鉄硫黄クラスターおよびセレンタンパク質の生合成を司る 硫黄・セレン脱離酵素群の発見と分子機能解析

三原久明

硫黄は鉄硫黄クラスター,チアミン,モリブドプテリン,ビオチン,リポ酸,tRNAの チオヌクレオシドなど様々な生体分子に取り込まれ,これらの機能に大きく寄与してい る.一方,セレンは哺乳類を含む多くの動物の必須微量元素であり,主にタンパク質のセ レノシステイン残基として種々の生理機能を発揮する.システインデスルフラーゼとセレ ノシステインリアーゼは、ペルスルフィドあるいはセレノペルスルフィドという形で硫黄 およびセレンを活性化し、硫黄・セレンを構成成分とする分子の生合成系の初発酵素とし て機能する点で共通している.本稿では、システインデスルフラーゼとセレノシステイン リアーゼの機能と構造および、これら硫黄とセレンを供給する鍵酵素が関与する種々の生 合成経路について概説する.

1. はじめに

硫黄とセレンはともに第16族元素であり、イオン半径 や電気陰性度といった物理化学的性質には類似が見られ る.硫黄は鉄硫黄クラスター、チアミン、モリブドプテリ ン、ビオチン、リポ酸、tRNAのチオヌクレオシドなど 様々な生体分子に取り込まれ、これらの機能に大きく寄与 している.一方、セレンは哺乳類を含む多くの動物の必須 微量元素であり、主にタンパク質のセレノシステイン残基 として種々の生理機能を発揮する¹⁾.1980年代初頭に、セ レノシステインに特異的に作用するユニークなピリドキ サール酵素であるセレノシステインリアーゼが江崎らに よって発見された²⁾.本酵素は、L-セレノシステインをL-アラニンとセレンに分解する反応を触媒する.そのおよそ

立命館大学生命科学部生物工学科(〒525-8577 滋賀県 草津市野路東 1-1-1)

Hisaaki Mihara (Department of Biotechnology, Institute of Science and Engineering, College of Life Sciences, Ritsumeikan University, 1–1–1 Nojihigashi, Kusatsu, Shiga 525–8577, Japan)

本総説は 2010 年度奨励賞を受賞した.

10年後,著者らがセレノシステインリアーゼの cDNA ク ローニングに取り組んでいたちょうどその時期に,これと 同じタイプの化学反応を触媒する酵素,システインデスル フラーゼが窒素固定細菌に見出された³³.その後の研究に より,システインデスルフラーゼは鉄硫黄クラスター生合 成、チアミン生合成,tRNA の含硫修飾ヌクレオシド生合 成などにおいて,硫黄を供給する硫黄脱離酵素として機能 することが明らかとなってきた.一方,セレノシステイン リアーゼは,セレンタンパク質生合成において,セレンタ ンパク質の分解によって生じるセレノシステインからセレ ンをリサイクルする上で重要なセレン脱離酵素であること が分かってきた.本稿では,システインデスルフラーゼと セレノシステインリアーゼの機能と構造および,これら硫 黄とセレンを供給する鍵酵素が関与する種々の生合成経路 について概説する.

2. システインデスルフラーゼ

1989 年米国の Dean らのグループは, 窒素固定細菌 Azotobacter vinelandii において nifS 遺伝子が欠損するとニト ロゲナーゼの活性が著しく低下することを見出した⁴.次 いで, nifS 遺伝子産物 (NifS) が, ピリドキサール 5′-リ ン酸 (PLP)を補酵素として L-システインを分解し L-アラ ニンと硫黄を生成する反応を触媒するシステインデスルフ

Discovery and molecular function analysis of sulfur- and selenium-eliminating enzymes crucial for biosynthesis of iron-sulfur clusters and selenoproteins

ラーゼであることが明らかにされ、この反応によって生じ る硫黄がニトロゲナーゼの鉄硫黄クラスターに取り込まれ るものと考えられた³. In vitro の実験で, NifS とシステイ ンの存在下で、ニトロゲナーゼの鉄硫黄クラスターが速や かに形成されることが示され、本酵素反応が鉄硫黄クラス ターに硫黄を供給する反応であることが支持された⁵⁾. そ の後の研究で、A. vinelandii は、nif 遺伝子クラスターとは 別のゲノム領域に、一つの NifS パラログ遺伝子を持つこ とが明らかになった⁶. 窒素固定細菌以外の生物にも, 広 く nifS 相同遺伝子が存在することが判明し、これらの遺 伝子産物は、ニトロゲナーゼ以外の鉄硫黄タンパク質の成 熟に普遍的に関与すると考えられるに至った. nifS の名前 の由来は窒素固定(nitrogen fixation)であるが, A. vinelandii のnifS パラログや、窒素固定細菌以外のホモログは、ニ トロゲナーゼ以外の鉄硫黄クラスター形成に関与すると考 えられたことから、これらについては鉄硫黄クラスター (iron-sulfur cluster) にちなんで iscS と呼ぶことが提唱され た⁶⁾.

筆者らは、窒素固定細菌以外にも nifS ホモログが存在 し、しかも興味深いことに、しばしば一つの生物が複数の ホモログを持つことに着目した⁷. 例えば, Escherichia *coli* K-12は*iscS*, *csdA*, *sufS*(または*csdB*)と呼ばれる三 つのnifS ホモログを持つ. IscS は NifS と約 40% の相同 性を示すが、CsdA と CsdB はいずれも NifS と 24% 程度 の相同性しか示さない.システインデスルフラーゼは、 Grishin らの分類による PLP 依存酵素の fold-type I, アミノ トランスフェラーゼ class V に属するが⁸⁾, 筆者らはこれら 酵素がアミノ酸配列に基づいてさらに二つの大きなグルー プに大別できることを示した".両グループの酵素は四領 域で大きく異なっており、その内の一つはC末端領域の 保存されたシステイン残基を含むモチーフ部位である.グ ループIのコンセンサス配列が SSGSACTS であるのに対 して、グループ II のコンセンサス配列は RXGHHCA であ る⁹. E. coli の酵素の場合では, IscS はグループIに, CsdAとSufS (CsdB) はグループII に属する. このグルー プ分類と酵素の機能との相関は未だ明確ではないが、その 後の研究から真核生物では主としてミトコンドリアに移行 するタイプがグループIに属し、葉緑体に局在する酵素が グループⅡ型であることが明らかとなっている^{10,11}.

E. coli CsdA は、窒素固定細菌以外の生物由来の NifS ホ モログとしては最初の研究例として、著者らが諸性質を明 らかにした酵素であるⁿ.本酵素は、システイン以外にも 作用し、システインスルフィン酸やセレノシステインのβ 位の置換基を脱離させる触媒活性を示す.csdA 遺伝子に 隣接して csdE-csdL という二つの ORF が存在する.いず れも詳細な機能は未知であるが、CsdE は後述する SufE の ホモログであり、CsdL は MoeE/ThiF ファミリーに属し、 硫黄の転移に関する可能性が示唆されている^{12,13}.

一方, CsdB のシステインデスルフラーゼ活性は非常に 低く, セレノシステインを基質とした場合の活性の 290 分 の1程度であった¹⁴⁾. この点で CsdB は酵素学的に哺乳類 のセレノシステインリアーゼと類似していると考えられ た. しかし後述するように, 実際はシステインが生理的な 基質であることが示されている. 筆者らの本酵素に関する 報告と同時期に, ドイツの Hantke らは, シデロフォアの 一種である Ferrioxiamine B を鉄源として利用できない変 異株を取得し, その変異が CsdB をコードする遺伝子およ びその周辺遺伝子に存在することを突き止めた¹⁵⁾. 彼らは *csdB を sufS* と名付け, これを含む *sufABCDSE* オペロン が鉄依存リプレッサー Fur の制御下にあることを示した.

iscS を含む遺伝子群はこれまで最も詳細に研究されており,*iscRSUA-hscBA-fdx-iscX* から成る[®].本遺伝子群がコードするタンパク質のうち,IscR,IscU,IscA,Fdxの四つは鉄硫黄タンパク質であり,HscB,HscA は鉄硫黄クラスター形成のためのシャペロン-コシャペロンシステムであると考えられている.IscS を含めたこれらタンパク質群(ISC マシナリー)については次項で詳しく述べる.

