

博士論文

ファイトケラチン合成酵素の機能解析

応用生命化学専攻

氏名 小川 進也

指導教員名 吉村 悦郎

目次

第1章 序論

1-1. 背景	1
1-2. 生物の重金属ストレス応答	3
1-3. グルタチオンとファイトケラチンのCdへの配位について	6
1-4. ファイトケラチン合成酵素(PCS)について	7
1-5. 本研究の目的および概要	12

第2章 HPLC ソフト金属キレーター分析の条件最適化による高感度化 およびファイトケラチン合成酵素の活性評価系の検討

2-1. 序	
2-1-1. ファイトケラチン類の検出方法	13
2-1-2. BCS を用いたソフト金属キレーター分析の原理	16
2-1-3. 目的	17
2-2. 実験手法	
2-2-1. 試薬	18
2-2-2. BCS の励起・蛍光波長の測定	18
2-2-3. HPLC 装置	18
2-2-4. ポストカラム溶液の調製	18
2-2-5. 生物試料の調製	19
2-2-6. PCS の活性測定	19
2-3. 結果	
2-3-1. BCS の励起・蛍光波長の再検討	21
2-3-2. BCS の濃度および BCS/Cu 比の検討	22
2-3-3. He バブリングによるポストカラム溶液の還元状態の維持	23
2-3-4. 検量線および検出限界	24
2-3-5. 生物試料の測定と添加回収率	25
2-3-6. 酵素反応液への標準添加法による PC ₂ 検量線とその線形範囲	27
2-3-7. 様々な酵素濃度における比活性	28
2-4. 考察	33

第3章 *Arabidopsis thaliana* 由来の PCS を用いた

PCS の Cd による活性化機構の解析

3-1. 序	
3-1-1. PCS の活性化機構	34
3-1-2. 目的	35
3-2. 実験手法	
3-2-1. <i>AtPCS1</i> の大量発現	36
3-2-2. アフィニティークロマトグラフィー精製	36
3-2-3. 酵素活性測定	36
3-2-4. FluoZin-1 を用いた結合定数の測定	37
3-2-5. コンピューターを用いたデータ解析	37
3-2-6. γ EC, desglycyl PC ₂ を基質とした酵素反応	37
3-2-7. 未知ピークの分取と質量分析	37
3-3. 結果	
3-3-1. <i>AtPCS1</i> の発現およびアフィニティークロマトグラフィー精製	39
3-3-2. 酵素活性測定系のバリデーション	40
3-3-3. 様々な GSH, Cd 濃度と酵素活性	43
3-3-4. FluoZin-1 を用いた GSH と Cd の結合定数の算出	46
3-3-5. 遊離 Cd 濃度を一定とした際の酵素活性	49
3-3-6. γ EC, desglycyl PC ₂ を基質とした酵素反応	51
3-3-7. 未知ピークの質量分析	54
3-4. 考察	
3-4-1. PCS の反応速度論	56
3-4-2. PCS の基質認識機構	67

第4章 *AtPCS1* を用いたアミノ酸改変による機能部位解析と

安定化 PCS の作製

4-1. 序	
4-1-1. PCS の Cys 残基変異と酵素活性	68
4-1-2. 目的	69
4-2. 実験手法	
4-2-1. 使用遺伝子, ベクター, 菌株	70
4-2-2. 種々の Cys 変異 <i>AtPCS1</i> 発現ベクターの作製	70
4-2-3. <i>AtPCS1</i> および変異体の発現チェック	73

4-2-4. 大腸菌粗抽出液を用いた PCS 活性の測定	73
4-2-5. <i>At</i> PCS1(WT), <i>At</i> PCS1(B3)の大量精製	73
4-2-6. <i>At</i> PCS1(WT), <i>At</i> PCS1(B3)の保存安定性の検討	75
4-2-7. <i>At</i> PCS1(WT)の 3D モデル構造の作成	75
4-2-8. <i>At</i> PCS1(WT), <i>At</i> PCS1(B3)の SH 基の定量	75
4-2-9. <i>At</i> PCS1(WT)の結晶化条件のスクリーニング	75
4-3. 結果	
4-3-1. 各種変異 <i>At</i> PCS1 の発現の確認	77
4-3-2. 大腸菌粗抽出液を用いた PCS 活性の測定	79
4-3-3. <i>At</i> PCS1(WT), <i>At</i> PCS1(B3)の大量精製	82
4-3-4. <i>At</i> PCS1(WT), <i>At</i> PCS1(B3)の比活性および保存安定性	83
4-3-5. <i>At</i> PCS1(WT)の 3D モデル構造	85
4-3-6. <i>At</i> PCS1(WT), <i>At</i> PCS1(B3)の SH 基の定量	87
4-3-7. <i>At</i> PCS1(WT)の結晶化条件のスクリーニング	88
4-4. 考察	89

第 5 章 *Cyanidioschyzon merolae* 由来の PCS への変異導入と酵素活性

5-1. 序	
5-1-1. <i>C. merolae</i> について	93
5-1-2. 目的	94
5-2. 実験手法	
5-2-1. 使用菌株, ベクター, 培地	94
5-2-2. 形質転換酵母の作製	96
5-2-3. スポット実験による形質転換酵母の Cd 耐性能の観察	96
5-2-4. 形質転換酵母の PC 合成量の測定	96
5-2-5. 酵母抽出液のクロマトグラム上の未知ピークの分析	97
5-2-6. 大腸菌を用いた <i>Cm</i> PCS の発現	97
5-3. 結果	
5-3-1. Cd 含有培地上での形質転換酵母の生育	100
5-3-2. BSO 添加と形質転換酵母の Cd 耐性能	106
5-3-3. 形質転換酵母の PC 合成量の測定	107
5-3-4. 未知ピークの分取精製と質量分析	111
5-3-5. tr111_338 の 3D モデル構造の作成	114
5-3-6. <i>Cm</i> PCS の大腸菌での発現	116
5-4. 考察	118

第6章 *Cyanidium caldarium* からの PCS 遺伝子の単離および機能解析

6-1. 序

6-1-1. *C. caldarium* について……………120

6-1-2. 目的……………120

6-2. 実験手法

6-2-1. *C. caldarium* の培養……………120

6-2-2. PC 合成能の検出……………120

6-2-3. Degenerate PCR……………121

6-2-4. *C. caldarium* からの total RNA 抽出, 逆転写, variant の解析……………121

6-2-5. *C. caldarium* からのゲノム DNA 抽出……………121

6-2-6. Southern hybridization……………122

6-2-7. 酵母を用いた PCS 遺伝子の活性評価……………122

6-2-8. 大腸菌を用いた大量発現系の構築……………122

6-2-9. アフィニティークロマトグラフィー精製……………122

6-2-10. CcPCS の酵素反応における最適 pH, 最適温度の検討……………124

6-2-11. CcPCS の熱安定性, 保存性, 様々な金属による活性化度合いの検討
……………124

6-3. 結果

6-3-1. *C. caldarium* の Cd 存在下での生育……………125

6-3-2. *C. caldarium* の Cd 存在下での PC 合成……………126

6-3-3. Degenerate PCR による PCS 遺伝子の増幅……………127

6-3-4. PCS 遺伝子の配列および variant の解析……………128

6-3-5. Southern hybridization によるコピー数の確認……………132

6-3-6. 酵母を用いた *in vivo* PCS 活性の確認……………133

6-3-7. 大量発現系の構築およびタンパク質の精製……………134

6-3-8. CcPCS の酵素活性……………135

6-3-9. CcPCS の熱安定性……………138

6-3-10. CcPCS の保存性……………140

6-4. 考察……………142

第 7 章 総括および総合考察.....	144
参考文献.....	148
謝辞.....	159

略語一覽

2-ME: 2-mercaptoethanol

*At*PCS1: *Arabidopsis thaliana* PCS 1

BCS: bathocuproine disulfonate

BSA: bovine serum albumin

BSO: buthionine sulfoximine

BTP: bis-tris-propane

CBB: coomassie brilliant blue

*Cc*PCS: *Cyanidium caldarium* PCS

CDF: cation diffusion facilitator

CHES: N-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid

*Cm*PCS: *Cyanidioschyzon merolae* PCS

DGPC₂: desglysyl PC₂

DIG: digoxigenin

DTNB: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediamine-*N,N,N',N'*tetraacetic acid

EXAFS : Extended X-ray Absorption Fine Structure

FPLC: fast protein liquid chromatography

γ EC: γ Glu-Cys (gamma glutamylcysteine)

GSH: glutathione

HEPES: 2-[-4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperzinyll] ethanesulfonic acid

HPLC: high performance liquid chromatography

HRP: horseradish peroxidase

HSAB: Hard and Soft Acids and Bases

IPTG: isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

I. S.: internal standard

LB medium: Luria-Bertani medium

LC: liquid chromatography

mBBr: monobromobimane

MES: 2-Morpholinoethanesulfonic acid

NBT/BCIP: nitro blue tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate

NMR: nuclear magnetic resonance

NsPCS: *Nostoc sp* PCS
ODS: octadecylsilane
PAGE: poly-acrylamide gel electrophoresis
PC: phytochelatin
PC_n: phytochelatin with n γ Glu-Cys units
PCS: phytochelatin synthase
PEG: polyethylene glycol
R²: coefficient of determination
R_t: retention time
RT-PCR: Reverse Transcription PCR
S/N: signal to noise ratio
SDS: sodium dodecyl sulfate
TFA: trifluoroacetic acid
Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane
ZIP: ZRT/IRT-like protein

第 1 章 序論

1-1. 背景

生物は、そのまわりの自然環境に巧みに適応することによって生命活動を営んでいる。自然環境の中には高温、低温、強酸、高塩、乾燥などの厳しいストレスが存在するが、生物は進化の過程で、このような各種ストレスに対して様々な防御機構を獲得してきたと考えられる。

