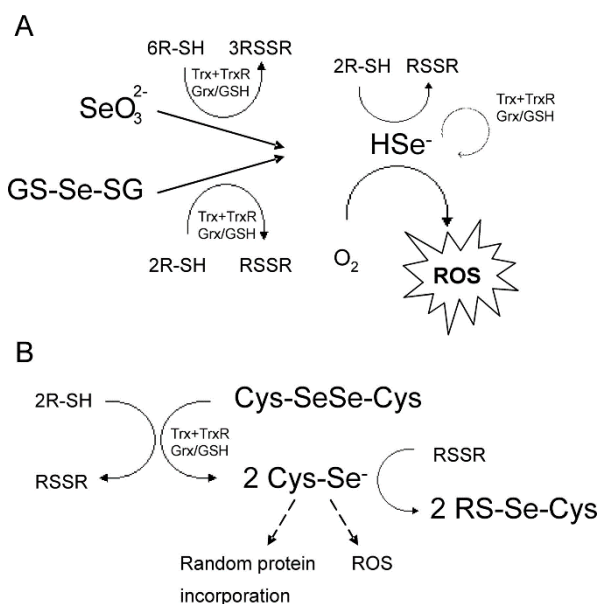
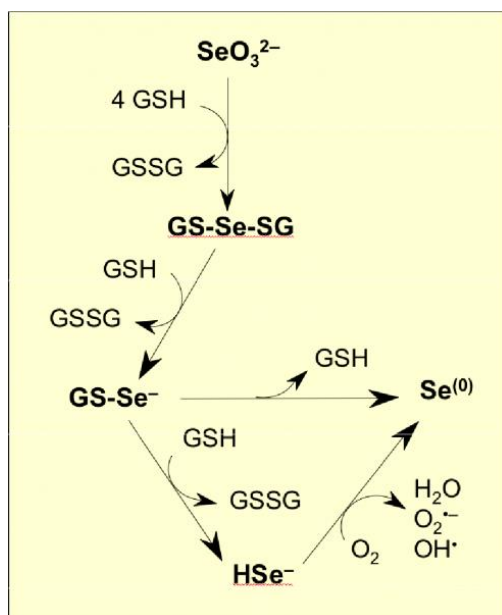


セレンの毒性の発現メカニズムは？

主にセレノジグルタチオン GS-Se-SG が生じることによる ROS の産生が問題となるようです。特に毒性が高い亜セレン酸の場合は、左下のような機構で GS-Se-SG や ROS が生じるそうです。

また、タンパク質中の Cys と S-Se の架橋が生じることもあると言われている他、セレンが過剰に存在しセレノシステイン(Sec)が余分に生成されると、翻訳の際に Cys の代わりに Sec が取り込まれてしまう場合もあるようです。これはセミナー中にも出てきましたがタンパク質の構造に影響を与えてしまい得る他、活性部位に影響したりもして、タンパク質の機能が損なわれることに繋がります。



<https://portail.polytechnique.edu/bioc/en/research/selenium-toxicity>

Fernandes *et al. Biochem. J.* **2010**, *429*, 85–93

セレノプロテインの機能は？

哺乳類のセレノプロテインでよく研究されているのは以下のもので、それ以外は酸化還元酵素と推定されるものの機能は不明だそうです。

- ・ GPX (GSH を介して過酸化水素や過酸化脂質の還元を触媒する抗酸化酵素)
- ・ TXNRD (NADPH 依存的に、酸化型のチオレドキシンはじめ、過酸化水素などの低分子やタンパク質の還元を行う酸化還元酵素)
- ・ SELENOP (血流に乗ってセレンを全身に運搬する)
- ・ SEPHS2 (セレンタンパク質の生合成に必要なセレノリン酸を合成する酵素)
- ・ DIO (ヨウ素-炭素結合を切断することで甲状腺ホルモンの活性化と不活化を制御)

Tobe, Mihara *Kagaku to Seibutsu* **2019**, 57, 366–372

セレノシステインはどうやって生合成される？セレン源は？

セレノシステインは、セリンから変換される形で生合成されます。

真核生物ではまず Sec の tRNA に Ser が結合し(セリル-tRNA^{Sec})、これが酵素的にリン酸化されてホスホセリル-tRNA^{Sec} になります。これが上で紹介した SEPHS2 により合成されたセレノリン酸によってセレノシステイル-tRNA^{Sec} となり、挿入されます。

(原核生物は機構が異なる。)