3. 鉄硫黄クラスター生合成マシナリー:NIF, ISC, SUF

鉄硫黄タンパク質が含有する鉄硫黄クラスターは,構造 的にシンプルでありながら実に多様かつ重要な機能をもつ 補因子である^{16,17}. この単純な構造ゆえ,長年,無機硫黄 と無機鉄から自発的に鉄硫黄クラスターが形成されると考 えられてきた.実際,還元剤存在下,アポタンパク質を硫 化ナトリウム,塩化鉄と混ぜることで鉄硫黄クラスターが 再構成されることが知られていたが,一般に細胞内よりは るかに高濃度の硫化物イオンと鉄イオンが必要である.し かしその後,システインデスルフラーゼの発見がきっかけ となり鉄硫黄クラスターは複数の酵素やタンパク質が関与 する複雑な過程を経て生合成されることが明らかとなっ た.

(1) NIF マシナリー

A. vinelandii の nifS 遺伝子に隣接する nifU を欠損した 株では, nifS 欠損株と同様にニトロゲナーゼの活性低下が 見られた⁴⁾. その後の研究から, NifU 自体が鉄硫黄クラス ターを持つことが明らかとなった¹⁸⁾. NifU の N 末端ドメ インには三つの保存されたシステイン残基が存在し,不安 定で壊れやすい [2Fe-2S] クラスターが結合する.中央ド メインには保存されているシステイン残基四つがあり,安 定な [2Fe-2S] クラスターを配位している. これら全ての システイン残基が NifU の生理的機能に必須であることが 示された. さらに, NifU は NifS と弱く相互作用してヘテ ロテトラマーを形成することなどから、NifUは鉄硫黄ク ラスター形成の足場として機能し、ここからアポタンパク 質に鉄硫黄クラスター前駆体が転移されるモデルが構築さ れた^{19~21)}.このNifSとNifUを中心とする鉄硫黄クラス ター生合成装置はNIF(<u>n</u>itrogen <u>fi</u>xation)マシナリーと呼 ばれている(図1)²²⁾.

(2) ISC マシナリー

上述したように, A. vinelandii には NifS とは別にもう一 つ IscS というパラログが存在するが, NifU の N 末端ドメ インと相同性を示す IscU も存在し, その遺伝子 iscU は iscS と隣接した位置にある (図 2). NIF マシナリーはニ トロゲナーゼ特異的なシステムであり, IscS, IscU を含む ISC (<u>iron-sulfur cluster</u>) マシナリーが他の種々の鉄硫黄タ ンパク質の鉄硫黄クラスター形成に関与すると考えられて



図1 NIFマシナリー

(A) 窒素固定細菌 A. vinelandii の nif マシナリーオペロン.(B) NIF マシナリーによるニトロゲ ナーゼの鉄硫黄クラスターの生合成のモデル.M-クラスターと P-クラスターはニトロゲナーゼの MoFe タンパク質サブユニットに結合し,[4Fe-4S]クラスターは Fe タンパク質サブユニットに結 合する.点線の矢印は前駆体鉄硫黄クラスターの転移を示す.





図2 ISC マシナリー

(A) A. vinelandii と E. coli の isc マシナリーオペロン.(B) ISC マシナリーによる鉄硫黄 タンパク質の鉄硫黄クラスター生合成のモデル. 点線の矢印は前駆体鉄硫黄クラスター の転移を示す.鉄硫黄クラスター生合成における機能の詳細が未だよく分かっていない タンパク質には「?」を付している. いる (図 2)²²⁾. 実際に, A. vinelandii では nifS あるいは nifU の欠損株は得られるが, iscS や iscU を欠損させると 致死となる⁶⁾. E. coli では主に, iscRSUA-hscBA-fdx-iscX の isc 遺伝子群が鉄硫黄クラスターの形成に関与しており、 これらの遺伝子を破壊した株では鉄硫黄タンパク質の活性 低下が見られるとともに生育が著しく阻害される²³⁾.ま た、本遺伝子群を E. coli 体内で共発現させると、リコン ビナント発現させたフェレドキシンが高い効率で鉄硫黄ク ラスターを持ったホロ型として生成されることも示され た²⁴⁾. IscUは、NifUのN末端ドメイン同様、三つの保存 されたシステイン残基を持ち、鉄硫黄クラスター形成の足 場になると考えられている. IscUは IscS とのタンパク質 間相互作用を介して、IscS から硫黄を直接受け取ることが 示されている^{25~28)}. IscA は鉄硫黄クラスターを結合し、そ の鉄硫黄クラスターを様々なアポタンパク質に渡すことが できる^{29~31)}. このことから, IscA も鉄硫黄クラスター形成 の足場、あるいは鉄シャペロンではないかと考えられてい る^{32,33)}. IscU から IscA の方向へと不可逆的に鉄硫黄クラス ターの転移が起こることから, IscA は IscU の下流で鉄硫 黄クラスターのキャリアーとして機能するという可能性も ある³⁴⁾. HscA は Hsp70/DnaK ファミリーに属するタンパ ク質であり、J-タイプコシャペロンである HscB によって そのATPase 活性や基質の結合能が制御される. IscU は HscAB の基質となり、その結合により HscAB の ATP 活性 を著しく上昇させる^{35~40)}.また,HscAB シャペロンは, IscUに結合した [2Fe-2S] クラスターの構造を歪ませて, IscUから Fdx への鉄硫黄クラスターの移動を ATP 依存的 に促進することも示されている⁴¹⁾. したがって, HscAB は

IscUに形成された鉄硫黄クラスター前駆体をターゲット となるアポタンパク質に転移するのを助けていると考えら れている.Fdx は安定な [2Fe-2S] クラスターを持つフェ レドキシンであり,鉄または硫黄の還元に関与すると考え られている⁴²⁾.fdx 遺伝子を破壊した E. coli 株では生育遅 延とともに鉄硫黄タンパク質の活性低下が見られる.IscR は,酸化ストレスや鉄の需要に応答する転写制御因子であ り,鉄硫黄クラスター生合成系やその他の鉄硫黄タンパク 質などを含む 40 以上もの遺伝子の発現を調節する^{43,44)}. IscR 自身も [2Fe-2S] クラスターを持ち,ホロ型の状態で は isc オペロンを抑制するが,アポ型の場合には後述の suf オペロンを活性化する.したがって,細胞内で鉄硫黄 クラスターの形成が不十分な状態に陥った時には IscR は アポ型となり,isc オペロンと suf オペロンの両方が誘導 されて鉄硫黄クラスター生合成能力が高められる.

(3) SUF マシナリー

SUF (sulfur mobilization) マシナリーは,鉄欠乏や酸化 ストレス,重金属ストレスなどの状況下での鉄硫黄クラス ター生合成系として機能する^{43~49}. E. coli の SUF マシナ リーは, sufABCDSE オペロンによってコードされる六つ のタンパク質から成る (図 3A).一方, Bacillus subtilis や Thermotoga maritima など他の多くの細菌の SUF マシナ リーには SufE が存在せず,SufU という IscU と類似した タンパク質が存在するなど違いが見られる.SufB と SufD とには部分的なアミノ酸配列の相同性があり,両者と SufC が相互作用することによって,主に1:2:1(B:C: D)の比率で SufBC²D 複合体を形成する^{50,51)}.SufC は ATP-



(A) *E. coli* と *B. subtilis* の *suf* マシナリーオペロン.(B) *E. coli* の SUF マシナリー による鉄硫黄タンパク質の鉄硫黄クラスター生合成のモデル. 点線の矢印は前駆体 鉄硫黄クラスターの転移を示す.

ase 活性を有し、その活性は SufB および SufD が結合する ことにより高められる^{52,53)}. SufBC₂D 複合体の SufB サブユ ニットには [4Fe-4S] クラスターが形成され, この鉄硫黄 クラスターがターゲットとなるアポタンパク質に移される ことが示された^{50,54)}.また,SufBC₂D 複合体あたり一つの フラビンが含まれており、これにより Fe(III)を還元でき ることも分かっている⁵¹⁾. SufE は SufS と複合体を形成し, そのシステインデスルフラーゼ活性を高めるとともに、 SufSから硫黄を受け取り、これを SufBC2D 複合体に渡す 機能を持つ (図 3B)⁵⁰. SufSE 複合体のシステインデスル フラーゼ活性は SufB との相互作用により一段と上昇す る⁵⁵. SufA は IscA と相同性を示し、自身が含有する鉄硫 黄クラスターをフェレドキシンやアコニターゼなどのター ゲットアポタンパク質に渡すことができることから、鉄硫 黄クラスター形成の足場タンパク質あるいは鉄硫黄クラス ターのシャトルタンパク質と考えられている^{56,57)}. SufA は SufBC₂D 複合体と相互作用することができ、特にアポ型 SufA はホロ型 SufBC₂D とより強く結合することができ、 ホロ型 SufBC₂D からアポ型 SufA へと鉄硫黄クラスターが 移されることが示された54).

