

硒蛋白的分子生物学研究进展

黄 峙^{1)*} 向军俭¹⁾ 郭宝江²⁾

(¹⁾暨南大学生命科学技术学院生物工程学系, 广州 510632; ²⁾华南师范大学生物技术研究所, 广州 510631)

摘要 已有 35 种硒蛋白被分离和表征, 但许多硒蛋白及其功能仍未完全阐明. 硒半胱氨酸 (Sec) 作为参入蛋白质的第 21 种氨基酸, 由硒蛋白 mRNA 上的 UGA 编码. 在原核生物, Sec 参入硒蛋白的复杂机制已经较为明确, 需要四种基因产物 (SELA、SELB、SELC 和 SELD) 和一个存在于硒蛋白 mRNA 上的被称为 Sec 插入序列 (SECIS) 的茎环 (stem loop) 样二级结构. 在真核生物, 硒蛋白生物合成途径可能在 SECIS 的结构和位置、特异的延伸因子及其他 RNA-RNA 或 RNA-蛋白质因子之间的相互作用等方面与原核生物不同. 另外, 哺乳动物硒蛋白 mRNA 上的 UGA 翻译为 Sec 的过程低效, 特定位点的 UGA 密码子不同功能 (终止密码和 Sec 密码) 的调控可能是硒蛋白表达低效的关键.

关键词 硒, 硒蛋白, 硒半胱氨酸, 生物合成, 分子生物学

学科分类号 Q51

至今, 硒 (selenium) 共价结合在蛋白质中仅发现有硒半胱氨酸 (selenocysteine, Sec) 和硒甲硫氨酸 (selenomethionine, Se-Met) 两种形式. Se-Met 进入蛋白质可能是一随机事件, 即由 Se-Met 随机替代甲硫氨酸而参入到蛋白质分子中; 相反, Sec 则是由密码子 UGA 介导的翻译行为^[1]. 一般把以 Sec 形式参入到多肽链的蛋白质称硒蛋白 (selenoprotein), 而把其他结合硒的蛋白质称含硒蛋白 (Se-containing protein). 已发现的硒蛋白大多数是具有重要作用的酶, 又称之为硒酶 (selenoenzyme), 在硒蛋白特别是硒酶的活性中心发现含有 Sec, 目前认为硒蛋白是硒在机体内存在的主要功能形式, Sec 是生物合成和参入到蛋白质分子中的第 21 种氨基酸^[2]. 密码子 UGA 介导 Sec 参入蛋白质分子是对经典生物化学的重要补充, 但众所周知, UGA 同时是三个终止密码子之一, 在转译过程中, 分子如何识别 UGA 为 Sec 密码子而不当作终止密码子, 是近年来硒蛋白分子生物学最具吸引力的研究热点. 这一过程在原核生物和真核生物之间存在许多差别, 并在转译调节上有其独特之处.

1 分离和表征的主要硒蛋白

从病毒、细菌、真菌、无脊椎动物到脊椎动物都发现有硒蛋白或潜在的硒蛋白基因. 如 HIV、HBV、痘病毒等病毒的基因结构中具有编码硒蛋

白的能力^[3]. 传染性软疣病毒 (MCV) 含有与谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 同源的硒蛋白基因, 编码一种硒蛋白, 对人角质细胞抗 UV 辐射和超氧离子引起的细胞毒作用有保护作用, 同时也为 MCV 提供保护^[4]; 出血热病毒也含有一种潜在的硒蛋白基因, 经 PCR 分析, 它有 17 个 UGA 密码子和数个 SECIS (selenocysteine insertion sequence, SECIS) 元件, 每分子蛋白质可组装 16 个 Sec, 研究者认为该蛋白质与病毒致病性有关^[5]. 细菌的甲酸脱氢酶、甘氨酸还原酶等^[2]为较早期发现的硒蛋白. 还有人从真菌中分离出底物特异性硒蛋白 B 甘氨酸还原酶 (PB glycine reductase), 放射性 ⁷⁵Se 标记发现硒结合在 47 ku 亚基上^[6]. 小杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 基因编码有与哺乳动物同源的含硒酶硫氧还蛋白还原酶^[7].