この研究は理研が強いです。

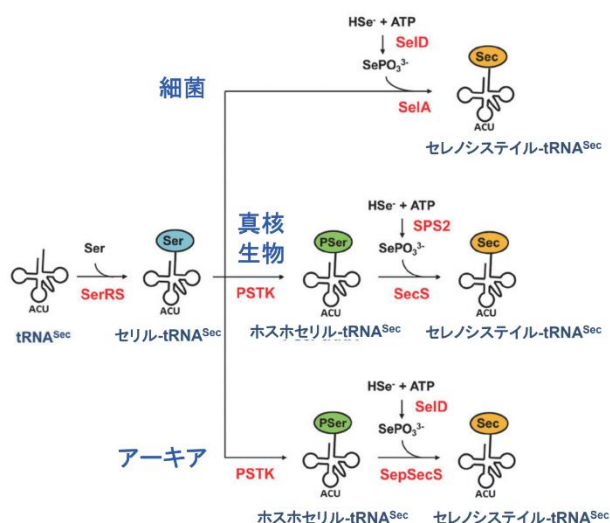


図 6. セレノシステイル-tRNA^{Sec} 生合成の各生物間の比較

セレンは、ヒトにおいては通常、魚介類などの海産物と動物の内臓あるいは穀類などの食料から供給されます。土壌や飼育飼料に含まれるセレン含量に左右されるので、セレンに乏しい土地では風土病としてセレン欠乏症が見られたりするそうです。

Mihara *Transactions of The Research Institute of Oceanochimistry* **2018**, 31 (2), 95–100

<https://www.riken.jp/press/2010/20100813/>

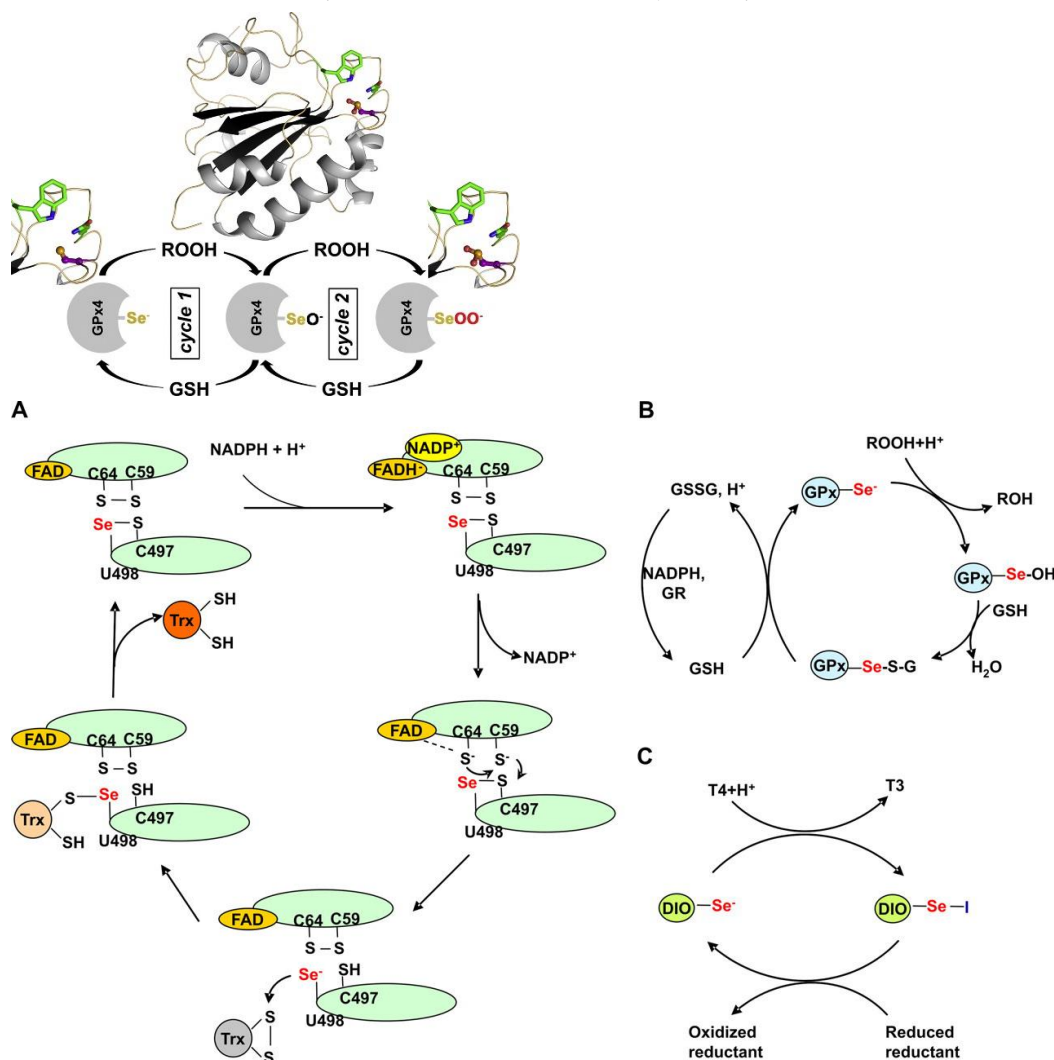
https://www.riken.jp/press/2013/20130405_1/