補酵素・補因子および tRNA 修飾塩基の 生合成における硫黄の挿入

E. coli の iscS 破壊株では、著しい生育遅延がみられる^{58,59}. これは、主として様々な鉄硫黄タンパク質の活性が低下するためであると考えられる.例えば、iscS 破壊株の生育は分岐鎖アミノ酸やニコチン酸の添加で部分的に相補される.分岐鎖アミノ酸の生合成経路には鉄硫黄タンパク質であるジヒドロキシ酸デヒドラターゼが関与し、 NAD の生合成酵素であるキノリン酸シンターゼAも鉄硫黄クラスターを持つことから、上記の栄養要求性を示すことが理解される.しかし、iscS の細胞内での機能は単に鉄硫黄クラスター形成のみにとどまらず、はるかに多様であることが分かってきた⁶⁰⁾.以下に IscS が関与するチアミンの生合成、tRNA の硫黄修飾、モリブドプテリンの生合成について概説する.

(1) チアミン生合成

iscS 破壊株はチアミン要求性を示すことが見出され,チ アミンの生合成にも IscS が関与することが明らかとなっ た⁵⁸⁾. *E. coli* におけるチアミンニリン酸の生合成では,二 つのヘテロ環化合物である 4-アミノ-5-ヒドロキシメチル-2-メチルピリミジンニリン酸と 4-メチル-5-(β-ヒドロキシ エチル)チアゾールリン酸が前駆体として独立した経路で 生成される (図 4A)⁶¹⁾. 後者のチアゾール中間体の合成反 応は,チロシン, 1-デオキシ-D-キシルロース-5-リン酸, およびシステインを必要とする,少なくとも六つのタンパ

ク質(ThiFSGH, Thil, IscS)が関与する複雑なステップ であることが現在分かっている^{62,63)}. チアミンのチアゾー ルの硫黄は ThiS の C 末端チオカルボキシル基に由来する が, in vitro での解析により, IscS は ThiF と共に ThiS の C末端のチオカルボキシル基の生成に関与することが示さ れた^{58,64,65)}.本反応においては、まず ThiF が ThiS の C 末 端チオカルボキシル基をアデニリル化して活性化し、続い て IscS によりシステインの硫黄が供給されて ThiS のチオ カルボキシル基が生じる^{58,65,66)}. すなわち, IscS はシステ インの硫黄をチアミンに供給する役割をも担っている. ThiH と ThiG は複合体を形成し、チアゾール合成の最終ス テップに関与する⁶⁷⁾.面白いことに,ThiH は,[4Fe-4S] クラスターを有するラジカル SAM スーパーファミリーに 属すチロシンリアーゼであり^{62,68)}, IscS はチアミン生合成 において、[4Fe-4S]型 ThiH の成熟・活性にも関与してい る可能性が考えられる.

(2) tRNA の硫黄修飾

tRNAには様々な修飾塩基が存在し、それらは翻訳におけるtRNAの機能を微調整していることなどが知られている⁶⁹⁾.真正細菌やアーキアのtRNAの8番目の塩基に見られる4-チオウリジンは、菌体の近紫外線に対する感受センサーとして機能する⁷⁰⁾. IscSはThiIと共に、ウリジンから4-チオウリジンへの変換に関与することが示された(図4B)⁶⁴⁾. ThiIは上記のチアミンの生合成にも関与するタンパク質であり、四つのドメイン(N末端側フェレドキシン様ドメイン,THUMPドメイン、PP-ループドメイン、ロダネース様ドメイン)から成る^{71~73)}. IscSによってシスティンから脱離された硫黄は、ThiIのロダネース様ドメイン 上のシステイン残基に渡され、ThiIペルスルフィド(ThiI-S-SH)が生じる.最終的に、ThiI-S-SHの硫黄が、ATP依存的なウリジンのアデニレーションを伴った4-チオウリジンの生成に利用される^{72.74)}.

多くの生物において、グルタミン酸、グルタミン、リジ ンのtRNAには、アンチコドンの一番目(wobble position) の塩基として5-メチルアミノメチル-2-チオウリジンが存 在し、遺伝暗号の翻訳過程で重要な役割を果たす⁷⁵⁾.本修 飾塩基生成において、5-メチルアミノメチル化と2-チオ化 の反応は独立している。著者らはIscSがウリジンの2-チ オ化において、硫黄を供給する機能をもつことを明らかに した⁷⁶⁾.その後、2-チオウリジンの生合成には、IscSの他 に MnmA および TusABCDE が関与することが示された (図 4B)^{77~81)}.本2-チオウリジン生成の初発反応において、 IscS によってシステインの硫黄が脱離され、TusAの Cys19 に移されてペルスルフィドが生じる。続いて、TusA 上の硫黄は、TusE 依存的な反応により、TusBCD 複合体 の TusD サブユニットの Cys78 へと転移される。次に、



図4 E. coli IscS が関与する含硫分子生合成経路

(A) チアミン二リン酸の生合成経路. (B) tRNA 塩基の硫黄修飾反応. (C) モリブデン補因子の前駆体であるモリブドプテリン の生合成経路.

TusD から TusE の Cys108 に硫黄は移され,最後に MnmA へと至る. MnmA はウラシルの2位の酸素をアデニル化 して活性化し,硫黄の挿入反応を触媒する⁸⁰.

(3) モリブドプテリン生合成

モリブデン補因子(Moco)は硝酸還元酵素, 亜硫酸オ キシダーゼ、キサンチンデヒドロゲナーゼなどのモリブデ ン酵素の活性に必須の含硫補因子である^{82,83)}. E. coli では, 5'-GTPから生成する中間体である precursor Zを経て, Mocoの前駆体であるモリブドプテリン (MPT) が合成さ れる⁸⁴⁾. 好気的実験条件下では、precursor Z は空気やヨウ 素により 6-アルキルプテリン (compound Z) に酸化され る. precursor Z への硫黄挿入は MPT シンターゼ (MoaD サブユニット二つと MoaE サブユニット二つから成るヘテ ロテトラマー)により触媒され、MoaDのC末端チオカル ボキシル基の硫黄が MPT に取り込まれる⁸⁵⁾. MoaD の C 末端チオカルボキシル化反応では、まず MoaD のカルボ キシル基が MoeB によりアデニリル化されることが示され ているが、これに引き続いて起こる硫黄導入反応について は長い間その詳細が不明であった^{86,87)}. 著者らは E. coli の 3種のシステインデスルフラーゼ (CsdA, SufS, IscS) の MPT 生成への関与について調べた⁸⁸⁾. ³⁵S 標識した L-シス テインを用いて in vitro トレーサー実験で調べたところ, 3種のシステインデスルフラーゼのいずれも MoaD への硫 黄転移反応を触媒できることが示された.次に MoaD と MoeB がシステインデスルフラーゼの活性におよぼす影響 を調べたところ, IscS の活性が MoaD, MoeB の添加に よって、特異的に上昇することを見出した.一方、このよ うな活性化は CsdA と SufS においては見られなかった. 更に、表面プラズモン共鳴分析により、IscSと MoaD、 IscS と MoeB の特異的な相互作用が検出された.以上の結 果により, MPT 生合成の硫黄挿入反応に生理的に関わる システインデスルフラーゼは IscS であることが示唆され た. 次に, E. coli の3種のシステインデスルフラーゼそれ ぞれを欠損させ, MoaD のチオカルボキシル化への影響を 分析した. iscS 欠損株および csdA/sufS 二重変異株で MoaD を発現させ、チオカルボキシル化される MoaD を定 量したところ,野生株と csdA/sufS 二重変異株の間では顕 著な差は見られなかった.一方, iscS 欠損株においてチオ カルボキシル化される MoaD の量は、野生株の約1% し かなかった.この結果より,MPTの生合成に必要な MoaD のチオカルボキシル化を触媒するシステインデスル