在哺乳动物至少已发现并分离有 35 种硒蛋白, 其中功能比较明确的硒蛋白是^[8~10]: 谷胱甘肽过氧化物酶家族 (glutathione peroxidase, GPx1, GPx2, GPx3, GPx4)、脱碘酶家族 (iodothyronine deiodinases, ID1, ID2, ID3)、硫氧还蛋白还原酶家族 (thioredoxin reductases, TR1, TR2, TR3)、硒磷酸化物合成酶 (selenophosphate synthetase, SPS2)、精子线粒体膜硒蛋白 (sperm mitochondrial capsule

* 通讯联系人.

Tel: 020-85223259, E-mail: H_zhi@21cn.com

收稿日期: 2000-11-23, 接受日期: 2000-12-12

selenoprotein, MCS)、34 ku 精子 DNA 结合硒蛋白 (34 ku DNA-bound spermatid selenoprotein)、15 ku 前列腺上皮硒蛋白 (15 ku prostate epithelial selenoprotein) 和人淋巴细胞硒蛋白 (15 ku human lymphocytic selenoprotein)、硒蛋白 P (selenoprotein P)、硒蛋白 W (selenoprotein W) 和一种存在于多种组织中的 18 ku 硒蛋白 (18 ku selenoprotein)。它们具有防止膜结构及生物大分子的氧化损伤; 合成并调节活性甲状腺素 T_3 水平; 参与 DNA 合成并调节 DNA 表达; 促进精子生成、发育、成熟及其活力的维持; 保护内皮细胞和维护肌肉组织的正常功能等广泛的生理作用。

2 原核生物硒蛋白合成

虽然 Sec 的合成及其引入到蛋白质肽链中的过程极其复杂, 且真核与原核生物间存在较大差异, 但目前认为, 在原核生物, 这一过程是在两种顺式作用元件 (*cis*-acting element) 和四个翻译因子协同作用下完成的^[11]。

两种顺式作用元件: 引导 Sec 特异性插入位点的 Sec-UGA 密码子; 位于 UGA 3' 端临近下游的介导 Sec 特异性插入的一种 mRNA 茎环 (stem loop) 样二级结构, 即 SECIS 元件。

四个翻译因子: 两种有关 Sec 合成的酶, 即硒磷酸化物合成酶和硒半胱氨酸合成酶; 特异的载体 tRNA^[Sec]; 特异的翻译因子 SELB。其对应的基因和功能如表 1 所示^[1, 11]。

Table 1 Productions and function of selenoprotein synthetic genes

表 1 硒蛋白合成基因的产物与功能

基因	产物	功能
<i>SelA</i>	SELA Sec 合成酶	硒半胱氨酰 tRNA (Sec-tRNA ^[Sec]) 合成
<i>SelB</i>	SELB 特异的翻译因子	结合 Sec-tRNA ^[Sec] 并识别 SECIS 介导 Sec 插入
<i>SelC</i>	SELC 特异的载体 tRNA ^[Sec]	合成与运载 Sec 的载体
<i>SelD</i>	SELD 硒磷酸化物合成酶	硒供体硒磷酸化物 (selenophosphate) 的合成

Sec 的生成、运载及硒蛋白的合成过程如下^[1, 11, 12]: a. tRNA^[Sec] 在 Ser-tRNA 合成酶作用下, 生成 Ser-tRNA^[Sec]; b. 在硒磷酸化物合成酶作用下生成硒磷酸化物; c. Ser-tRNA^[Sec] 以丝氨酸

为骨架, 在硒半胱氨酸合成酶作用下, 以硒磷酸化物为硒供体, 形成硒半胱氨酰 tRNA (Sec-tRNA^[Sec]); d. 特异的翻译因子结合并识别 SECIS, 介导 Sec 插入肽链。