環境中には生命活動の維持に必要な必須元素と、必ずしも必要ではない非必須元素が存在する。必須元素も非必須元素も、過剰量存在すると毒性を発揮する。必須元素には、C, N, O, S などのタンパク質を構成する基本的な元素の他に、一部の金属元素も含まれる。例えば、Co, Cu, Mn, Zn は、生体内に存在する酵素の活性部位に存在するなどして重要な働きを担うが、必要量は他の主要な必須元素に比べて僅かであり、微量必須金属と呼ばれる重金属である。重金属とは一般に比重が 4 以上の金属を示し、アルカリ金属やアルカリ土類金属、アルミニウムなどの軽金属を除いたほとんどの金属がこれに該当する。水銀(Hg)、カドミウム(Cd)、クロム(Cr)、鉛(Pb)など、工業分野で汎用されているものが多く、現代の便利な生活を営む上では欠かせない資源となっている。反面、重金属は毒性が強いものが多く、直接の暴露や、汚染した水や食物を摂取することによって体内に蓄積され、毒性を発揮する。多量の重金属に曝露されることによって引き起こされる生命活動の妨害は、重金属ストレスとして位置付けられている。

重金属の中でも、Cd は生命活動に対して非常に有害な元素として知られている。日本人の日常食からの Cd 摂取量は 1 日約 30 μg で、この約半分はコメから摂取されている。健康への影響としては、Cd を大量に経口摂取すると消化器官に対する急性毒性として、嘔吐、腹痛等が生じる。少量ながらも長期間に渡り摂取した場合の慢性毒性としては、腎障害や骨障害が引き起こされる。このような重金属の毒性があまり認識されていなかった高度成長期には、Hg による水俣病、Cd によるイタイイタイ病、鉛中毒、ヒ素中毒などが各地で起こり、重金属による汚染が社会問題となった。現在日本では、大気汚染防止法、水質汚濁防止法、土壌汚染対策法、食品衛生法などにより、Cd の排出および摂取量を規制している(浅見, 2005)。

わが国では土壌中の Cd 濃度の高い地域が多数存在する。そして近年、食の安全に消費者の関心がより一層集まるようになってきている。土壌汚染の対策として、ファイトレメディエーションの概念が広まり始めた 1990 年代の中頃から、植物の金属耐性機構における関心が急速に高まった。金属により汚染された土壌からの金属除去のために、特定金属の高集積植物の使用が提案された(Salt *et al.*, 1998)。今後来るべき食糧問題や環境問題を解決するために、生物が外的刺激やストレスに対してどのように対応するのかを、生体有機分子、タンパク質、金属などの分析を足掛かりとして解明していくことが重要であると考えられる。

1-2. 生物の重金属ストレス応答

生物は微量必須金属元素を様々な金属トランスポーターを介して細胞内に取り込んでおり、代謝、耐性などの点から様々な研究が展開され、多種の重金属トランスポーターファミリーが同定されている。そのようなトランスポーターには特有の金属結合モチーフが存在するものもあり、ファミリーによる金属特異性を規定している(Sasaki *et al.*, 2002)。Cd は海産藻類において必須性が示されているだけで(Lane *et al.*, 2000)、その他の生物にとっては必須元素ではないため、Cd の細胞内への取り込みに関する研究はあまり進んではいない。Cd は Ca や Fe と近いイオン半径を持つため、これらの必須金属元素のトランスポーターを介して細胞内に流入するものと考えられている(Tsien *et al.*, 1987; Lopez *et al.*, 1989)。また、哺乳類細胞においては Mn のトランスポーターを介して Cd が細胞内に流入する例が観察されている(Himeno *et al.*, 2002)。

微量必須元素である Zn は生体内でイオンとなって存在し、硫黄(S)、窒素(N)、酸素(O)を配位原子とするリガンドと高い親和性を持つ。この性質によって様々な酵素の活性中心となり、生命の恒常性維持に寄与している。対して、毒性の高い元素である Cd イオンは、チオール基(-SH)と親和性が高いために、本来 Zn イオンが結合すべき部位に結合し、酵素活性を失わせる。これが Cd の毒性の由来の一つであると考えられている。Cd の毒性機構としては、他にも DNA 塩基のミスマッチ修復機構に関わるタンパク質の活性を阻害することが知られており(Cynthia *et al.*, 2003)、それによる DNA 配列への変異や構造の破壊は生物にとって深刻な問題である。また Cd は Cu(I)や Fe(II)と置換し、生じた Cu(I)や Fe(II)アコイオンが酸素ラジカルの生成を促進することも知られており、反応性の高いラジカル種が生体の酸化ストレスとなり悪影響を及ぼしている(Muñoz *et al.*, 2008)。動物においては、Cd はオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ(OCTase)に結合して酵素の活性を失わせ、アンモニアの解毒を阻害することが報告されている(Aoki *et al.*, 1988)。

Cd をはじめ重金属のストレスに対し、生物は様々な防御機構を進化的に獲得してきた(Hall, 2002)。毒性のある金属に対して生物が示す反応として、金属の流入・排出を制御する機構が挙げられる。例としては、金属を細胞壁に吸着させる、または細胞膜の構造変化を起こして金属の細胞内への流入を減らす、逆に細胞内から細胞外へとポンプにより排出するといった機構が存在する。実際に、細胞壁を欠失させた緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* では Cd に対する感

受性が高くなり(Davies *et al.*, 1971), ミドリムシ *Euglena gracilis* では Cd の曝露に対して細胞膜に結合する糖鎖の組成が変化していることが知られており(Bonaly *et al.*, 1994), キュウリ *Cucumis sativus* の根には MgATP 依存性のトランスポーターにより体内の有害金属を排出する機構が発見されている(Burzynski *et al.*, 2005). このような細胞内の金属濃度を抑制する防御機構に対して, 細胞内に侵入してきた金属に対して応答する防御機構の一つに, 重金属イオンを捕捉して毒性を緩和する, キレーター物質の誘導合成が挙げられる. Cys に富んだ比較的 low molecular weight のタンパク質であるメタロチオネイン(Metallothionein, MT), Cys を含み, 生体内の還元的環境を保つはたらきもあるグルタチオン(Glutathione, GSH), GSH の重合したファイトケラチン類(Phytochelatin, PC)などがよく知られている.

哺乳類における MT の誘導合成に関しては, 遺伝子まで含めてこれまで多くの研究報告があり, MT は Cd 耐性に関与することが証明されている(Hamer, 1986). MT の特徴として, 分子量がおよそ 6,000~7,000 のタンパク質であること, 熱に安定であること, 約 30%の Cys を含み, アミノ酸配列に Cys-Xaa-Cys や Cys-Xaa-Xaa-Cys といった特徴的な金属結合モチーフを持つことなどが挙げられる. MT の金属結合様式は一般的に, Cd などの金属 7 原子が, Cys-Xaa-Cys といった配位部位にクラスターを形成して結合する(Hamer, 1986). 一方, 高等植物にはそのゲノム上に MT と同様の高い配列の存在が知られているが, これによりコードされるタンパク質の存在および生物学的意義については明らかになっていない.

高等植物においても Cd 解毒機構の研究が進められ, そのほとんどが PC に依存していることが知られている(Cobbett and Goldsbrough, 2002; Mendoza-Cozatl *et al.*, 2005). PC は $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Xaa}$ の一般式で表記される非タンパク質性のペプチドである(Fig. 1-1). n はおよそ 2~5 の値をとり, 一般に Xaa は Gly で構成されるが, $\beta\text{-Ala}$, Glu, Gln, Ser などで構成されるものや, Xaa が欠如したものも存在する(iso-PC) (Rauser, 1995). PC は分裂酵母で最初に発見され(Kondo *et al.*, 1985), その後高等植物で発見された(Grill *et al.*, 1985). PC は様々な Cd, Cu, Pb, Hg などの重金属イオンや, As, Sb といった半金属イオンへの曝露により細胞質において誘導合成され, *in vivo* でこれらの有害イオンと複合体を形成する(Maitani *et al.*, 1996; Schmoger *et al.*, 2000). シロイヌナズナの変異株(Δcad1 , Δcad2)は PC 合成能を欠いており, Cd に対して感受性が高いことから, PC 合成が Cd の解毒に関与していることが示されている(Howden *et al.*, 1995). また, 分裂酵母では PC-Cd 複合体が *HMT1* (heavy metal

tolerance 1)によりコードされる ATP-binding cassette (ABC) transporter により液胞へと輸送される (Ortiz *et al.*, 1995). これは, Cd を細胞質から隔離して, 毒性緩和を増強しているものと推定される (Fig. 1-2).