細胞内でのセレノシステインの状態について

セレノシステインのセレノールは酸化されやすいため、結晶構造を取るとセレン酸まで酸化された形で見られませんが、実際に還元的環境の細胞内で機能しているときには酸化された状態だけでなくセレノールの状態を含む酸化還元状態の変化を繰り返していると(仮説段階ではありますが)考えられています。(セミナー中にあいまいな表現をしてしまったので、改めてのご説明です。)

これはセミナー中に触れたグルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)に限った話ではなく、他のセレノプロテインの触媒サイクルでも同様に考えられています。

従って、Short Proposal で想定していたような、触媒にセレンを導入したときに細胞内で還元されたセレノールの状態を取る、というのは十分あり得ると予想しています。



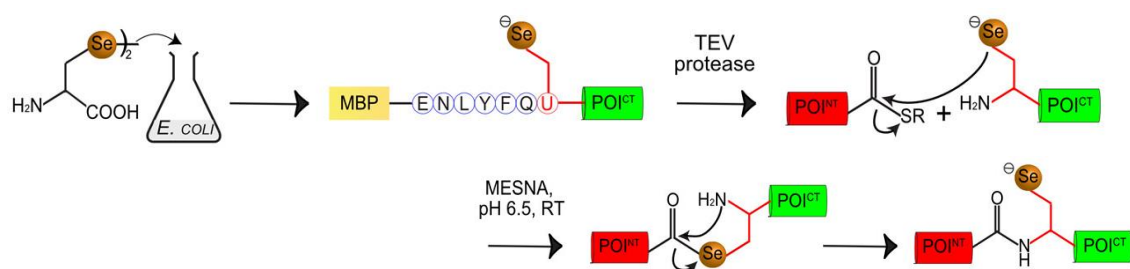
Scheerer et. al. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell. Biol. Lipids* **2018**, 1863, 1095–1107

Holmgren et. al. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 723–727

セレンを用いた NCL の適用範囲、ペプチド鎖への Sec の導入について

調べてみたところ、Sec での NCL を EPL (Expressed Protein Ligation, ペプチドフラグメントを異種発現により合成しライゲーションに用いる手法) で用いる例も報告されているようです。また、Sec NCL・DSL とともに 150 残基近くまではすでに実例がありました。(ちなみにこれも気になったので調べたところ、NCL によるユビキチン化も変性剤を含むバッファー中で行うようなので、そちらもやればできそうな気がします。)

さらに、Sec を含むフラグメントの方を異種発現させる試みもあるようです。上に書いたセレンの毒性の話とも関連しますが、S 欠乏環境下 Sec を培地に添加すると、本来 Cys が入るところに Sec が代わりに取り込まれるようです。これにより、(そのフラグメントは Cys と共存できないという欠点ではありますが) 化学的に扱いにくい Sec の合成を避けて Sec 含有ペプチドフラグメントを作ることができているようです。



<http://pcs-db.fr/spip.php?article3>

↑ 化学合成されたタンパク質のデータベースです

(Agouridas, Melnyk *et. al. Biorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 4938–4945)

Brik *et. al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *121*, 8234–8238

Rozovsky *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 3430–3437

膜タンパク質の NCL は、そもそもどうやってるんでしょうか。
detergent などを入れた状態で実施すればいいということでしょうか？

超高希釈 DSL 以前の NCL でも、膜タンパク質など疎水性のものを合成するとき界面活性剤で可溶化しての合成は実際試みられていました。その他、ペプチドに可溶化タグを付けておいてライゲーション後に外すなど、いろいろな方法が開発されていたようです。それでも、界面活性剤はカラム精製に悪影響があったり、可溶化タグもどこに導入するのが適切かを検討するのが難しかったりとそれぞれに問題があったので、今回の高希釈条件下でライゲーションを行える DSL が有効だと主張されていました。