3 真核生物硒蛋白合成

在真核生物, 关于 Sec 插入的确切机制至今不明。现有的资料表明, 与原核生物相比, 至少有以下不同。

3.1 哺乳动物硒蛋白的 Sec-UGA 密码子

Sec-UGA 体外翻译实验显示, 兔网织红细胞裂解液中硒蛋白 P 和 GSH-Px mRNA 不能翻译相应的 Sec-UGA, 但 GSH-Px mRNA 从起始密码子 AUG 到 Sec-UGA 相对应的肽链可以在体外合成, 这说明该密码子仍起终止密码子作用。硒蛋白三碘原腺氨酸脱碘酶 (I 型脱碘酶), 在一过性转染的哺乳动物细胞体内, 其 Sec-UGA 仍可作为终止密码子。因此, 在哺乳动物 mRNA 相同位置的 UGA 可兼具截然不同的功能^[10]。

3.2 真核生物的 SECIS 元件

在真核生物, SECIS 位于 mRNA 3' 非转译区 (3'-untranslated regions, 3'-UTR)^[13, 14]。GPx 和硒蛋白 P mRNA 有一段保守序列形成 SECIS 或 STE (selenium translation element), 其序列、结构和所在位置都与原核生物不同^[15]。事实上, 存在于 UGA 密码子下游至 SECIS 之间 > 1 kb 的序列为真核硒蛋白合成机制增添了诸多奥秘, 此间可能有 RNA-RNA 或 (和) RNA-蛋白质因子的识别及相互作用。SBP (selenium binding protein) 的发现只是其中之一, 它能特异地结合位于硒蛋白 GPx mRNA 3' UTR 的 SECIS 元件, 形成复合体。研究者认为 SBP 可能就是真核生物的 SELB^[16]。

3.3 哺乳动物 Sec 的转运及其合成途径

其载体为 Sec-tRNA, 又称 Sec-tRNA^{[Ser]Sec}。其二、三级结构与通常的 tRNA 和细菌 tRNA 有显著不同, 具有独特的氨基酸长臂。在高等脊椎动物细胞中存在 Sec 的两种同分异构载体 tRNA, 它们的区别在于反密码子的可摆动核苷酸中 2'-O 核糖的甲基化态不同。该核苷酸的碱基都是 5-甲氧基甲基尿嘧啶 (mcmU), 而且这些 tRNA 还有三个不同的修饰碱基, 它们的生物合成最近已在 *Xenopus* 卵母细胞中构建。此外, tRNA^{[Ser]Sec_{mcmU}} 和 tRNA^{[Ser]Sec_{mcmU}} (或其他 2'-O 甲基核糖的同源物) 均能够在蛋白质合成时阅读 UGA 密码子, 说

明这些同分异构受体能够被延伸因子 eEF-1 识别. 为进一步证实 tRNA^{[Ser]^{Sec}} 的两种酰基化形式 (即: Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}} 和 Ser-tRNA^{[Ser]^{Sec}}) 在蛋白质合成中的作用, 有人用 GPx 和硒蛋白 P mRNA 研究 Sec-UGA 的翻译, 同时以兔 β -球蛋白 mRNA 终止密码子 UGA 作为对照, 并分析了延伸因子 eEF-1 对 Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}} 和 Ser-tRNA^{[Ser]^{Sec}} 的识别能力. 结果显示, 延伸因子 eEF-1 不识别 Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}}, 却易于识别 Ser-tRNA^{[Ser]^{Sec}}. 且在体外系统中, Ser-tRNA^{[Ser]^{Sec}} 对 GPx mRNA 的 Sec-UGA 和终止密码子 UGA 均有明显的抑制作用, 而 Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}} 却无此作用^[17].

3.4 有关真核生物硒蛋白的其他翻译因子

人硒磷酸化酶合成酶 (SELD) 已成功克隆并对其功能进行了研究^[18]. 在一组自体免疫性慢性活动性肝炎病人中证实含有一种 Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}} 结合蛋白, 这一蛋白质可能类似于细菌的 SELA 或 SELB. 另有一些发现 SELA 和 SELB 同源类似物的报道. 尽管一些真核 SBPs 已有报道^[16], 但 SECIS 元件如何介导 Sec 参入到 UGA 合成硒蛋白还不清楚. 牛肝细胞提取液发现真核 Sec-tRNA^[Sec] 不能被延伸因子 EF-1 α 识别, 但可被一特异性 Sec-tRNA^[Sec] 保护因子 SePF (selenocysteyl-tRNA protecting factor) 识别, 色谱分析发现 SePF (47.5 ku) 与 SBPs 不同, 但经紫外线 (UV) 辐射 SePF 和 SBPs 都能与 SECIS RNA 结合形成 150 ku 复合物. 以上结果提示 SePF 在真核硒蛋白合成中可能起重要作用^[19]. 也为硒蛋白合成机制研究提示了新的线索.