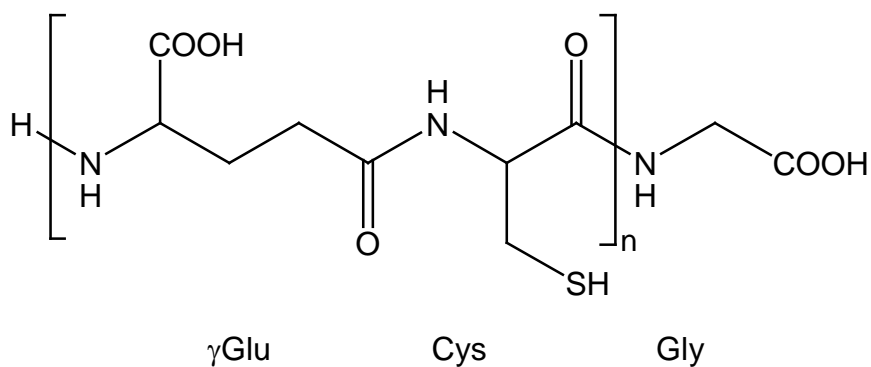


Fig. 1-1 ファイトケラチン(PC)の構造式 ($n \geq 2$, $n=1$ のときは GSH に相当)

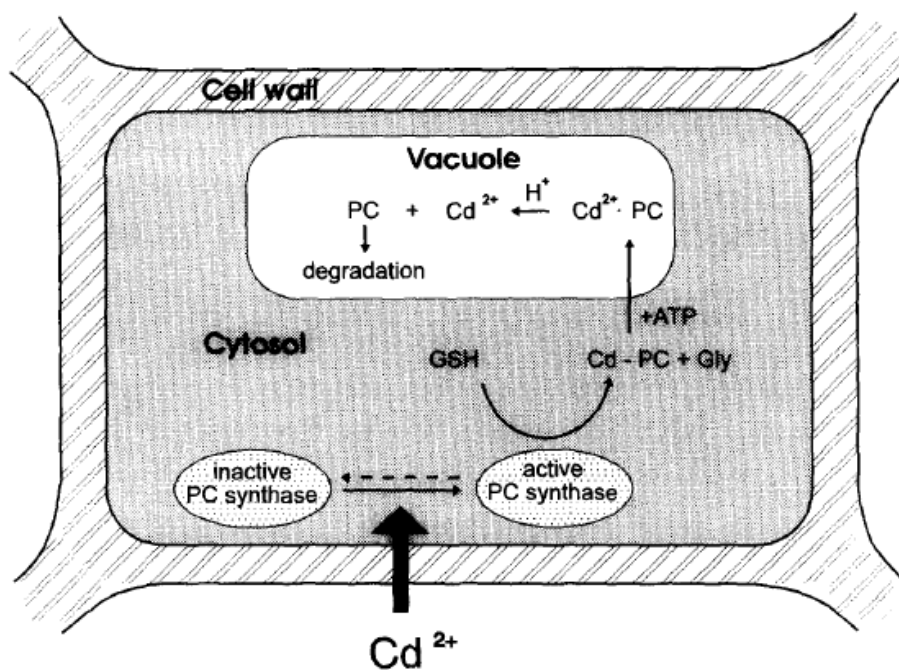


Fig. 1-2 PC による Cd の毒性緩和機構の概要図 (Zenk M. H., 1996 *Gene* 179, 21-30 より引用)

1-3. グルタチオンとファイトケラチンの Cd への配位について

GSH は細胞内に数 mM オーダーの濃度で存在し、細胞内の還元的環境を保ち、有害なラジカルや活性酸素種から生体を保護するのに役立っている(Pompella *et al.*, 2003). Cd(II)は H₂O が配位している場合はその配位数は 6 であるが、原子半径の大きな S 等が配位した場合にはその配位数は 4 となる(配位子置換反応). Cd と GSH は 1:1 もしくは 1:2 で結合する. Cd 濃度と比較して GSH 濃度が大きい場合は、1:2 の complex が溶液中で大部分を占める. GSH は中性 pH において、分子内のカルボキシル基は負に帯電しており、SH 基とこのカルボキシル基で Cd とのキレート錯体を形成していると考えられる(Leverrier *et al.*, 2007).

PC_n は、 γ Glu-Cys 構造の繰り返し数が多くなるほど Cd をキレートする能力が大きくなる. PC と Cd 複合体の構造は EXAFS によって解析がなされており、これは Fig. 1-3 で示したように SH 基の部分でのみ PC と結合し、カルボキシル基の部分は外側に配向して複合体分子の溶解性などに寄与しているというものである(Strasdeit *et al.*, 1991). このように、GSH の重合によって Cd のキレートに使用される配位子が変化することで分子としての親和性も大きくなるため、PC を合成することは Cd の解毒において、生体にとって有益であると考えられる(Zenk, 1996).

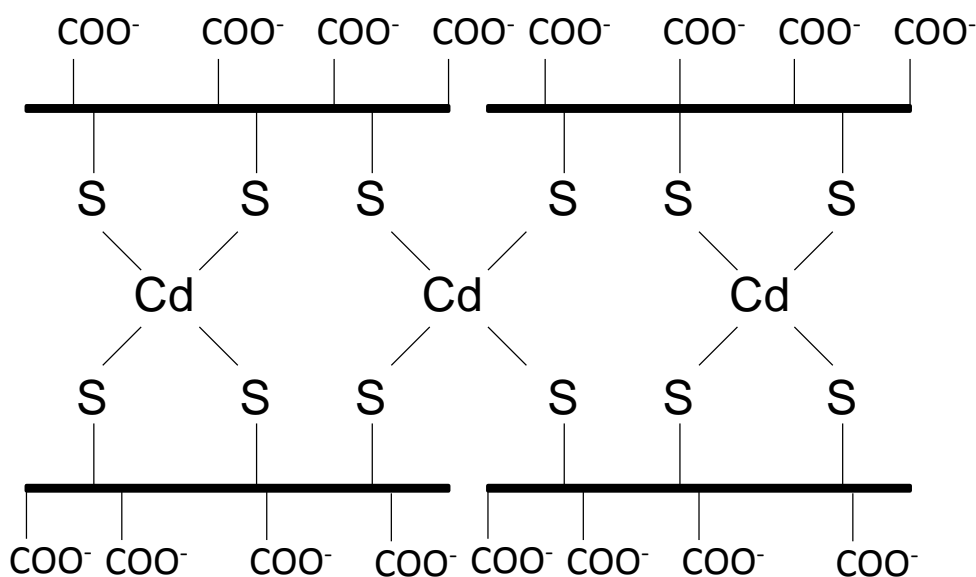


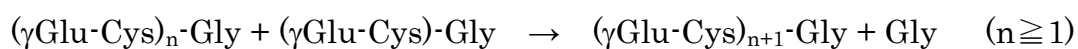
Fig. 1-3 Cd₃-(PC₃)₄ 複合体の構造の模式図

(Strasdeit *et al.*, 1991 *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **16**, 1129-30 図を改定)

1-4. ファイトケラチン合成酵素(PCS)について

PCは γ -グルタミル結合を有しており、リボソームによる合成ではなく、ファイトケラチン合成酵素(Phytochelatase synthase, PCS; EC 2.3.2.15)によって合成される。PCSは今から20年以上前に、シラタマソウ(*Silene cucubalus*)の培養細胞から初めて単離され(Grill, *et al.*, 1989), その後, 分裂酵母(Yoshimura *et al.*, 1990), トマト(Chen *et al.*, 1997), シロイヌナズナ(Howden *et al.*, 1995), エンドウ(Klapheck *et al.*, 1995)でも同様の酵素が存在することが明らかとなった。PCSは細胞質に存在し, 細胞内に流入してきた重金属に反応して直ちにPC合成反応が開始される(Zenk, 1996).

PCの合成反応は次式に示すように, グルタチオン(GSH, γ Glu-Cys-Gly)または既に合成されたPCを基質として行われる。すなわち, PCSは γ -glutamyl-cysteine dipeptidyltransferase 活性を有する(Grill *et al.*, 1989)。この活性発現には, 重金属の存在が必須のものとなっている(Oven *et al.*, 2002)。



一方, PCS自身の合成は重金属による制御を受けない。高等植物ではPCSが恒常的に発現しており, 重金属に曝露されたときのみPCSが活性化される。しかし, この重金属による活性化機構は, PCSの発見から20年以上経過した現在においても完全には解明されていない。

PCSをコードする遺伝子は, これまでに高等植物ではシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*, AtPCS) (Vatamaniuk *et al.*, 1999), コムギ(*Triticum aestivum*, TaPCS) (Ha *et al.*, 1999), ダイズ(*Glycine max*, GmPCS) (Oven *et al.*, 2002), セイヨウカラシナ(*Brassica juncea*, BjPCS) (Heiss *et al.*, 2003)などで同定されている。藻類においては, 好熱性の紅藻であるシアニディオシゾン(*Cyanidioschyzon merolae*, CmPCS) (Osaki *et al.*, 2008), 微生物においては, 分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*, SpPCS) (Clemens *et al.*, 1999)でもその配列が明らかになっている。ゲノムプロジェクトの結果, 線虫(*Caenorhabditis elegans*, CePCS)においてもPCSに相同性の高い配列の存在が示され, これが実際にPCSとして機能していることが示されている(Clemens *et al.*, 2001; Vatamaniuk *et al.*, 2001)。すなわち, PCによる重金属解毒機構は植物に特有のものでなく, ある種の微生物や動物においても機能している。種々

の生物種における PCS のアミノ酸配列は、Fig. 1-4 に示したように N 末端側領域(N ドメイン)で高度な相同性を示す。一方、C 末端側領域(C ドメイン)は極めて可変的であるが、Cys 残基に富み、その配列には金属結合モチーフに特徴的なものがみられる。さらに、原核生物においても PCS に類似した配列の存在が知られている。シアノバクテリア *Nostoc* sp. PCC7120 に由来する alr0975 遺伝子によりコードされるタンパク質 NsPCS は、高等植物の PCS の N ドメインに相当する部分だけを有しており、PCS 活性がないか、あるいはきわめて弱い。alr0975 は *Nostoc* 細胞中では恒常的に発現しておらず、重金属の存在下でも誘導的に発現されることもないため、偽遺伝子であると考えられている (Harada *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2004)。