Tietze *et. al. Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 162

Payne *et. al. J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 1090–1100

ジセレニドフラグメントを原料に用いると、そちらに低水溶性のフラグメントが来る場合、より溶けにくくなってなかなか使うのが難しそうな気もしますが、低濃度だとそこらへんはかなりクリア出来るんでしょうか？

ジセレニドになると溶解性は確かに下がると思います。まだこの報告内の 2 例以外に実用例がないので適用範囲がどの程度なのかは分かりませんが、今回セミナー中に紹介したものとジセレニドフラグメント側に長鎖アルキル修飾が入っているので、ある程度はカバーできるものと思います。濃度もまだ下げる余地がありそうなので、より低水溶性でも使える可能性はありそうな気がしました。

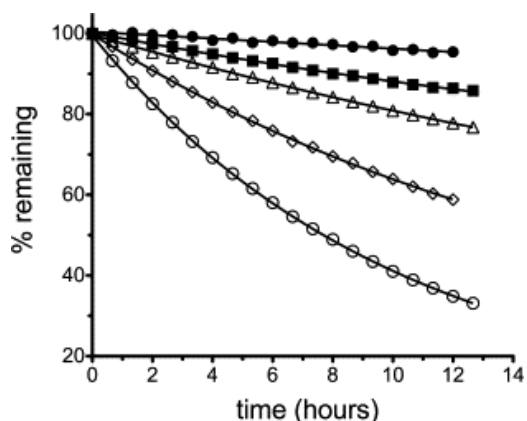
50 nM での ligation はどうやって収率を出している？

反応液をそのまま Analytical HPLC にかけても検出できないので、quench 後に濃縮しているそうです。

DPDS を抽出した 40 mL のサンプルを C18 シリカに吸着させ、塩などを洗ってから溶出していました。それでもシグナルが弱く、Blank を差し引いて解析したそうです。

セレノエステルの安定性はどうか？

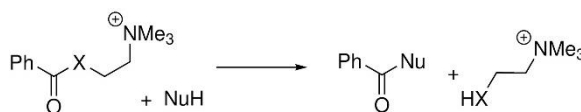
ペプチドアルキルセレノエステルなのですが、アルキルチオエステルと安定性を比較した論文があります。チオエステルよりはやはり加水分解しやすいですが、酸性に寄せればかなり耐えるようです。



Entry	Peptide	pH	T _{1/2}
●	Thioester	7.5	~ 20,000 h
■	Thioester	8.0	19 h
△	Selenoester	6.5	22 h
□	Selenoester	7.0	12 h
○	Selenoester	7.5	7 h

ただここで注目すべきは、加水分解に対する不安定性の増大以上にチオールとの反応性が向上していることです。

16 族カルコゲンエステルの反応性を比較したところ、オキシエステルと比べてチオエステルはよりソフトな求核剤に対する反応性ほど高くなることが知られ、同様の傾向がセレノエステルでも見られています (チオエステル→セレノエステルで、加水分解は pH によって 3-10 倍なのに対し、アミノリシスは 75 倍にもなる)。芳香族チオエステルは分解しやすいから系中で発生させる方がいいのに、セレノエステルは preform で使っていて芳香族チオエステルでもできなかったことを実現できているのは、ただ脱離能を高めただけでなく S から Se への変換で望む反応を選択的に加速させられたからだと思います。



Hydrolysis (NuH = H₂O)

pH 9.0, I = 0.666 M, 25 °C, [chalcogenoester] = 1.81 × 10⁻⁴ M

	k _{obs} in M ⁻¹ .s ⁻¹
X = O (benzoylcholine)	0.547 × 10 ⁻⁵
X = S (benzoylthiocholine)	0.817 × 10 ⁻⁵
X = Se (benzoylselenocholine)	2.98 × 10 ⁻⁵

(x 1.5)
(x 3.6)

Aminolysis (NuH = nBuNH₂)

pH 8.0, I = 0.666 M, 25 °C, [chalcogenoester] = 1.81 × 10⁻⁴ M
[nBuNH₂] = 0.108 M

	k _{obs} in M ⁻¹ .s ⁻¹
X = O (benzoylcholine)	no reaction
X = S (benzoylthiocholine)	1.88 × 10 ⁻⁵
X = Se (benzoylselenocholine)	140 × 10 ⁻⁵

(x 75)

Durek *et. al. Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3437–3478

Mautner *et. al. J.Org. Chem.* **1966**, *31*, 308–312

Monbaliu, Melnyk *et. al. Chem. Rev.* **2019**, *119*, 7328–7443