此外, 真核生物与原核生物在硒蛋白合成中的重大差别还反映在, 真核硒蛋白基因在原核生物体内的异源表达至今仍未有成功地报道^[11].

4 硒蛋白的低效表达及调节

有趣的是, Berry 及其同事已发现哺乳动物细胞翻译 Sec-UGA 过程低效^[13, 14]. 其证据之一是当脱碘酶 mRNA 中的 Sec-UGA 被替代为半胱氨酸密码子 UGU 时, 蛋白质表达水平可提高 20~400 倍. 同样, 在构建的兔网织红细胞裂解液的 GPx 和硒蛋白 P 表达体系中, 如把 Sec-UGA 替换为 UGU 时, 表达水平会提高许多倍, 而且即使在极低水平下仍可见表达. Berry 进一步论证了脱碘酶表达中 Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}} 是一限制因素, 但增加此种 tRNA 浓度只能增加酶蛋白表达 2 倍左右, 因此,

在硒蛋白合成中可能存在其他的调节因素. 为证实翻译启动的效率对这一现象所起的作用, 有研究把在哺乳动物细胞内翻译效率非常高的 eEF-1 α mRNA 领头序列导入 GPx 和硒蛋白 P mRNA, 仍未见提高翻译效率. 因此, GPx 和硒蛋白 P 低表达不大可能由于翻译启动受抑. 另一可能是 SECIS 元件使核糖体移动时, 在 Sec-UGA 处受阻导致硒蛋白翻译的水平降低, 但 GPx mRNA 中切除该元件未见肽链阅读或合成加速. 兔网织红细胞溶解液或麦胚芽抽提液中 GPx 肽链不稳定, 易降解, 但其表达水平峰值仍需 1 h, 用肽链降解也不足解释 GPx 合成的低效. 关于核糖体结合研究显示, 延伸因子 eEF-1 不识别 Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}}, 却易于识别 Ser-tRNA^{[Ser]^{Sec}}^[19], 且在体外系统中, Ser-tRNA^{[Ser]^{Sec}} 对 Sec-UGA (GPx mRNA) 和终止密码子 UGA 均有明显的抑制作用, 而 Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}} 却无此作用. UGA 密码子翻译过程效率低, 主要原因是在 UGA 双重作用, 而不是因为 SECIS 的翻译延阻^[20]. 或许这是硒蛋白表达低效的合理解释.

总之, 硒蛋白作为一类在生命活动中较为特殊的蛋白质, 对其研究正在不断深入, 但仍旧存在许多分子生物学奥秘需要阐明.

参 考 文 献

- 1 Stadtman T C. Selenocysteine. Annu Rev Biochem, 1996, **65**: 83~100
- 2 Kvalica J. Selenium and organism. Cas Lek Cesk, 1999, **138** (4): 99~106
- 3 Taylor E W, Nadimpalli R G, Ramanatha C S. Genomic structures of viral agents in relation to the biosynthesis of selenoproteins. Biol Trace Elem Res, 1997, **56** (1): 63~91
- 4 Shisler J L, Senkevich T G, Berry M F, et al. Ultraviolet-induced cell death blocked by a selenoprotein from a human dermatotropic poxvirus. Science, 1998, **279** (5347): 102~105
- 5 Ramanathan C S, Taylor E W. Computational genomic analysis of hemorrhagic fever viruses. Viral selenoproteins as a potential factor in pathogenesis. Biol Trace Elem Res, 1997, **56** (1): 93~106
- 6 Wagner M, Sonntag D, Grimm R, et al. Substrate-specific selenoprotein B of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Biochemical and molecular analysis. Eur J Biol Chem, 1999, **260** (1): 38~49
- 7 Buettner C, Harney J W, Berry M J. The Caenorhabditis elegans homologue of thioredoxin reductase contains a selenocysteine insertion sequence (SECIS) element that differs from mammalian SECIS elements but directs selenocysteine incorporation. J Biol Chem, 1999, **274** (31): 21598~21602
- 8 Margaret P R. The importance of selenium to human health (review). The Lancet, 2000, **356** (9225): 233~241
- 9 Burk R F, Hill K E. Orphan selenoproteins. Bioessays, 1999, **21** (3): 231~237
- 10 Glydyshev V N, Jeang K, Wootton J C, et al. A new human selenium-containing protein: Purification, characterization, and