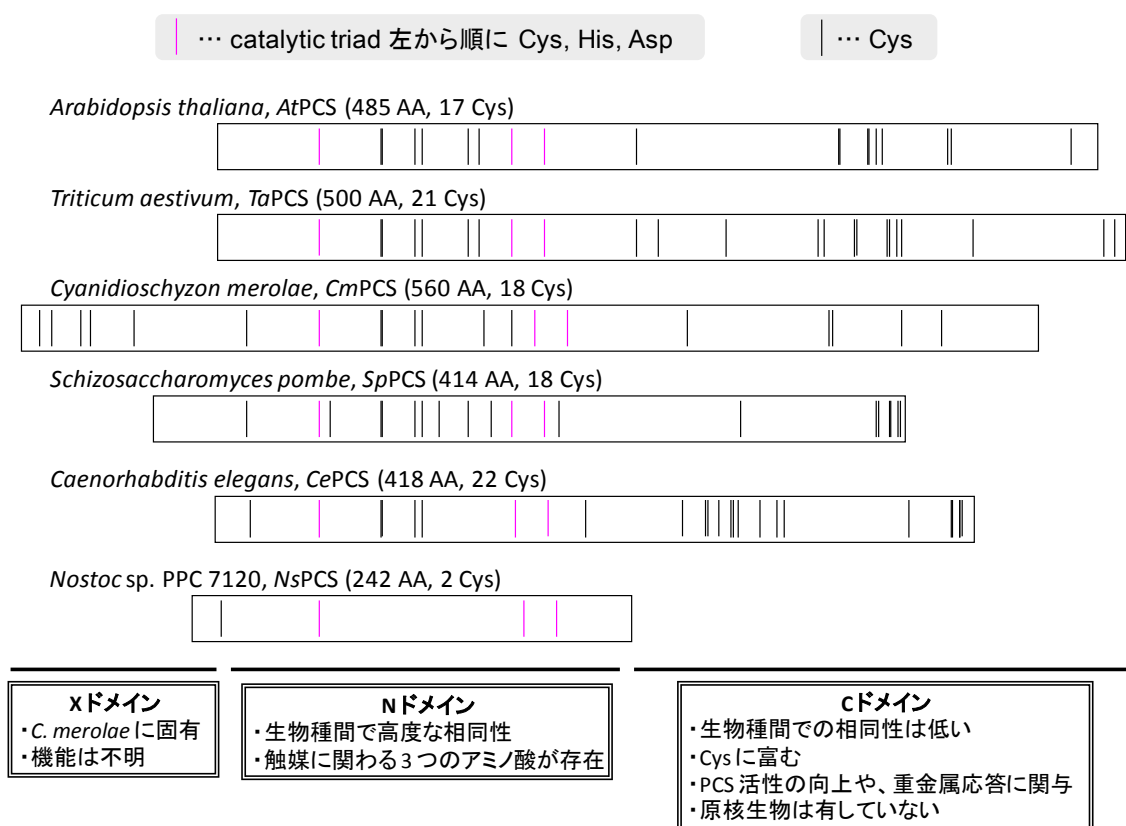
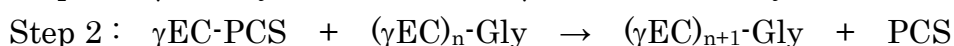


Fig. 1-4 生物種間での PCS のアミノ酸配列比較

活性に必要な3つの残基(catalytic triadを構成、左から順に Cys, His, Asp)をそれぞれピンク色の棒で、それ以外のすべての Cys を黒色の棒で示した。

PCS による PC の合成は、次の 2 段階反応で生じると考えられている。基質である GSH からの Gly の解離に伴う γ Glu-Cys-PCS アシル中間体(γ EC-PCS) の形成反応(Step 1), 次に, γ EC-PCS から受容 GSH(または PC_n)への γ EC 基の転移反応(Step 2)からなっているとされている。



Step 1 の γ EC によるアシル化は重金属の存在の有無にかかわらず生じる (Vatamaniuk *et al.*, 2004). また, *At*PCS1 の N ドメインに存在する Cys⁵⁶, His¹⁶², Asp¹⁸⁰ が触媒活性に直接関与するアミノ酸残基として, また Cys⁵⁶ の SH 基がアシル化部位として同定された (Romanyuk *et al.*, 2006). この 3 つのアミノ酸は, 現在までに確認されている種々の生物の PCS に高度に保存されている。また Cys⁵⁶ の他にもアシル化される部位が存在し, この部位のアシル化には Cd の存在が必須となることが示されている (Vatamaniuk *et al.*, 2004). 一方で *Ns*PCS は, 真核生物の N ドメインと 22-36% の相同性しか示さないが, アシル化の核となる触媒ドメイン (Cys⁷⁰, His¹⁸³, Asp²⁰¹) を有している (Rea *et al.*, 2004; Ruotolo *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2005). このような背景の中, *Ns*PCS の天然型と, γ EC 基によりアシル化された状態での立体構造が報告された (Vivares *et al.*, 2005). これは, 有効な PCS の構造情報が得られてこなかった中で初の結晶構造となった。

一方, Step 2 におけるアシル中間体から GSH への γ EC 基の転移反応では C ドメインの重要性が示唆されている。 *Ns*PCS の反応における主要な生成物は γ EC と Gly であり, PCS として完全なものではない。 *Ns*PCS では, 形成されたアシル中間体が加水分解反応を受け, γ EC 基を放出していると考えられる。また, *At*PCS1 においては, その C ドメインが一部欠落すると Cd 依存性の PC 合成能が減少し, また酵素の金属依存性の活性化パターンも変化する。したがって, C ドメインは PCS の活性を高めるほかに, 広範囲の重金属に対するセンシングの役割を担っているのではないかと考えられている (Ruotolo *et al.*, 2004).

Step 2における重金属の役割については意見が分かれる。Vatamaniukらは、重金属は GSH と結合し、この複合体(Cd-(GSH)₂)が酵素反応の基質となる、という説を出している(Vatamaniuk *et al.*, 2000)。その根拠として、

- (1) PCS と Cd との結合定数が GSH と Cd との結合定数より小さいこと。
- (2) GSH の SH 基を CH₃ 基などで誘導体化した *S*-alkylated GSH を基質として PCS と反応させると、重金属非存在下で酵素反応が進行すること。

が挙げられる。一方、Cd が直接 PCS に結合することで、酵素分子の構造を活性型へと変化させる機構も推定されている。この根拠として、

- (1) PCS は多種類の金属イオンで活性化されるが、*At*PCS1に見られるようにその C ドメインを一部欠失した場合、金属による酵素活性化のパターンが異なること(Ruotolo *et al.*, 2004)。
- (2) C ドメインには Table 1-1 に示す典型的な金属結合モチーフが見られること。

が挙げられる。現在までのところ、いずれの機構によるのか明確な解は得られていない。

Table 1-1 各生物種の PCS の C ドメイン中に存在する金属結合モチーフの数

	Cys-Xaa-Xaa-Cys	Cys-Xaa-Cys	Cys-Cys	Cys
<i>At</i> PCS1(C)	1	1	2	2
<i>Ce</i> PCS(C)	2	0	2	2
<i>Cm</i> PCS(C)	0	1	0	3
<i>Sp</i> PCS(C)	3	0	0	1
<i>Ta</i> PCS(C)	2	0	2	6

また、Table 1-2 に示したように、*At*PCS1 は多種類の重金属、半金属イオンで活性化されることがわかっている(Oven *et al.*, 2002)。これらは周期表において、第 11~15 族の第 4~6 周期に位置する。ゆえに、それぞれのイオンの化学的性質は多様である。例えば、Cd は HSAB(Hard and Soft Acids and Bases) 則でソフトな金属イオンに分類され、S を配位原子とした配位子と結合しやすいのに対し、Zn はソフト金属とハード金属の中間に位置し、N を配位原子とした配位子との親和性が高い。このように、化学的性質が様々に異なるイオンが、PCS の活性化という一つの機能を発揮することに対する明確な理由は提示されていない。

Table 1-2 *At*PCS1 を活性化する金属など

周期\族	11	12	13	14	15
4	Cu	Zn	Ga	Ge	As
5	Ag	Cd	In	Sn	Sb
6	Au	Hg	Tl	Pb	Bi

1-5. 本研究の目的および概要

前述のように、PCS の活性化機構や構造に関しては未だ不明な点が多い。本研究では以下の 3 点を念頭に置き、酵素学的な解析、ドメイン・アミノ酸レベルでの解析、さらには立体構造レベルでの解析を目指し、PCS の構造と機能を解明することを目的とした。

(1) Cd は PCS と結合することによって、酵素の活性化に寄与しているのか、それとも酵素は常に活性化状態にあり、Cd-(GSH)₂ 複合体が PCS の基質となっているのか。

(2) PCS の機能には、各ドメインやアミノ酸がどのように寄与しているのか。

(3) PCS の立体構造解析に用いることができるような、安定性が高く十分量のタンパク質が得られる発現系を構築できないか。

第 2 章では、PCS の反応産物である PC 類を分析するための分析系の高感度化を試みた。そして、この分析系を PCS 活性の測定に適用した。

第 3 章では、*Arabidopsis thaliana* 由来の PCS(*AtPCS1*)を用いて、様々な条件下での酵素活性測定を行った。酵素の動力学的パラメーターおよび、反応に関与する因子間の結合定数などを考慮に入れ、PCS の活性化機構を考察した。

第 4 章では、*AtPCS1* の Cys に着目し、様々な変異タンパク質を作製して活性評価を行うことで、N、C ドメイン中に存在する Cys の PCS 活性への寄与を考察した。同時に、安定性の高い *AtPCS1* 変異体を取得することを試みた。

第 5 章では、*Cyanidioschyzon merolae* 由来の PCS(*CmPCS*)をモデルとし、ドメインへの変異導入と酵素活性への影響を明らかにし、各ドメインの PCS 活性への寄与を考察した。

第 6 章では、好熱性の紅藻 *Cyanidium caldarium* から、タンパク質としての安定性の高いことが期待される PCS 遺伝子を単離し、大量発現系の構築を試みた。また、この PCS(*CcPCS*)の種々の金属での活性化の程度や、保存安定性についても検討した。