フラーゼは IscS であることが分かった. 各システインデ スルフラーゼ欠損株の酸抽出物を高速液体クロマトグラ フィーで分析したところ, moaD 欠損株と同様に, iscS 欠 損株に compound Z の蓄積が認められた.一方, csdA 欠損 株および sufS 欠損株では,このような蓄積は見られな かった.この蓄積は iscS 遺伝子の導入によって見られな くなった.以上の結果より, E. coli の MPT 生合成の硫黄 供給経路では, IscS が MoaD, MoeB と特異的に相互作用 し,主要な硫黄供給体として機能することが明らかとなっ た (図 4C).

5. セレノシステインリアーゼ

システインデスルフラーゼ NifS が発見される 10 年ほど 前に江崎らは、セレン含有アミノ酸の代謝に関する研究の 過程で、セレノシステインを分解してアラニンとセレンを 生成する反応を触媒する酵素であるセレノシステインリ アーゼをラット肝臓に見出した89.本酵素はセレン化合物 に特異的に作用し、対応する硫黄化合物には作用しない酵 素の初めての例である、セレノシステインリアーゼは各種 の哺乳動物の組織中に広く分布しており、ブタ肝臓から単 離された酵素の性質が詳しく調べられた²⁾. 筆者らはブタ 肝臓から精製したセレノシステインリアーゼの部分アミノ 酸配列を決定した.得られたアミノ酸配列を用いて相同性 検索を行った結果,機能不明なマウス cDNA 断片との間 に高い類似性を見いだした.この cDNA 断片をプローブ としてマウス肝臓 cDNA ライブラリーのスクリーニング を行い、本酵素 cDNA の全 ORF の塩基配列を決定した⁹⁰. 本酵素は1296 bpのタンパク質翻訳領域によってコードさ れるアミノ酸 432 残基(推定分子量 47,201)から成り、 類似の反応を触媒するシステインデスルフラーゼと一次構 造上有意な相同性を示すことが明らかとなった.本酵素 は、L-セレノシステインに高い特異性を示し、セレンとア ラニンを生成する反応を触媒した.マウスにおける本酵素 遺伝子の発現は、脳、心臓、肺、胃、肝臓、腎臓、脾臓、 精巣のいずれの臓器においても認められた.

本酵素がセレンタンパク質の生合成に関与するか調べる ため、セレノリン酸合成酵素の反応に対する本酵素とセレ ノシステインの添加効果を調べた.その結果、還元した亜 セレン酸を用いる代わりに、セレノシステインリアーゼと L-セレノシステインを用いてもセレノリン酸合成活性が認 められた.このことは、システインデスルフラーゼにおけ る硫黄転移と類似したメカニズムにより、セレノシステイ ンリアーゼからセレノリン酸合成酵素へとセレンが転移す る可能性を示唆する.また、⁷⁵Se 標識したセレノプロテイ ンPをセレン源として用いて HeLa 細胞中のセレンタンパ ク質の⁷⁵Se 標識効率を調べたところ、コントロール siRNA をトランスフェクションした細胞と比較して、セレノシス テインリアーゼ siRNA を導入した細胞ではセレンタンパ ク質の⁷⁵Se 標識効率が減少した⁹¹⁾. セレノシステインリ アーゼの発現量は, セレンタンパク質からセレノシステイ ンが回収される腎臓と肝臓の細胞において高いことが明ら かとなり,本酵素がセレンタンパク質に由来するセレンを リサイクルしていることが示唆された⁹¹⁾.

6. セレンタンパク質の生合成

セレンはセレノシステイン残基の形でタンパク質のポリ ペプチド鎖中に存在し、多くの場合、活性中心残基として 重要な役割を果たす.セレノシステイン残基を含むタンパ ク質はセレンタンパク質と呼ばれ、例としてグルタチオン ペルオキシダーゼ、チオレドキシンレダクターゼ、テトラ ヨードチロニン-5′-脱ヨード化酵素などが知られる.ゲノ ム配列に基づいた解析によると、ヒトには25種類のセレ ンタンパク質遺伝子が存在すると推定されている⁹².セレ ンにはがんやエイズの発症を遅延させる効果があること や^{1,93}、セレンタンパク質を生合成できないようにしたト ランスジェニックマウスは胎生致死になることから⁹⁴、セ レンタンパク質の機能解析やセレン代謝全般についてのさ らなる理解が求められている.

セレンタンパク質の生合成系は、高等動物、魚類、鳥 類、および細菌やアーキアの一部に確認されているが、酵 母や植物は一般に生合成系を持たない.セレノシステイン 残基は翻訳後修飾ではなく、翻訳段階で位置特異的に挿入 される第21番目のアミノ酸である. E. coli におけるセレ ンタンパク質の生合成については、Böck らにより詳細に 研究されている⁵⁵.高等動物における生合成系も大筋では 同様であるが、いくつかの点で大きく異なる⁵⁶.セレン含 有タンパク質の mRNA には二つの共通した特徴がある. 一つは、翻訳領域内に存在するインフレームの UGA コド ンであり、もう一つは、3′-非翻訳領域に存在する SECIS (selenocysteine insertion sequence) エレメントと呼ばれる 特殊なステム-ループ構造をとる RNA 配列である(図 5)⁵⁷.

セレノシステインの UGA コドンは、UCA アンチコドン を持つ特殊な tRNA^{[Ser]Sec} により解読される⁹⁶⁾.通常のタン パク質の合成に用いられる 20種のアミノ酸の場合は、遊 離状のものが tRNA に直接チャージされて翻訳に用いられ る.ところが、セレノシステインの場合は、まず tRNA^{[Ser]Sec} が遊離のセリンでアミノアシル化されたセリルtRNA^{[Ser]Sec} が遊離のセリンでアミノアシル化されたセリルtRNA^{[Ser]Sec} となり、続いてセリル-tRNA^{[Ser]Sec} がりン酸化さ れてホスホセリル-tRNA^{[Ser]Sec} を生じる^{99,100)}.最後に、ホス ホセリル-tRNA^{[Ser]Sec} とセレノリン酸を基質として、セレノ システインシンターゼという酵素の作用によりセレノシス テイル-tRNA^{[Ser]Sec} が生成する (図 5).セレノリン酸は、 セレノリン酸シンテターゼによって、セレニドと ATP を 基質として合成される.しかし、生体内では遊離のセレニ



セレノリン酸はセレノシステインあるいは亜セレン酸から生成されうる. セレノシステインリ アーゼはセレノシステインからのセレン脱離反応を担う. セリル-tRNA は,ホスホセリル-tRNA を介してセレノシステイル-tRNA へと変換される. 生成したセレノシステイル-tRNA は eEFsec を 介してリボソームに運ばれ, UGA がセレノシステインとしてデコードされる.

ドではなく、タンパク質などのキャリアーに結合したセレニドが本酵素の基質であるという可能性も示唆されている¹⁰¹⁾.後述するように、著者らの最近の研究から、セレノシステインリアーゼからセレノリン酸シンテターゼへの直接的なセレン基質の供給の可能性が考えられる.