- cDNA sequence. J Biol Chem, 1998, **273** (15): 8910~ 8915
- 11 Tormay P, Bock A. Barriers to heterologous expression of a selenoprotein gene in bacteria. Journal of Bacteriology, 1997, **179** (3): 576~ 582
 - 12 Jung J E, Karoor V. Utilization of selenocysteyl-tRNA^{[Ser]Sec} and seryl-tRNA^{[Ser]Sec} in protein synthesis. J Biol Chem, 1994, **269** (47): 29739~ 29745
 - 13 Berry M J, Banu L, Chen Y, *et al.* Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine containing enzyme. Nature, 1991, **353** (6341): 273~ 276
 - 14 Berry M J, Banu L, Larsen P R, *et al.* Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. EMBO J. 1993, **12** (8): 3315~ 3322
 - 15 Gu Q P, Beilstein M A, Vendeland S C, *et al.* Conserved features of selenocysteine insertion sequence (SECIS) elements in selenoprotein W cDNA from five species. Gene, 1997, **193** (2): 187~ 196
 - 16 Hubert N, Walczak R, Carbon P, *et al.* A protein binds the selenocysteine insertion element in the 3'-UTR of mammalian selenoprotein mRNAs. Nucleic Acids Research, 1996, **24** (3): 464~ 469
 - 17 David B M, Honglin H, Vadim N G, *et al.* Multiple levels of regulation of selenoprotein biosynthesis revealed from the analysis of human glioma cell lines. Biochemical Pharmacology, 2000, **60** (4): 489~ 497
 - 18 Low S C, Harney J W, Berry M J. Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. J Biol Chem, 1995, **270** (37): 21659~ 21664
 - 19 Fujiwara T, Busch K, Gross H J, *et al.* A SECIS binding protein (SBP) is distinct from selenocysteyl-tRNA protecting factor (SePF). Biochimie, 1999, **81** (3): 213~ 218
 - 20 Suppmann S, Persson B C, Bock A. Dynamic and efficiency *in vivo* of UGA-directed selenocysteine insertion at the ribosome. EMBO J, 1999, **18** (8): 2284~ 2293

Progress in Molecular Biology Research of Selenoproteins

HUANG Zhi^{1)*}, XIANG Jun-Jian¹⁾, GUO Bao-Jiang²⁾

⁽¹⁾ Department of Biotechnology, Life Science College, Ji Nan University, Guangzhou 510632, China;

⁽²⁾ Biotechnology Research Institute, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract About 35 selenoproteins have been identified and characterized, though many have roles that have not yet been fully elucidated. Selenocysteine represents the 21st amino acid which is encoded by the UGA triplet in selenoproteins mRNA. Incorporation of selenocysteine in selenoproteins is rather complex but has been widely elucidated in prokaryotes. Four gene products (SELA, SELB, SELC, and SELD) and a specific stem-loop secondary structure which is termed selenocysteine insertion sequence (SECIS element) are required. However, the biosynthetic pathway of selenoproteins in eukaryotes may proceed by different routes in such aspects as the position and structure of SECIS element, specific elongation factors and other RNA-RNA or RNA-binding protein factors interactions. Observations also showed that translation of UGA as Sec in mammalian cells was an inefficient process and the regulation of the same UGA codon existing in an identical position in mRNA serves different functions (stop codon and Sec codon) might be involve in this process.

Key words selenium, selenoprotein, selenocysteine (Sec), biosynthesis, molecular biology

* Corresponding author. Tel: 86-20-85223259, E-mail: H_zhi@21cn.com

Received: November 23, 2000 Accepted: December 12, 2000