第 2 章

HPLC ソフト金属キレーター分析の条件最適化による高感度化

およびファイトケラチン合成酵素の活性評価系の検討

2-1. 序

2-1-1. ファイトケラチン類の検出方法

生物の重金属ストレス応答について研究を進める上では、誘導合成されるキレーター物質を高感度で検出・定量する測定系が必要不可欠である。配位子の中で、複数の配位原子を介して金属イオンと結合する分子をキレーターという。単一の原子で結合する配位子と比べ、キレート錯体は格段に高い安定度定数を有しており、これをキレート効果と呼ぶ。金属イオンとキレーター物質の化学的親和性は、HSAB(Hard and Soft Acids and Bases)則を用いて説明できる。これは、金属イオンを Lewis 酸、配位子を Lewis 塩基とし、これら相互の相性を、硬い、軟らかい、という表現を用いて示したものである。硬い酸は硬い塩基と親和性が高く、軟らかい酸は軟らかい塩基と親和性が高い。HSAB 則に基づいて金属イオンと配位子を分類したものを Table 2-1 に示した。硬い酸とは、イオン半径が小さく(価数が大きく)分極しにくいイオンであり、軟らかい酸とはイオン半径が大きく(価数が小さく)分極しやすいイオンである。アルカリ金属、アルカリ土類金属などは硬い酸の代表であり、重金属は軟らかい酸に分類されるものが多い。Cd(II)イオンは軟らかい酸(ソフト金属イオン)に分類され、表に示したような軟らかい塩基と安定な錯体を形成することが知られている。

Table 2-1 HSAB 則に基づいたイオンの分類 (齋藤太郎「無機化学」, 岩波書店)

	Hard	Intermediate	Soft
Acids	H ⁺ , Li ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Be ²⁺ Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Al ³⁺ , Ti ⁴⁺ Cr ³⁺ , Fe ³⁺ , BF ₃ , Cl ⁷⁺	Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺	Cu ⁺ , Ag ⁺ , Au ⁺ Tl ⁺ , Cd ²⁺ , Hg ⁺ , Hg ²⁺ Pd ²⁺ , Pt ²⁺ , Pt ⁴⁺
Bases	NH ₃ , H ₂ O, R ₂ O F ⁻ , OH ⁻ , O ²⁻ NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , PO ₄ ³⁻	N ₃ ⁻ , N ₂ , NO ₂ ⁻ Br ⁻ SO ₃ ²⁻	H ⁻ , CN ⁻ , R ^{-*} I ⁻ PR ₃ , SR ₂ , CO

*R は炭化水素基

生物は多種類のキレーターを生産しており、生体内での金属イオンの挙動を調べるためにはこれらキレーターの選択的分析が必要である。Cd(II)イオンに対するキレーターは、S原子を配位子とするものが親和性が高いと考えられる。実際に、高等植物ではSを豊富に含むペプチドであるGSHやPCが機能していることが分かっている。GSHが重合してPCとなると主にSH基がキレートに用いられ、Cd(II)との親和性が上昇する。

これらのペプチドの定量方法は、各分子がSH基を含有していることを利用しているものが多い。SH基を標的にした検出方法は多く存在するが、PC類の分析において現在汎用されているものは次の2つである。ひとつは5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)を用いた方法で、測定試料を逆相HPLCで分離した後、DTNBを含むポストカラム溶液と混合して生じた5-mercapto-2-nitrobenzoic acidを比色定量する(Fig. 2-1) (Grill *et al.*, 1987; De Knecht *et al.*, 1994)。ポストカラム法であるために簡便で、コストが低いことが利点であるが、GSHの検出限界が0.3 nmol/injectionと大きい。もうひとつは、蛍光試薬 monobromobimane (mBBr)によりSH基を誘導体化した後、逆相HPLCで分離して蛍光検出を行うプレカラム法である(Fig. 2-2) (Newton *et al.*, 1981; Ahner *et al.*, 1994)。この方法は、同検出限界が0.3 pmol/injectionと小さく、また誘導体が非常に安定であることが知られている。しかしながら、mBBrの蛍光試薬は高価であること、mBBrの加水分解物が夾雑ピークとして現れるためにピークの同定が困難となる場合があること、一つひとつの測定試料ごとに煩雑な蛍光誘導体化処理が必要であることが欠点である(Table 2-1)。また、DTNB、mBBrともに、分子内のSH基が多くなるほど誘導体化効率が低下することが知られている(Sneller *et al.*, 2000)。

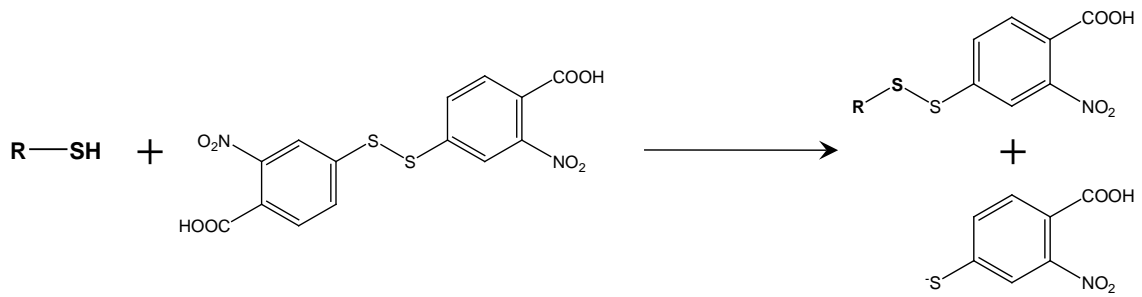


Fig. 2-1 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) を用いた SH 基の定量

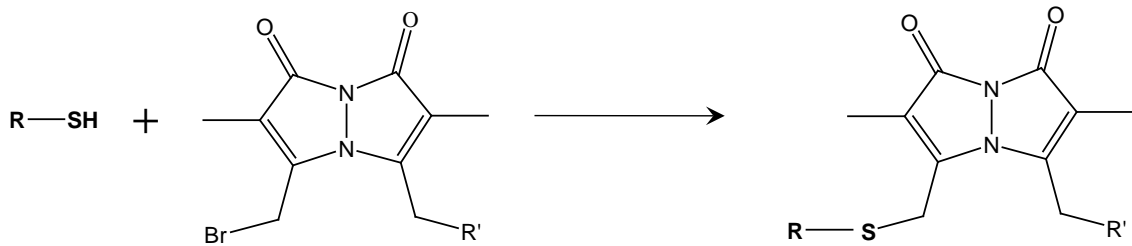


Fig. 2-2 monobromobimane (mBBr) を用いた SH 基の蛍光誘導化

Table 2-1 DTNB, mBBr の特徴

	derivatization method	
	DTNB	mBBr
検出法	比色 (412 nm)	蛍光 (380/470 nm)
感度(GSH)	0.3 nmol	0.3 pmol
操作	ポストラベル(簡便)	プレラベル(煩雑)
コスト	低い	高い

2-1-2. BCS を用いたソフト金属キレーター分析の原理

Bathocuproine disulfonate(BCS) (Fig. 2-3) は微量の Cu(I)の定量に汎用される蛍光試薬である。BCS の蛍光は Cu(I)と複合体を形成することで消光し、橙黄色の錯体を形成する。この反応を利用して Cu(I)を比色定量する。これは Cu(I)に特異的な反応であり、その他の金属 Cu(II), Fe(III), Fe(II), Mn(II), Zn(II), Co(II), Cd(II), Ni(II) によって BCS の蛍光強度は影響を受けない。逆に、消光した BCS-Cu(I) 複合体が解離すると、BCS の蛍光が回復する。Cu(I)はソフト金属に分類されるため、この現象は HPLC ポストカラム法によるソフト金属キレーターの分析に応用することができた(Sirabe *et al.*, 2008)。すなわち、試料を逆相 HPLC で分離後、消光した状態の BCS-Cu(I) 複合体を含むポストカラム溶液と混合する。ソフト金属キレーターが溶出されると、キレーターと Cu(I)が結合することにより、BCS-Cu(I) 複合体が解離して BCS の蛍光が回復する(Fig. 2-4, なお、既に金属イオンをキレートしている PC の場合でも、酸性条件下で逆相 HPLC により分離後には金属イオンと解離しているものと考えられる)。これを蛍光検出器で記録することにより、ソフト金属キレーターを検出・定量することができる。

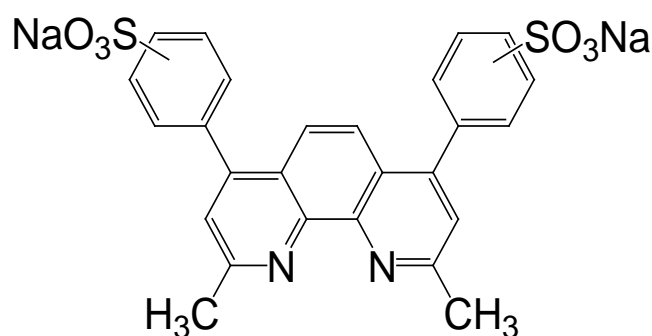


Fig. 2-3 BCS の構造式

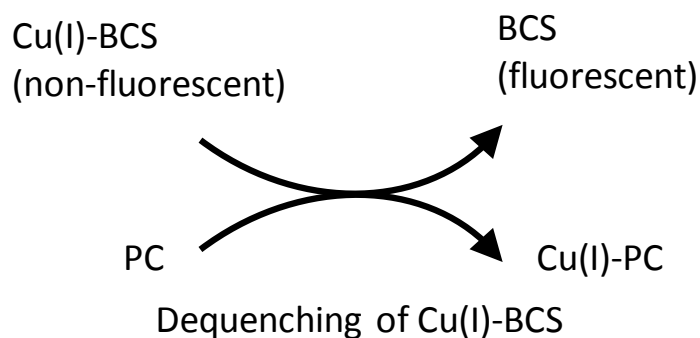


Fig. 2-4 BCS の蛍光回復反応の概念図

2-1-3. 目的

PCS の酵素活性測定において、酵素活性値(初速度)を正確に測定するためには反応中の基質量の減少を抑えること、また反応産物が系に及ぼす影響を抑えることが重要である。そのためには反応に使用する酵素量を減少させる必要があるが、酵素量の減少に伴い反応産物の量も減少するため、高感度の PC 分析法の開発が望まれる。現在のところ、PCS の活性測定には DTNB を用いたポストラベル法が主に用いられている。PCS の酵素反応液中には、基質としての GSH が高濃度含まれているため、逆相 HPLC にて PC と GSH を分離後、DTNB により SH 基特異的な分析が行われている。mBBr によるプレラベル法は、蛍光検出を用いているために高感度の PC 分析が可能である。しかしながら PCS の酵素反応液には基質として GSH が高濃度含まれているために、プレラベル法による測定は不可能である。また、mBBr と SH 基の反応速度は遅いため、ポストラベル法へ適用することもできない。

