



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43007">https://hdl.handle.net/11094/43007</a>
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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

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 1 4 9 6 6 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ン還元酵素の発現:セレノシスティ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]

チオレドキシン還元酵素 (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ィンである点で、大腸菌の TR (分子量が 35000 の二量体でセレノシスティンを含まない) とは構造的に異なる蛋白質である。セレノシスティ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、セレノシスティ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ィン挿入配列 (SECIS エレメント) が必要である。このセレノシスティン残基やセレンが TR の酵素活性に必要であることは 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 エレメント (1856-1915 bp) がセレノシスティンの挿入や 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 とチオレドキシン (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 ( $\lambda$ gt 10) とラット肝 cDNA ライブラリー ( $\lambda$ 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、ノーザンプロッティングのプローブとして用いた。

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  $\mu$ 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、ノーザンブロッティングで検出した TR の mRNA レベルは逆にセレンの添加で減少していた。ウエスタンブロッティ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。ウエスタンブロッティングで確認した 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 [<sup>75</sup>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 <sup>75</sup>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 にのみセレノシステイン残基の挿入を示す <sup>75</sup>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ノ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ン還元酵素はセレノシステイン残基を 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 活性におけるセレノ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 <sup>75</sup>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ノ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ン還元酵素 (TR) はセレノシステイン (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つ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 (セレノ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

たcDNAを用いた実験によって、3'非翻訳領域にあるSECISエレメントを介した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エレメント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。