SECIS エレメントに特異的に結合するタンパク質とし て, SECIS binding protein 2 (SBP2) が存在する¹⁰²⁾. セレ ノシステイル-tRNA^{[ser]sec}は通常の翻訳伸長因子である EF-Tuによっては認識されず、セレノシステイル-tRNA^{[Ser]Sec} 特異的な伸長因子 eEFsec によって認識される¹⁰³⁾. eEFsec は SBP2 あるいは SBP2-SECIS 複合体と結合することによ りセレノシステインコドンの解読を行う. UGA をセレノ システインとして解読する過程においては、上記の因子が 超複合体を形成すると考えられている(図5)%.セレン欠 乏状態においては、この翻訳過程は正常に行われなくな り、セレノシステイン用の UGA コドンで翻訳の停止が起 きて未成熟ペプチドが生成する.また、そのような条件下 では、 ナンセンス 変異 依存 mRNA 分解 機構 (nonsensemediated mRNA decay, NMD) と呼ばれる過程により、セ レン含有タンパク質 mRNA は分解を受けることが明らか となってきた⁹⁶⁾. セレンの栄養レベルに対するセレン含有 タンパク質の発現量の変動の度合いは一様ではなく、タン パク質の種類ごと、同じタンパク質でも組織ごとに異なっ ているが、その理由の一つとして、NMDによる分解への

感受性がセレン含有タンパク質 mRNA の種類ごとに違う ことが考えられる.SECIS エレメントの構造の違いや, SECIS エレメントに結合する因子の違いが NMD への感受 性に影響を与えていると推測されている.

7. システインデスルフラーゼの立体構造と反応機構

これまでに、システインデスルフラーゼの結晶構造 は、グループ I 酵素 (Thermotoga maritima NifS¹⁰⁴⁾, E. coli IscS¹⁰⁵⁾) およびグループ II 酵素 (E. coli CsdB/SufS^{106~108)}, *Synechocystis* sp. SufS¹⁰⁹⁾)の両グループについて明らかと なっている. グループ間でのアミノ酸配列の類似性は比較 的低いにも関わらず、これら酵素の全体構造は互いに非常 によく似ている.筆者らはシステインデスルフラーゼの立 体構造として, E. coli の SufS/CsdB の立体構造を世界に 先んじて明らかにした¹⁰⁶⁾.本酵素はホモ二量体構造をとっ ており、各サブユニットは三つの部分から構成されてい た. すなわち, α/βフォールドの大ドメインと, β鎖4 本, α ヘリックス 3 本からなる小ドメイン,および 2 本の αヘリックスを含むN末端セグメントである. PLP 依存 酵素の fold-type I ファミリーに属す他のタンパク質と大き く異なる構造として注目されるのが、小ドメインから大ド メインの方に延びたローブ(耳たぶ状の丸みを帯びた突出 構造) である (図 6A). システインデスルフラーゼの触媒 反応では、L-システインの硫黄がいったん酵素の活性部位



図6 システインデスルフラーゼの活性中心ポケットの構造と推定反応機構

 (A) E. coli CsdB (SufS)の活性中心を覆うローブの構造. CsdBのX線結晶構造解析から明らかになった補酵素 PLP とローブ上の活性中心システイン残基 (Cys364)の位置関係. PLP と Cys364 を ball & stick モデルで示す. (B)システインデスルフラーゼの 推定反応機構. アラニン-エナミン中間体以降の反応は省略した.

に存在するシステイン残基に受け渡されてシステインペル スルフィド残基が生成するが、ペルスルフィド残基が形成 されるシステイン残基(Cys364)は、SufS/CsdBに独特な 構造であるローブ上に存在することが明らかになった. 著 者らは、基質アナログであるL-プロパルギルグリシンを 活性中心に取り込ませた複合体の立体構造解析にも成功し た¹⁰⁸⁾. この複合体においてプロパルギルグリシンは PLP とシッフ塩基を形成しており,酵素外アルジミン中間体状 態を捕らえることができた.364番のシステイン残基を含 むローブが基質に近づくように動く可能性が考えられてい たが、基質アナログを加えない状態の構造と大きな違いは 認められなかった、本酵素の結晶構造は Lima によっても 解析され、活性中心システイン残基にセレンが結合した状 態 (Cys-S-SeH) の構造を報告している¹⁰⁷⁾. 一方, グルー プIに属する T. maritima NifS と E. coli IscS の結晶構造に おいてはいずれも、活性中心システイン残基を含むローブ 部分は乱れていた^{104,105)}. グループ I 酵素のローブはグルー プⅡ酵素のそれよりも長く,フレキシビリティーが高い のではないかと考えられる. システインデスルフラーゼの 活性中心において、酵素が脱離させたシステインの硫黄原 子をどのようにして,酵素外に運び出し,硫黄受容体とな る別のタンパク質分子に転移させるのを考える上で、この フレキシブルなローブの存在は興味深い. ローブ全体が大 きく動くことで活性中心ポケットと酵素表面の硫黄受容体 との間を活性中心システイン残基が行き来し、酵素のター ンオーバーが起こると考えられている.

システインデスルフラーゼの反応機構がいくつか提唱されている(図 6B). これらは細かい点で相違はあるものの,本質的なところでは共通している^{110~113)}. これまで知られている全てのシステインデスルフラーゼには保存されたシステイン残基があり,これは活性に必須である. 一般的によく知られる他のピリドキサール酵素と同様,本酵素反応

は PLPと基質 L-システインとがシッフ塩基を形成し,続いて α-プロトンが引き抜かれるところから開始するが,特徴的なのは,その後,基質-ケチミン中間体の硫黄に対して酵素の活性中心システイン残基が求核攻撃し,その結果,酵素上にシステインペルスルフィド残基が形成される点である.コンフォーメーション変化によって本システインペルスルフィドが活性中心からタンパク質分子表面に運び出され,鉄硫黄クラスターをはじめとする含硫生体分子の生合成に利用されるものと考えられている.

速度論的解析から、グループⅡシステインデスルフ ラーゼの律速段階は基質の C-S 結合の切断であることが 示唆された¹⁰⁹.この段階では、酵素の活性中心システイン 残基上のペルスルフィド結合の形成も同時に進行する.グ ループⅡ酵素のローブはグループⅠのそれと比べて、構造 的に短くて固いことから,基質システインのチオールに対 する活性残基システインの求核攻撃は起こりにくいと思わ れる. さらには、このようにローブのフレキシビリティー が低いために、硫黄受容体への硫黄の転移も困難な可能性 が考えられる.実際に、グループIIに属す E. coli の SufS の活性は非常に低く、発見当初は本酵素活性が生理的に機 能するのかどうか疑われていた14,112).しかしその後の研究 から,ほとんどのグループⅡ酵素において,特定のタン パク質の存在下でその活性が著しく高められることがわ かった. これらタンパク質は E-type 硫黄受容体と呼ばれ, SufSの活性を高める SufE⁵⁵⁾やCsdAの活性を高める CsdE¹²⁾などがある. E-type 硫黄受容体によるグループ II 酵 素の活性化機構は未だ明らかでないが,特異的なタンパク 質間相互作用が関与していることがわかっている.すなわ ち, SufE は IscS や NifS の活性を高めることはできず⁵⁵⁾, CsdE は SufS や IscS に作用できない¹²⁾.

硫黄受容体によるシステインデスルフラーゼ活性の上昇 効果はグループI酵素についても見られる. IscS の活性は IscUによって6倍程度まで上昇する²⁵⁾.しかし,グループ II 酵素が特異的な硫黄受容体分子を有するのに対して, IscS は IscU の他にも,ThiI や TusA などに硫黄を転移する ことができる.最近明らかになった IscS-IscU 複合体およ び IscS-TusA 複合体の結晶構造解析によれば,IscUと TusA は,IscS のそれぞれ異なる部位と相互作用し,各々 違った方向から IscS の活性中心 Cys328 に近づくと推定さ れる¹¹⁴⁾. IscS のローブはグループ II のものよりも長くフ レキシビリティーが高い.この特徴により,複数の硫黄受 容体に対して硫黄を転移できるのではないかと考えられ る.