このような状況のもと、当研究室では BCS を用いた PC 類の分析方法を開発した。本法はポストカラム法であるので簡便であり、その検出感度は DTNB 法に比べて 100 倍以上高いものであった。しかしながら mBBr 法には及ばないために、分析条件を最適化することで、検出感度をさらに向上させることを試みた。

2-2. 実験手法

2-2-1. 試薬

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, L-アスコルビン酸, トリフルオロ酢酸 (TFA) は和光純薬工業から, CHES はナカライテスクから, BCS, L-glutathione は Sigma Aldrich から, CH_3CN , CH_3OH は国産化学からそれぞれ購入した. TFA, CH_3CN , CH_3OH については HPLC グレード, それ以外の試薬については特級の製品を使用した. また PC_2 , PC_3 , PC_4 は林化成から購入し, 0.1% TFA により 10 mM に調製した後に小分けにして -80°C で保存した. 標品の劣化を防ぐため, 凍結融解は 2 回以上行わないようにした.

2-2-2. BCS の励起・蛍光波長の測定

FP-6500 Fluorescence spectrometer (JASCO) を用い, 50 μM BCS, 25 mM CHES-NaOH (pH 10.0), 500 μM アスコルビン酸, 0-50 μM CuSO_4 を含む溶液で行った. なお, 実際の HPLC においては溶離液中に有機溶媒である CH_3CN , CH_3OH が存在するため, これらを数%添加した場合の蛍光への影響も検討した.

2-2-3. HPLC 装置

カラムは逆相カラムである TSKgel ODS-80T_M 4.6 mm ϕ \times 150 mm (東ソー) を, 測定装置はすべて JASCO の製品を使用した. プレカラムのポンプは PU-1580, ポストカラムのポンプは PU-980, 蛍光検出器は FP-920 を使用した. 移動相には 5-20% CH_3CN with 0.1% TFA 溶液または 8-25% CH_3OH with 0.1% TFA 溶液を用いた. 試料は 20 μL 注入し, 流量は 1.0 mL/min, カラム温度は 37°C , 検出は Ex/Em = 280/395 nm で行った. ポストカラムの反応コイルは 250 μm ϕ \times 1.0 m の条件を用いた. HPLC 装置の概略図を Fig. 2-5 に示す.

2-2-4. ポストカラム溶液の調製

実験においては BCS の濃度や BCS/Cu の比率などの条件をいくつか検討したが, 結果として最適化された組成を示す. 50 mM CHES-NaOH (pH 10.0), 0.5 μM BCS, 0.2 μM CuSO_4 , 5 μM アスコルビン酸. 調製方法(ポストカラム溶液 1 L あたり)は, まず 10 mM アスコルビン酸 500 μL と 1 mM CuSO_4 200 μL を混合し, Cu(II)を Cu(I)へと還元させた. そこに 5 mM BCS 溶液を 100 μL 混合して数分間おいた後に, 十分脱気した CHES バッファーに加えた. 調製した溶液は遮光し, 測定中は常に He をバブリングしながら攪拌することにより溶液の還元状態を保ち, 調製後 1 日以内に使用した.

2-2-5. 生物試料の調製

生物試料として、国立環境研究所より分与された原始紅藻 *C. merolae* 10D 株の抽出液を用いた。培養には Table 2-2 に示した M-Allen 培地を用いた。Solution I~III はオートクレーブ、Solution IV は濾過滅菌を行い、滅菌水に無菌的に混合することで培地を調整した。37°C、光量 32 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 、100 rpm で振盪培養し、生育は OD₇₅₀ を指標とした。

OD₇₅₀=1.0 の *C. merolae* 培養液に対して、CdSO₄ を終濃度 0 および 1 mM となるように添加し、Cd に 2 h 曝露した。その後細胞を遠心分離(1,500×*g*, 15 min, 4°C)により回収し、細胞 1 U(*)あたり 380 μL の 0.1% TFA に懸濁し、氷冷しながら超音波破碎(U200 Control instrument, Ika Labortechnik; Cycle 0.6, Amplitude 50%)を 30 sec×2 回行った。遠心分離(22,000×*g*, 5 min, 4°C)により細胞残渣を分離した上清に、1 M HClO₄ を終濃度 0.05 M となるように加え(1/19 vol.)、ポアサイズ 0.22 μm のメンブレンフィルター(Millipore)を通して沈殿物を除いた。得られた溶液 20 μL を HPLC によって分析した。
(*OD₇₅₀ = 1.0 の培養液 1 mL から得られる細胞量を 1 U とする)

2-2-6. PCS の活性測定

PCS のモデル酵素として使用した rAtPCS1 の発現、精製および酵素活性測定の詳細な手法については 3-2-1~3-2-3 に示した。ここでは本章の実験における条件を示す。酵素活性は PC₂ の合成量によって評価した。100 μL の酵素反応液(200 mM HEPES-NaOH (pH 8.0), 10 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM GSH, 50 μM CdSO₄) に rAtPCS1 (recombinant AtPCS1) を 1-500 ng/mL となるように加えたものを、35°C、15 min インキュベートした後、25 μL の 10% TFA を加えて迅速に混和し、氷上で冷却することにより反応を停止させた。反応終了液を適当な PC₂ 濃度になるように 0.1% TFA で希釈して HPLC によって分析した。HPLC の移動相には 5% CH₃CN with 0.1% TFA を用い、ポストカラム溶液の組成は、結果として最適化されたものを採用した。

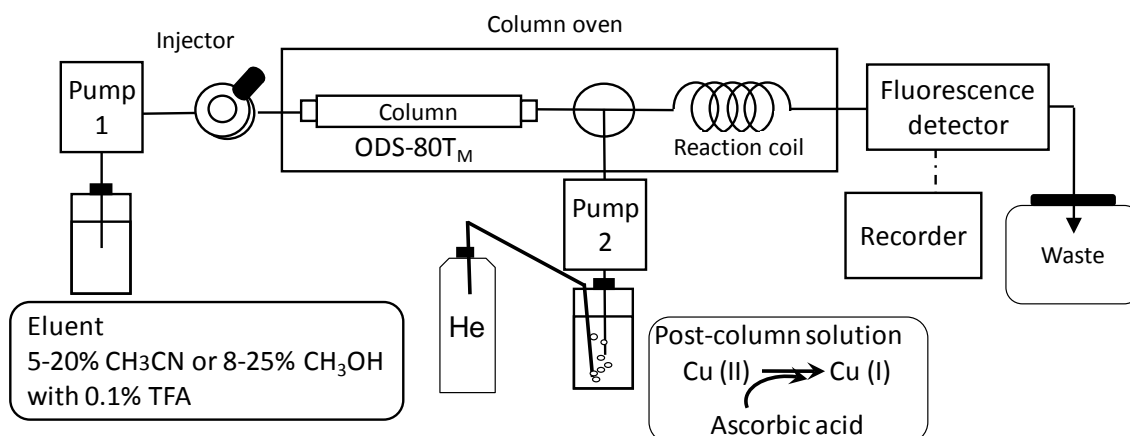


Fig. 2-5 HPLC 装置の概略図

Table 2-2 M-Allen 培地の組成 (adjusted to pH 2.5)

SolutionI (10×major salts)	Stock conc.(Final conc.)	試薬量
(NH ₄) ₂ SO ₄	400 mM (40 mM)	52.4 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	40 mM (4 mM)	9.86 g/L
*A6 minor salts conc. H ₂ SO ₄	10× (1×)	1/50 vol. 3/1000 vol.
<hr/>		
SolutionII (100×Pi)		
KH ₂ PO ₄	400 mM (4 mM)	54.4 g/L
<hr/>		
SolutionIII (1000×Ca)		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 M (1 mM)	147 g/L
<hr/>		
SolutioIV (250×Fe)		
FeCl ₃ ·6H ₂ O	25 mM (0.1 mM)	6.76 g/L
Na ₂ EDTA conc. H ₂ SO ₄		7 g/L a few drops
<hr/>		
*A6 minor salts (500×)		
H ₃ BO ₃	50 mM (100 μM)	3.09 g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	15 mM (30 μM)	2.97 g/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.25 mM (4.5 μM)	0.544 g/L
ZnCl ₂	0.75 mM (1.5 μM)	0.102 g/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.3 mM (0.6 μM)	0.0714 g/L
CuCl ₂	0.3 mM (0.6 μM)	0.0403 g/L

2-3. 結果

2-3-1. BCS の励起・蛍光波長の再検討

BCS の検出波長をこれまで(Sirabe *et al.*, 2008)は文献に記載の $Ex/Em = 580/770 \text{ nm}$ に設定していた(Rapisarda *et al.*, 2002)が、これは有機化合物の励起、蛍光波長としては長波長側であり、励起波長と蛍光波長の差も一般的な蛍光物質と比べて大きい。3次元蛍光スペクトルを測定したところ(Fig. 2-6)、文献値は本来の励起・蛍光波長ではなく、蛍光検出器の回折格子の特性によって生じる2次光のものであることが明らかとなった。本来の(1次光の)励起・蛍光波長は、 $Ex/Em = 285/395 \text{ nm}$ であった。HPLCによる分析時にこの波長条件を適用することによって蛍光強度は増大したが、本法は一定のバックグラウンドの中で、BCSの蛍光回復を検出する原理のポストカラム法であるため、同時にバックグラウンドも上昇し、S/Nの向上には至らず感度は上昇しなかった。このため、他の条件を検討することが必要であると考えられた。

