酵素である。A549細胞においてセレン源であるFBS濃度を低下させていくとTR活性は減少し、セレンの添加で活性は回復した。TR活性におけるセレンシステインの役割を明らかにするためにラットのTR cDNAをクローニングし、COS-1細胞で活性のあるTR蛋白質を発現させた。TR活性はセレンの添加に伴って上昇したが、TR蛋白質レベルに変化はなかった。またSECISエレメントを正しい向きで含んだTR cDNAのトランスフェクタントでのみTR活性と ^{75}Se の取り込みが認められた。活性を有するTR酵素の発現にはSECISエレメントを介したセレンシステイン残基の挿入が必須であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

哺乳類のチオレドキシ還元酵素(TR)はセレンシステイン(Sec)残基をC末端から2番目にもつセレン含有酵素である。TRは生体のレドックス制御に非常に重要な酵素であるが、活性を有する哺乳類のリコンビナントTRの発現成功例はこれまで報告がなかった。その理由はSec残基がTR蛋白中に挿入されなかったためと考えられる。Secは通常ストップコドンであるUGAでコードされているため、Secを蛋白質中に挿入するためには3'非翻訳領域中にあるSECISエレメント(セレンシステイン挿入配列)が必要と考えられている。申請者はラットTR遺伝子をクローニングし、SECISエレメントを含むcDNAをCOS-1細胞にトランスフェクションし、セレンを十分供給することで活性の有するリコンビナントTRの発現に成功した。さらにSECISエレメントを削除したcDNAや逆向きに入れ換え

た cDNA を用いた実験によって、3' 非翻訳領域中にある SECIS エlement を介した Sec 残基の挿入が TR 活性に必須であることを明らかにした。活性を有するリコンビナント TR 発現の成功と SECIS エlement の意義の解明は本酵素の解析に寄与するもので本研究は博士の学位論文に値するものと認められる。