8. セレノシステインリアーゼの構造,反応機構, セレン/硫黄識別機構

著者らはラット由来セレノシステインリアーゼの結晶構 造を解明した¹¹⁵⁾. セレノシステインリアーゼの全体構造 は、システインデスルフラーゼやキヌレニナーゼなどの PLP 依存酵素の fold-type Iファミリーに属す酵素と類似し ていた.特に、グループIIシステインデスルフラーゼよ りもグループI酵素の方と構造的に類似度が高い.

哺乳動物のセレノシステインリアーゼには完全に保存さ れたシステイン残基が存在する. ラット酵素の結晶構造に おいて、これに相当する Cys375 は、PLP の近傍に位置す るフレキシブルローブ上に存在している. Cys375をアラ ニンで置換した変異型酵素は酵素活性を失った。また、エ レクトロスプレーイオン化質量分析によって,基質 L-セ レノシステインから脱離されたセレンは Cys375 上にシス テインセレノペルスルフィド(Enz-S-Se⁻)の状態で結合 することが示された115). これは、システインデスルフラー ゼにおいて見られるシステインペルスルフィド中間体と類 似している. セレノシステインリアーゼと基質アナログで あるセレノプロピオン酸との複合体の結晶構造解析から, Cys375のチオールと基質セレノシステインのセレノレー トとの間の相互作用によって基質が酵素の活性中心に正し く取り込まれることが示唆された。以上から、セレノシス テインリアーゼの反応機構は、大筋ではシステインデスル フラーゼのそれと同様であると考えられる.

セレノシステインリアーゼはシステインデスルフラーゼ と異なり、セレノシステインに対する基質特異性が厳密で あり、本酵素がどのようにしてL-セレノシステインとL-システインを区別しているのかは、セレン代謝を解明する 上で非常に重要な問題である。著者らは、ラット由来のセ レノシステインリアーゼの基質認識機構を解明するため に、UV/Vis 吸収スペクトル解析およびL-システインと本 酵素の複合体の結晶構造解析を行った。セレノシステイン リアーゼは酵素内シッフ塩基に由来する 420 nm の吸収極 大を持つ、L-セレノシステインを酵素に加えると、420 nm

の吸収には大きな変化はなく、400 nm 以下になだらかな 吸収の増加が見られる.これは酵素反応によって生じた元 素状セレンによるものである.一方,基質とはならない L-システインを酵素に添加すると、420 nmの吸収極大の 顕著な減少とそれに伴う 350 nm の吸収極大の増加が見ら れた. L-システインと本酵素の複合体の結晶構造解析か ら,これは PLP-リジン残基のシッフ塩基の C4'位に L-シス テインのチオールが求核攻撃し共有結合性の付加体を形成 したことに由来するものであることが判明した(図7). すなわち、L-システインは酵素の活性中心ポケットに入り 込むことはできるが、その α-アミノ基の代わりに Sy が PLPのC4′と結合して準安定なアダクトを形成してしまう と考えられる. さらに, C375A 変異型酵素においては, L-セレノシステインを添加した場合にも、野生型酵素に1-システインを添加した時と同様な 420 nm の吸収減少と 350 nm の吸収増加が見られた. この結果は、Cys375 が L-セレノシステインを酵素外シッフ塩基形成に導く段階 (transaldimination)において重要であることを示すと共に, セレノシステインのセレンとシステインの硫黄を区別して 認識する残基が Cys375 であることを示唆している.この ことは次の実験によっても支持された. すなわち, 野生型 酵素をL-セレノシステインとインキュベーションし、ESI-MSによって解析すると、セレンが酵素に結合した分子種 が観察されるが、C375A 変異型酵素と L-セレノシステイ ンをインキュベーションした場合や野生型酵素とL-シス テインをインキュベーションした場合では、そのような中 間体は生成されなかった、以上より、酵素の活性中心に結



図7 セレノシステインリアーゼの推定基質認識機構 (A) 基質セレノシステインが活性中心に結合する場合,酵素の フレキシブルループ上の活性中心 Cys375 との相互作用により, 基質-PLP アルジミンが形成される.(B) 基質アナログである システインは活性中心に結合することができるが,Sγが酵素-PLP シッフ塩基を求核攻撃し可逆的にアダクトを形成するた め,硫黄脱離反応は進行しない.

合する際に、Cys375 がL-セレノシステインのセレノール (pK_a =5.2)を特異的に認識し、正しい位置に配向させる ことで、酵素外シッフ塩基が形成され反応が進行するもの と考えられた.一方、L-システインのチオール (pK_a =8.3) は、プロトン化されているために Cys375 によって認識で きないのではないかと考えられた.

9. おわりに

システインデスルフラーゼとセレノシステインリアーゼ は、ペルスルフィドあるいはセレノペルスルフィドという 形で硫黄およびセレンを活性化し、硫黄・セレンを構成成 分とする分子の生合成系の初発酵素として機能する点で共 通している.比較的大きな分子であるタンパク質に結合し た形のペルスルフィド、セレノペルスルフィドを使うこと には利点があると思われる. つまり, 遊離の硫化物イオン やセレン化物イオンは反応性が高くコントロールしにくい が、酵素結合型の(セレノ)ペルスルフィドの戦略をとる ことによって、安全かつ高い特異性をもった硫黄・セレン の転移反応が可能となると理解される.鉄硫黄クラスター 形成やセレンタンパク質の生合成については、現状ではま だ関与する因子が出尽くしたとは言い難く、今後も新たな 発見が続くものと思われる。また、チアミン、モリブドプ テリン、チオウリジンの生合成に関しても、反応機構の詳 細は未だ不明であり、本分野の今後の研究の進展が望まれ る.

謝辞

本稿で取り上げた著者らの研究成果は,著者が京都大学 化学研究所に在籍していた頃から現在に至るまでの間,多 くの方々との共同研究によって得られたものである.始終 ご指導賜りました江崎信芳先生,栗原達夫先生をはじめ, 大変お世話になった共同研究者の皆様,分子微生物科学研 究室の皆様に心より感謝の意を表します.最後に,本研究 テーマに携わるきっかけを与えて下さった左右田健次先生 にこの場を借りて感謝申し上げます.

文 献

- 1) Rayman, M.P. (2000) Lancet, 356, 233-241.
- Esaki, N., Nakamura, T., Tanaka, H., & Soda, K. (1982) J. Biol. Chem., 257, 4386–4391.
- Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F., & Dean, D.R. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 2754–2758.
- 4) Jacobson, M.R., Cash, V.L., Weiss, M.C., Laird, N.F., Newton, W.E., & Dean, D.R. (1989) *Mol. Gen. Genet.*, 219, 49– 57.
- Zheng, L. & Dean, D.R. (1994) J. Biol. Chem., 269, 18723– 18726.
- 6) Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H., & Dean, D.R. (1998) J.

Biol. Chem., 273, 13264-13272.

- Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T., Soda, K., & Esaki, N. (1997) J. Biol. Chem., 272, 22417–22424.
- Grishin, N.V., Phillips, M.A., & Goldsmith, E.J. (1995) Protein Sci., 4, 1291–1304.
- Mihara, H. & Esaki, N. (2002) Appl. Microbiol. Biotechnol., 60, 12–23.
- 10) Lill, R. & Mühlenhoff, U. (2008) Annu. Rev. Biochem., 77, 669–700.
- Ye, H., Pilon, M., & Pilon-Smits, E.A. (2006) New Phytol., 171, 285–292.
- 12) Loiseau, L., Ollagnier-de Choudens, S., Lascoux, D., Forest, E., Fontecave, M., & Barras, F. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 26760–26769.
- 13) Trotter, V., Vinella, D., Loiseau, L., Ollagnier de Choudens, S., Fontecave, M., & Barras, F. (2009) *Mol. Microbiol.*, 74, 1527–1542.
- 14) Mihara, H., Maeda, M., Fujii, T., Kurihara, T., Hata, Y., & Esaki, N. (1999) J. Biol. Chem., 274, 14768–14772.
- Patzer, S.I. & Hantke, K. (1999) J. Bacteriol., 181, 3307– 3309.
- 16) Beinert, H. (2000) J. Biol. Inorg. Chem., 5, 2-15.
- 17) Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., & Johnson, M.K. (2005) Annu. Rev. Biochem., 74, 247–281.
- 18) Fu, W., Jack, R.F., Morgan, T.V., Dean, D.R., & Johnson, M. K. (1994) *Biochemistry*, 33, 13455–13463.
- 19) Agar, J.N., Yuvaniyama, P., Jack, R.F., Cash, V.L., Smith, A. D., Dean, D.R., & Johnson, M.K. (2000) J. Biol. Inorg. Chem., 5, 167–177.
- 20) Olson, J.W., Agar, J.N., Johnson, M.K., & Maier, R.J. (2000) Biochemistry, 39, 16213–16219.
- 21) Yuvaniyama, P., Agar, J.N., Cash, V.L., Johnson, M.K., & Dean, D.R. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 599–604.
- 22) Bandyopadhyay, S., Chandramouli, K., & Johnson, M.K. (2008) Biochem. Soc. Trans., 36, 1112–1119.
- 23) Tokumoto, U. & Takahashi, Y. (2001) J. Biochem., 130, 63– 71.
- 24) Nakamura, M., Saeki, K., & Takahashi, Y. (1999) J. Biochem., 126, 10–18.
- (25) Kato, S., Mihara, H., Kurihara, T., Takahashi, Y., Tokumoto, U., Yoshimura, T., & Esaki, N. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 99, 5948–5952.
- 26) Raulfs, E.C., O'Carroll, I.P., Dos Santos, P.C., Unciuleac, M. C., & Dean, D.R. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 8591–8596.
- 27) Smith, A.D., Agar, J.N., Johnson, K.A., Frazzon, J., Amster, I.J., Dean, D.R., & Johnson, M.K. (2001) J. Am. Chem. Soc., 123, 11103–11104.
- 28) Urbina, H.D., Silberg, J.J., Hoff, K.G., & Vickery, L.E. (2001) J. Biol. Chem., 276, 44521–44526.
- 29) Bonomi, F., Iametti, S., Ta, D., & Vickery, L.E. (2005) J. Biol. Chem., 280, 29513–29518.
- 30) Krebs, C., Agar, J.N., Smith, A.D., Frazzon, J., Dean, D.R., Huynh, B.H., & Johnson, M.K. (2001) *Biochemistry*, 40, 14069–14080.
- 31) Tan, G., Lu, J., Bitoun, J.P., Huang, H., & Ding, H. (2009) Biochem. J., 420, 463–472.
- 32) Wang, W., Huang, H., Tan, G., Si, F., Liu, M., Landry, A.P., Lu, J., & Ding, H. (2010) *Biochem. J.*, 432, 429–436.
- 33) Yang, J., Bitoun, J.P., & Ding, H. (2006) J. Biol. Chem., 281, 27956–27963.
- 34) Ollagnier-de-Choudens, S., Sanakis, Y., & Fontecave, M.

- 35) Cupp-Vickery, J.R., Peterson, J.C., Ta, D.T., & Vickery, L.E. (2004) J. Mol. Biol., 342, 1265–1278.
- 36) Hoff, K.G., Cupp-Vickery, J.R., & Vickery, L.E. (2003) J. Biol. Chem., 278, 37582–37589.
- 37) Hoff, K.G., Ta, D.T., Tapley, T.L., Silberg, J.J., & Vickery, L.E. (2002) J. Biol. Chem., 277, 27353–27359.
- 38) Silberg, J.J., Hoff, K.G., Tapley, T.L., & Vickery, L.E. (2001) J. Biol. Chem., 276, 1696–1700.
- 39) Silberg, J.J., Tapley, T.L., Hoff, K.G., & Vickery, L.E. (2004) J. Biol. Chem., 279, 53924–53931.
- 40) Tapley, T.L. & Vickery, L.E. (2004) J. Biol. Chem., 279, 28435–28442.
- 41) Chandramouli, K. & Johnson, M.K. (2006) Biochemistry, 45, 11087–11095.
- 42) Kakuta, Y., Horio, T., Takahashi, Y., & Fukuyama, K. (2001) *Biochemistry*, 40, 11007–11012.
- 43) Giel, J.L., Rodionov, D., Liu, M., Blattner, F.R., & Kiley, P.J. (2006) Mol. Microbiol., 60, 1058–1075.
- 44) Schwartz, C.J., Giel, J.L., Patschkowski, T., Luther, C., Ruzicka, F.J., Beinert, H., & Kiley, P.J. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 14895–14900.
- 45) Jang, S. & Imlay, J.A. (2010) Mol. Microbiol., 78, 1448– 1467.
- 46) Lee, J.H., Yeo, W.S., & Roe, J.H. (2004) Mol. Microbiol., 51, 1745–1755.
- 47) Lee, K.C., Yeo, W.S., & Roe, J.H. (2008) J. Bacteriol., 190, 8244–8247.
- 48) Takahashi, Y. & Tokumoto, U. (2002) J. Biol. Chem., 277, 28380–28383.
- 49) Yeo, W.S., Lee, J.H., Lee, K.C., & Roe, J.H. (2006) Mol. Microbiol., 61, 206–218.
- 50) Layer, G., Gaddam, S.A., Ayala-Castro, C.N., Ollagnier-de Choudens, S., Lascoux, D., Fontecave, M., & Outten, F.W. (2007) J. Biol. Chem., 282, 13342–13350.
- 51) Wollers, S., Layer, G., Garcia-Serres, R., Signor, L., Clemancey, M., Latour, J.M., Fontecave, M., & Ollagnier de Choudens, S. (2010) J. Biol. Chem., 285, 23331–23341.
- 52) Eccleston, J.F., Petrovic, A., Davis, C.T., Rangachari, K., & Wilson, R.J. (2006) J. Biol. Chem., 281, 8371–8378.
- 53) Kitaoka, S., Wada, K., Hasegawa, Y., Minami, Y., Fukuyama, K., & Takahashi, Y. (2006) *FEBS Lett.*, 580, 137–143.
- 54) Chahal, H.K., Dai, Y., Saini, A., Ayala-Castro, C., & Outten, F.W. (2009) *Biochemistry*, 48, 10644–10653.
- 55) Outten, F.W., Wood, M.J., Muñoz, F.M., & Storz, G. (2003) J. Biol. Chem., 278, 45713–45719.
- 56) Gupta, V., Sendra, M., Naik, S.G., Chahal, H.K., Huynh, B. H., Outten, F.W., Fontecave, M., & Ollagnier de Choudens, S. (2009) J. Am. Chem. Soc., 131, 6149–6153.
- 57) Vinella, D., Brochier-Armanet, C., Loiseau, L., Talla, E., & Barras, F. (2009) *PLoS Genet.*, 5, e1000497.
- 58) Lauhon, C.T. & Kambampati, R. (2000) J. Biol. Chem., 275, 20096–20103.
- 59) Schwartz, C.J., Djaman, O., Imlay, J.A., & Kiley, P.J. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 9009–9014.
- 60) Hidese, R., Mihara, H., & Esaki, N. (2011) Appl. Microbiol. Biotechnol., DOI: 10.1007/s00253-00011-03336-x.
- 61) Begley, T.P., Downs, D.M., Ealick, S.E., McLafferty, F.W., Van Loon, A.P., Taylor, S., Campobasso, N., Chiu, H.J., Kinsland, C., Reddick, J.J., & Xi, J. (1999) Arch. Microbiol., 171, 293–300.
- 62) Kriek, M., Martins, F., Challand, M.R., Croft, A., & Roach,

P.L. (2007) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 46, 9223-9226.