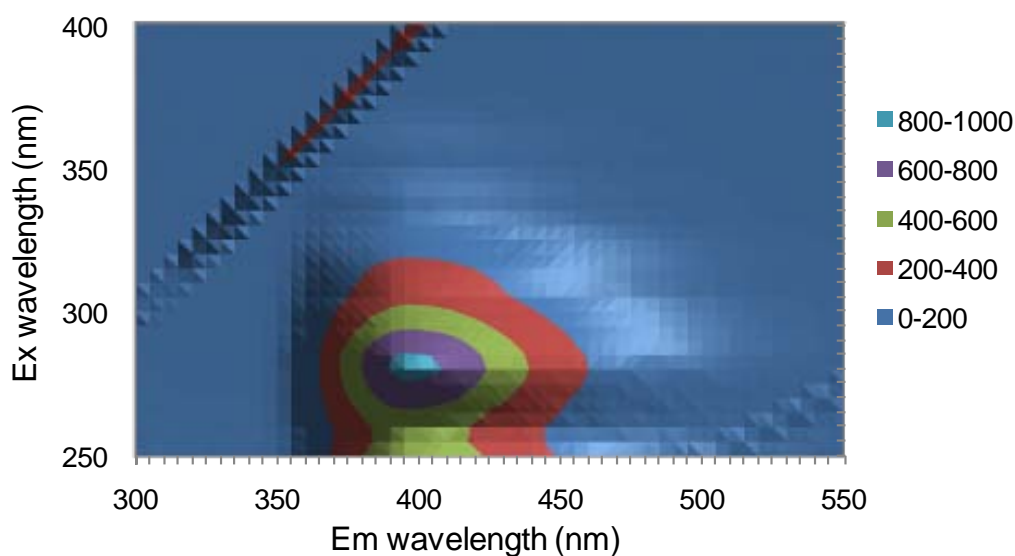


Fig. 2-6 BCS の 3次元蛍光スペクトル

2-3-2. BCS の濃度および BCS/Cu 比の検討

ベースラインノイズを下げ、S/N を向上させるためには、ポストカラム溶液における、BCS の蛍光値のバックグラウンドノイズを低く抑えることが必要であった。このためには、(1)BCS の濃度を下げる、(2)BCS/Cu 比を調整することが検討事項として挙げられた。Fig. 2-7 に、BCS の濃度を 1 μ M, 500 nM とし、GSH および PC₂ を分析したときのクロマトグラムを示す。BCS 濃度が半分になることでベースラインノイズが低くなり、かつシグナルの強さは変化しないことが分かった。

(1), (2), 移動相に用いる有機溶媒の種類(CH₃CN, CH₃OH), ポストカラム溶液に加える還元剤の種類など種々の条件を検討し、結果として、2-2-4 に示した最適化された条件を得た。

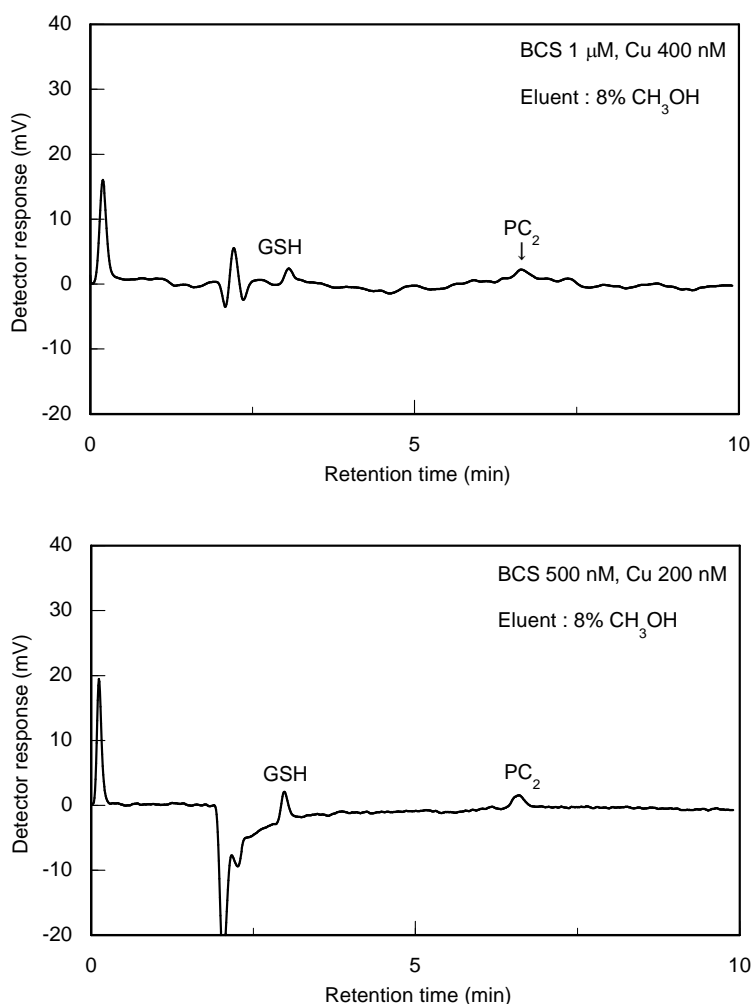


Fig. 2-7 BCS の濃度によるクロマトグラムの変化

GSH, PC₂ の濃度はそれぞれどちらも 10 nM の標準品を使用した。移動相には 8% CH₃OH with 0.1% TFA を使用した。

2-3-3. He バブリングによるポストカラム溶液の還元状態の維持

ポストカラム溶液は Cu(I) が pH 10.0 の溶液に溶解しており, Cu(I) が経時的に Cu(II) に酸化されることによって感度の低下が生じた. この酸化を防ぐ方法として He バブリングを行った. He の有無がクロマトグラムに与える影響を Fig. 2-8 に示す. He バブリングを行わなかったものは PC₂ のシグナル強度が小さくなり, また GSH が負のピークとして現れている. この結果から, He バブリングは感度を高く保つために必須であることが示された(Ogawa *et al.*, 2010).

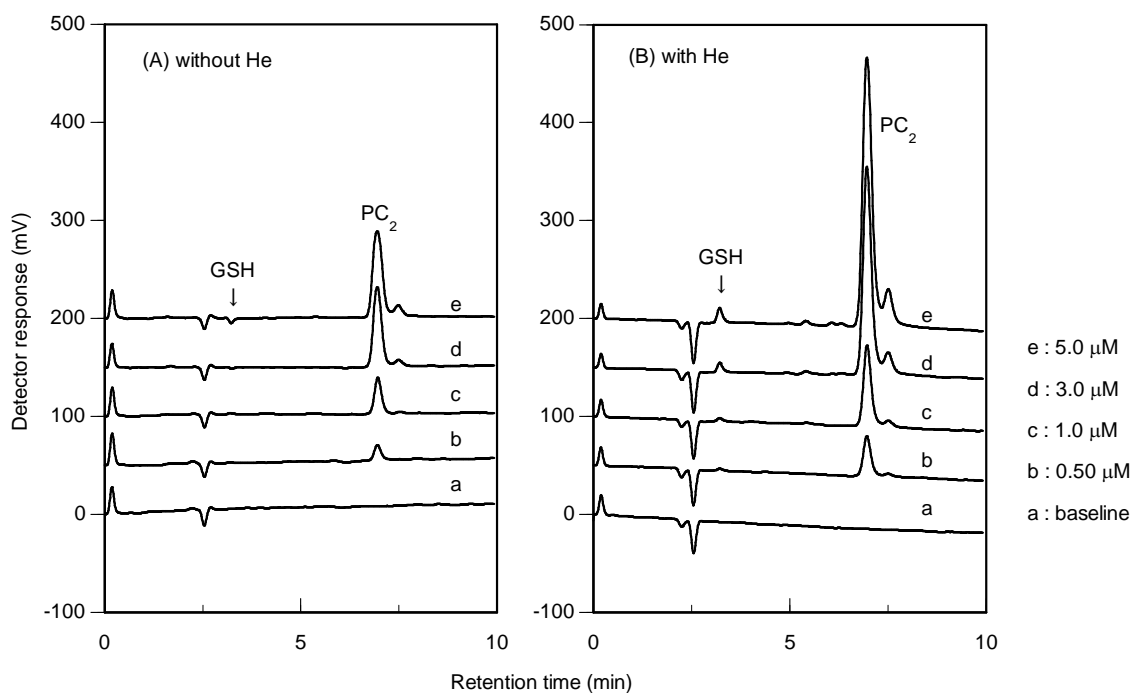


Fig. 2-8 ポストカラム溶液の He バブリングと感度

(A): He バブリングを行わなかったもの, (B): 行ったもの.

GSH, PC₂ の濃度は, (a) 0, (b) 0.5, (c) 1.0, (d) 3.0, (e) 5.0 μM である.

移動相には 5% CH₃CN を使用した. Retention time は GSH, PC₂ でそれぞれ 3.20, 6.96 min.

2-3-4. 検量線および検出限界

最適化された条件において、移動相の有機溶媒に CH₃CN, CH₃OH を用いた場合の検量線と検出限界を Table 2-3 に示す. 移動相中の有機溶媒として CH₃CN を用いた場合には, 条件最適化前と比較して GSH の検出限界には大きな変化は見られなかった. PC₂ で比較すると, mBBr 法の検出限界が 0.2 pmol/injection であるのに対して(Sneller *et al.*, 2000), 本法は CH₃CN, CH₃OH を用いた場合でそれぞれ 0.08, 0.04 pmol/injection であった(Ogawa *et al.*, 2012).

