

氏名(本籍)	あら いえ ひろ や 新家弘也(石川県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第4867号
学位授与年月日	平成21年1月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Identification and Characterization of a Selenoprotein EhSEP1, Thioredoxin Reductase, in <i>Emiliana huxleyi</i> (円石藻 <i>Emiliana huxleyi</i> におけるセレノプロテイン EhSEP1-チオレドキシニンレダクターゼ - の同定と特性解析)
主査	筑波大学教授 理学博士 白岩善博
副査	筑波大学教授 理学博士 漆原秀子
副査	筑波大学教授 理学博士 鎌田博
副査	筑波大学教授 理学博士 井上勲

論文の内容の要旨

円石藻 *Emiliana huxleyi* はハプト植物門に属する海洋性の単細胞藻類であり、炭酸カルシウムを主成分とする円盤状の特別な構造体(円石)で細胞表面が覆われているのが特徴的である。この円石藻の代表種である *E. huxleyi* は、毎年、衛星観測される程の大規模なブルーム(爆発的な増殖)を生じることでよく知られている。そのバイオマス、光合成および石灰化反応による炭素固定能力の高さから、地球規模の炭素循環に影響を与えともいわれているため、*E. huxleyi* の増殖制御要因の解明は地球科学的にもその意味は大きい。

セレン(Se)は、*E. huxleyi* の生育に必須であることが既に明らかになっており、重要な増殖制御因子である。ヒトを含む哺乳類や細菌はセレノプロテイン(Se含有タンパク質)を有しており、その酵素活性を維持する必要性からSeを要求すると考えられている。セレノプロテインの中で、Seはシステインのセレン態であるセレノシステインとして酵素の活性中心に存在する。セレノシステインは、特有のtRNAとセレン導入機構の働きにより、通常終止コドンとして認識されるUGAコドンにコードされて特異的にタンパク質分子中に組み込まれる。セレノプロテインは、細菌、古細菌、真核生物と幅広い生物相で知られており、その種類と機能は生物毎に非常に多様である。興味深いことに、陸上植物においては、Seの要求性およびセレノプロテインの存在は見出されていないが、多くの微細藻類ではSeの要求性やゲノム解析よりセレノプロテインが報告されている。しかし、光合成生物におけるSeの生理機能の詳細な解析は少なく、未知の部分が多く残されている。先行研究より *E. huxleyi* においてはセレノプロテインが最終的なSeの機能態である事、および少なくとも6種のセレノプロテイン(EhSEP1~EhSEP6)の存在が既に見出されていた。さらに、EhSEP2がプロテインジスルフィドイソメラーゼ様タンパク質であり、それがセレノプロテインであることは円石藻 *E. huxleyi* に特有の性質であることが明らかとなっていた。これらの事実は、円石藻がセレンを有効に利用して機能性の高いタンパク質を合成し、利用している可能性を示唆している。本研究は、*E. huxleyi* における更なるセレノプロテインの解析を行うことで、円石藻におけるセレン利用の形態を明らかにし、そ

してセレンが関与する生命現象を解明し、細胞の生命維持に Se がどのように関わっているかを解明することを目的としたものである。

本研究では、円石藻が有するセレノプロテインの中で、最も分子量が大きく、既に解析されている EhSEP2 の次に存在量が多い EhSEP1 を解析対象とした。まず ^{75}Se - 亜セレン酸を用いセレノプロテインをラベルし、陰イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーによる ^{75}Se - ラベルタンパク質の精製を行った。SDS-PAGE ゲルより EhSEP1 を抽出し、リシルエンドペプチダーゼを用いて EhSEP1 を消化し、内部アミノ酸配列を決定した。その結果、EhSEP1 が Thioredoxin Reductase 1 (TR1) と高い相向性を有することが示された。そこで、得られた内部アミノ酸配列 2 種を含む *E. huxleyi* の EST 配列を元にプライマーを設計し、EhSEP1 の cDNA クローニングを行った。EhSEP1 の予想されるアミノ酸配列は、TR1 の触媒部位である -CVNVGC- モチーフ配列を含んでおり、セレノシステインをコードする TGA コドンは C 末端にある活性中心に位置していた。これは一般的なセレノプロテイン TR と同様の活性中心である。また、3'-UTR にヒトで保存されているタイプ 2 構造と同じセレノシステイン導入配列が存在しており、原核生物や古細菌のそれとは異なっていた。この結果は、*E. huxleyi* が他の生物哺乳類と同様のセレノプロテイン合成機構を有していることを示唆するものである。

次に EhSEP1 の酵素活性を *E. huxleyi* の粗抽出液を用いて DTNB Assay および Insulin Assay で測定した。その結果、DTNB および、Human T-cell thioredoxin を還元する TR 様活性を示し、本活性が Se の有無に影響されたことから活性維持には Se が必須であることを明らかにした。ただし、Northern blot 解析の結果が EhSEP1 の mRNA 量が Se の有無に影響を受けなかったことから、タンパク質でのセレノシステインの存在そのものが重要であることを示した。TR は酸化還元酵素の一種であることから、細胞の生死に関わる酸化ストレスへの対応のために EhSEP1 が常時に発現し、細胞内の酸化還元電位の恒常性を維持している可能性を示唆した。

本研究では、プロティスト生物群に属する光合成生物 *Emiliana huxleyi* (ハプト植物門円石藻綱) において、新たなセレノプロテインを同定することに成功した。動物細胞では、セレノプロテイン TR を欠損させると致死となる。一方、陸上植物では、セレノプロテイン TR は存在せず NADPH 型およびフェレドキシン型 TR を有している。そのため *Emiliana huxleyi* は、還元力に特化したセレノプロテインである EhSEP1 (TR1) を利用することによって、他の光合成生物との生存競争において優位に立っている可能性が考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、多様な生物群が属するプロティスト生物群の光合成単細胞生物 *Emiliana huxleyi* (ハプト植物門円石藻綱) において、新たなセレノプロテインを同定し、その遺伝子の塩基配列、発現、酵素活性を測定し、それが Thioredoxin Reductase であることを証明することに成功したものである。その成果は特徴的な進化を経た生物が特徴ある微量元素利用戦略を獲得したことを示すもので、生物学上重要な知見であると認められる。

今後、種々の微細藻類、特にプロティスタ生物群におけるセレノプロテインの諸性質が解明され、動物などで既に明らかにされたデータを含めて比較解析を行なう事によって、生物進化における微量元素の利用戦略の基本原則を明らかにすることが期待され、本研究はその起点となる重要な価値あるものである。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。