- 63) Kriek, M., Martins, F., Leonardi, R., Fairhurst, S.A., Lowe, D. J., & Roach, P.L. (2007) J. Biol. Chem., 282, 17413–17423.
- 64) Kambampati, R. & Lauhon, C.T. (1999) Biochemistry, 38, 16561–16568.
- 65) Taylor, S.V., Kelleher, N.L., Kinsland, C., Chiu, H.J., Costello, C.A., Backstrom, A.D., McLafferty, F.W., & Begley, T. P. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 16555–16560.
- 66) Xi, J., Ge, Y., Kinsland, C., McLafferty, F.W., & Begley, T.P. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 8513–8518.
- 67) Leonardi, R. & Roach, P.L. (2004) J. Biol. Chem., 279, 17054–17062.
- 68) Challand, M.R., Martins, F.T., & Roach, P.L. (2010) J. Biol. Chem., 285, 5240–5248.
- 69) Banerjee, R., Chen, S., Dare, K., Gilreath, M., Praetorius-Ibba, M., Raina, M., Reynolds, N.M., Rogers, T., Roy, H., Yadavalli, S.S., & Ibba, M. (2010) FEBS Lett., 584, 387– 395.
- 70) Favre, A., Michelson, A.M., & Yaniv, M. (1971) J. Mol. Biol., 58, 367–379.
- 71) Palenchar, P.M., Buck, C.J., Cheng, H., Larson, T.J., & Mueller, E.G. (2000) J. Biol. Chem., 275, 8283–8286.
- 72) Waterman, D.G., Ortiz-Lombardia, M., Fogg, M.J., Koonin, E.V., & Antson, A.A. (2006) J. Mol. Biol., 356, 97–110.
- 73) Webb, E., Claas, K., & Downs, D.M. (1997) J. Bacteriol., 179, 4399-4402.
- 74) Mueller, E.G., Palenchar, P.M., & Buck, C.J. (2001) J. Biol. Chem., 276, 33588–33595.
- 75) Urbonavicius, J., Qian, Q., Durand, J.M., Hagervall, T.G., & Björk, G.R. (2001) *EMBO J.*, 20, 4863–4873.
- 76) Mihara, H., Kato, S., Lacourciere, G.M., Stadtman, T.C., Kennedy, R.A., Kurihara, T., Tokumoto, U., Takahashi, Y., & Esaki, N. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 6679–6683.
- 77) Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A., & Suzuki, T. (2006) Mol. Cell, 21, 97–108.
- 78) Kambampati, R. & Lauhon, C.T. (2003) Biochemistry, 42, 1109–1117.
- 79) Numata, T., Fukai, S., Ikeuchi, Y., Suzuki, T., & Nureki, O. (2006) Structure, 14, 357–366.
- 80) Numata, T., Ikeuchi, Y., Fukai, S., Suzuki, T., & Nureki, O. (2006) Nature, 442, 419–424.
- 81) Sullivan, M.A., Cannon, J.F., Webb, F.H., & Bock, R.M. (1985) J. Bacteriol., 161, 368–376.
- 82) Hille, R. (2002) Trends Biochem. Sci., 27, 360-367.
- 83) Mendel, R.R. & Bittner, F. (2006) Biochim. Biophys. Acta, 1763, 621–635.
- 84) Schwarz, G. & Mendel, R.R. (2006) Annu. Rev. Plant Biol., 57, 623–647.
- 85) Rudolph, M.J., Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K.V., & Schindelin, H. (2001) Nat. Struct. Biol., 8, 42–46.
- 86) Leimkühler, S. & Rajagopalan, K.V. (2001) J. Biol. Chem., 276, 22024–22031.
- 87) Wuebbens, M.M. & Rajagopalan, K.V. (2003) J. Biol. Chem., 278, 14523–14532.
- 88) Zhang, W., Urban, A., Mihara, H., Leimkühler, S., Kurihara, T., & Esaki, N. (2010) J. Biol. Chem., 285, 2302–2308.
- 89) Esaki, N., Nakamura, T., Tanaka, H., Suzuki, T., Morino, Y.,
 & Soda, K. (1981) *Biochemistry*, 20, 4492–4496.
- 90) Mihara, H., Kurihara, T., Watanabe, T., Yoshimura, T., & Esaki, N. (2000) J. Biol. Chem., 275, 6195–6200.
- 91) Kurokawa, S., Takehashi, M., Tanaka, H., Mihara, H., Kurihara, T., Tanaka, S., Hill, K., Burk, R., & Esaki, N. (2011) J.

Nutr. Sci. Vitaminol., 57, 298-305.

- 92) Kryukov, G.V., Castellano, S., Novoselov, S.V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigo, R., & Gladyshev, V.N. (2003) Science, 300, 1439–1443.
- 93) Schwartz, M.K. (1975) Cancer Res., 35, 3481-3487.
- 94) Bosl, M.R., Takaku, K., Oshima, M., Nishimura, S., & Taketo, M.M. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 5531– 5534.
- 95) Heider, J. & Bock, A. (1993) Adv. Microb. Physiol., 35, 71– 109.
- 96) Driscoll, D.M. & Copeland, P.R. (2003) Annu. Rev. Nutr., 23, 17–40.
- 97) Berry, M.J., Banu, L., Harney, J.W., & Larsen, P.R. (1993) EMBO J., 12, 3315–3322.
- 98) Lee, B.J., Rajagopalan, M., Kim, Y.S., You, K.H., Jacobson, K.B., & Hatfield, D. (1990) *Mol. Cell Biol.*, 10, 1940–1949.
- 99) Ganichkin, O.M., Xu, X.M., Carlson, B.A., Mix, H., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N., & Wahl, M.C. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 5849–5865.
- 100) Xu, X.M., Carlson, B.A., Mix, H., Zhang, Y., Saira, K., Glass, R.S., Berry, M.J., Gladyshev, V.N., & Hatfield, D.L. (2007) *PLoS Biol.*, 5, e4.
- 101) Lacourciere, G.M., Mihara, H., Kurihara, T., Esaki, N., & Stadtman, T.C. (2000) J. Biol. Chem., 275, 23769–23773.
- 102) Copeland, P.R. & Driscoll, D.M. (1999) J. Biol. Chem., 274, 25447–25454.
- 103) Berry, M.J., Tujebajeva, R.M., Copeland, P.R., Xu, X.M., Carlson, B.A., Martin, G.W., 3rd, Low, S.C., Mansell, J.B.,

Grundner-Culemann, E., Harney, J.W., Driscoll, D.M., & Hatfield, D.L. (2001) *Biofactors*, 14, 17–24.

- 104) Kaiser, J.T., Clausen, T., Bourenkow, G.P., Bartunik, H.D., Steinbacher, S., & Huber, R. (2000) J. Mol. Biol., 297, 451– 464.
- 105) Cupp-Vickery, J.R., Urbina, H., & Vickery, L.E. (2003) J. Mol. Biol., 330, 1049–1059.
- 106) Fujii, T., Maeda, M., Mihara, H., Kurihara, T., Esaki, N., & Hata, Y. (2000) *Biochemistry*, **39**, 1263–1273.
- 107) Lima, C.D. (2002) J. Mol. Biol., 315, 1199-1208.
- 108) Mihara, H., Fujii, T., Kato, S., Kurihara, T., Hata, Y., & Esaki, N. (2002) J. Biochem., 131, 679–685.
- 109) Tirupati, B., Vey, J.L., Drennan, C.L., & Bollinger, J.M., Jr. (2004) *Biochemistry*, 43, 12210–12219.
- 110) Behshad, E. & Bollinger, J.M., Jr. (2009) Biochemistry, 48, 12014–12023.
- 111) Behshad, E., Parkin, S.E., & Bollinger, J.M., Jr. (2004) Biochemistry, 43, 12220–12226.
- 112) Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T., & Esaki, N. (2000) J. Biochem., 127, 559–567.
- 113) Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., & Dean, D.R. (1994) Biochemistry, 33, 4714–4720.
- 114) Shi, R., Proteau, A., Villarroya, M., Moukadiri, I., Zhang, L., Trempe, J.F., Matte, A., Armengod, M.E., & Cygler, M. (2010) *PLoS Biol.*, 8, e1000354.
- 115) Omi, R., Kurokawa, S., Mihara, H., Hayashi, H., Goto, M., Miyahara, I., Kurihara, T., Hirotsu, K., & Esaki, N. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 12133–12139.