Table 2-3 GSH, PC の検量線および検出限界

・ CH₃CN

peptides	regression equation	linearity range (nM)	r ²	detection limit (nM)*1
GSH	y=0.076x + 1.758	0-1000	0.9919	72.6
PC ₂	y=1.605x + 1.887	0-1000	0.9955	4.15
PC ₃	y=2.457x - 41.304	0-1000	0.9982	1.74
PC ₄	y=2.671x + 37.312	0-1000	0.9932	1.27

移動相の有機溶媒は 5% CH₃CN with 0.1% TFA を使用し, 5-20 % (v/v) (5-30 min) のグラジエント溶出を行った(Table 2-4 も同一条件).

*1: 検出限界は GSH(500 nM), PC₂(50 nM), PC₃(20 nM), PC₄(20 nM)を 3 回測定したときのピーク面積値の標準偏差をσとし, 3σ を与える濃度を検量線より求めた.

・ CH₃OH

peptides	regression equation	linearity range (nM)	r ²	detection limit (nM)*2
GSH	y=2.751x+5.353	0-100	0.9910	1.94
PC ₂	y=1.950x+7.796	0-600	0.9961	1.87
PC ₃	y=3.641x+67.226	0-600	0.9934	1.04
PC ₄	y=2.906x+26.493	0-600	0.9959	1.37

移動相の有機溶媒は 8% CH₃OH with 0.1% TFA を使用し, 8-25 % (v/v) (5-30 min) のグラジエント溶出を行った(Table 2-4 も同一条件).

*2: 検出限界は GSH(10 nM), PC₂(10 nM), PC₃(10 nM), PC₄(10 nM)を 3 回測定し, 上記同様に 3σ を与える濃度を検量線より求めた.

2-3-5. 生物試料の測定と添加回収率

C. meorolae の抽出液を分析したクロマトグラムを Fig. 2-9 に示した. さらに GSH, PC を試料に添加したときの回収率を測定し, Table 2-4 に示した.

クロマトグラムにおける, GSH, PC₂, PC₃, PC₄ の Retention time はそれぞれ 3.23, 7.16, 15.1, 19.9 min (Fig. 2-9 (A), CH₃CN), 3.33, 8.28, 18.0, 25.5 min (Fig. 2-9 (B), CH₃OH) である. Cd を添加した *C. meorolae* では, Cd に応答して PC₂, PC₃, PC₄ の合成が起こっていることが分かる (Fig. 2-9 (A)-a, (B)-a). また, (A)-a のクロマトグラムでは GSH のピークが (A)-b に比べて小さくなっているが, これは PC 合成の基質として GSH が使用され, 細胞内濃度が低下したためと考えられる. 本法は, Cu(I) に対するキレート能に依存した分析法であるために, 他の検出法と比較してソフト金属を選択的に分析できるため, クロマトグラムに雑多なピークが現れないという利点を持つ.

培地に Cd を添加した場合, *C. meorolae* 細胞を洗浄しても細胞内には Cd-GSH もしくは Cd-PC の形態で Cd が残存すると考えられる. 0.1% TFA 溶液による細胞の破碎抽出, および 0.05 M HClO₄ 処理による除タンパク質過程において分析サンプル溶液は強酸性になるため, GSH や PC にキレートされていた Cd はこれらから解離する. 続く逆相 HPLC による分離過程も酸性条件下で行うため これらのキレーターが Cd と再度結合することはなくポストカラム溶液に達する. このため, サンプル中に残存する Cd の影響を受けることなく, GSH および誘導合成された PC を定量することができると考えられる.

また, GSH および PC の回収率は 100% に近い値を示し, 本法が生物試料における PC 類の分析に効果的であることが分かった (Ogawa *et al.*, 2012).

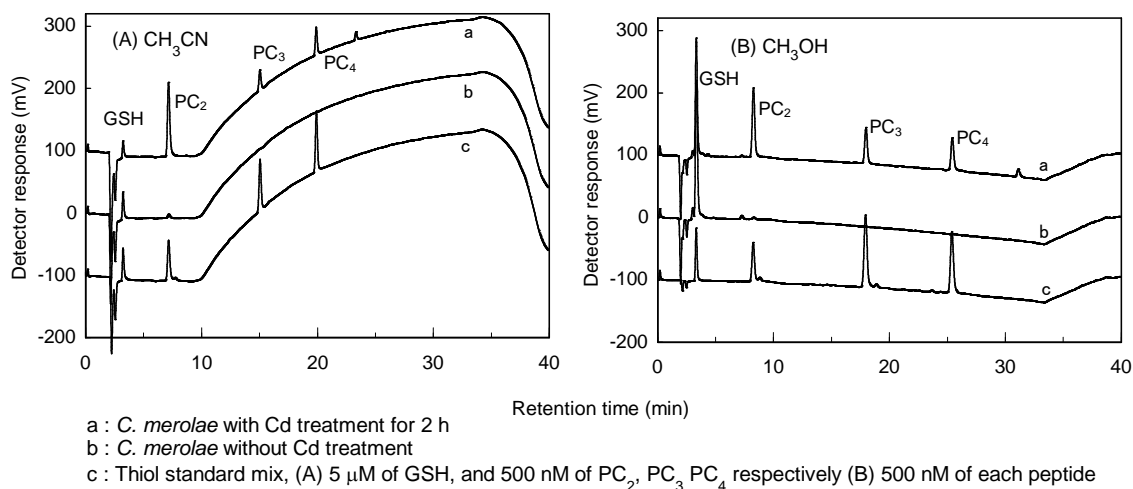


Fig. 2-9 生物試料および GSH, PC 標品のクロマトグラム

Table 2-4 生物試料の GSH, PC 含量および回収率

• CH₃CN

peptide	concentration (pmol/ unit of <i>C. merolae</i> cells)			recovery (%)
	initial	added	found	
GSH	683 ± 60.3	250	894 ± 38.0	84.4 ± 28.5
PC ₂	342 ± 3.06	25	367 ± 1.24	102 ± 13.2
PC ₃	49.9 ± 2.48	25	73.9 ± 1.62	95.8 ± 11.9
PC ₄	45.1 ± 2.90	25	71.6 ± 2.09	106 ± 14.3

• CH₃OH

peptide	concentration (pmol/ unit of <i>C. merolae</i> cells)			recovery (%)
	initial	added	found	
GSH	788 ± 29.6	250	1034 ± 17.2	98.5 ± 13.7
PC ₂	345 ± 4.17	25	371 ± 2.35	104 ± 19.2
PC ₃	44.1 ± 1.99	25	70.3 ± 2.53	105 ± 12.9
PC ₄	41.9 ± 1.50	25	67.0 ± 1.55	100 ± 8.62

*1 U は OD₇₅₀ = 1.0 の培養液 1 mL から得られる細胞量とする。
 initial: GSH, PCs を添加する前のサンプル中の各物質の測定値
 found: 一定量の GSH, PCs を添加した後の各物質の測定値

2-3-6. 酵素反応液への標準添加法による PC₂ 検量線とその線形範囲

最適化された分析条件を, PCS の活性測定に適用することを試みた. Fig. 2-10 に, 酵素反応液に標準添加することによって作成した PC₂ の検量線を示す. 分析時の PC₂ の濃度が 0-3 μM までは線形性が確保されていることが分かった. よって酵素反応液は, PC₂ がこの濃度範囲になるように適当に希釈して測定することが望ましいことが分かった. 本法はポストカラム法であるので簡便であり, HPLC を用いた PC 類に特異的な定量方法としては, 最も優れた感度を持つと言える.

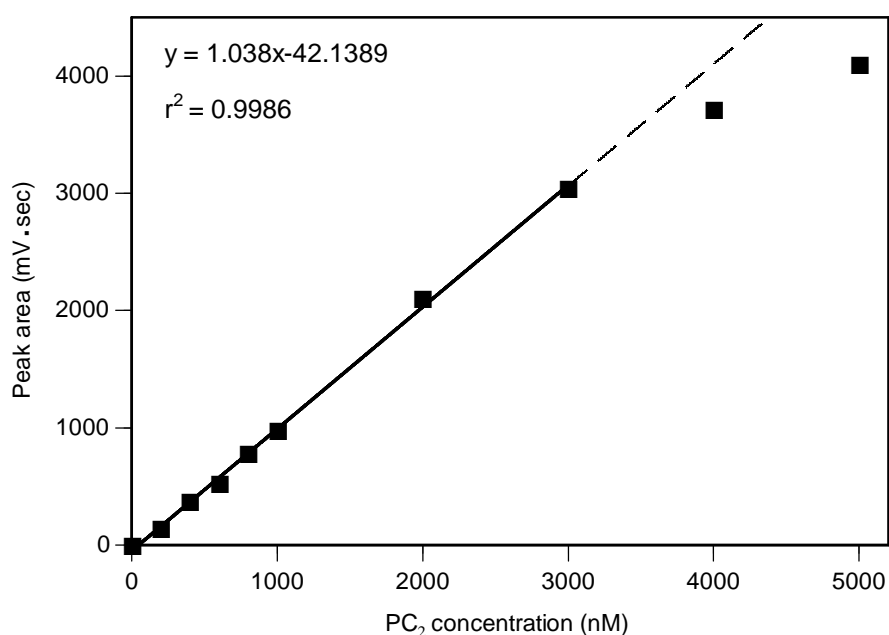


Fig. 2-10 酵素活性測定における検量線の線形範囲

2-3-7. 様々な酵素濃度における比活性

酵素反応液に様々な量の *rAtPCS1* を加え、比活性を測定した結果を Table 2-5 に、酵素活性測定のカロマトグラムを Fig. 2-11 に示す。本来、酵素反応によって生じた産物量を反応時間と加えた酵素量で除した比活性は一定の値をとるはずであるが、*rAtPCS1* 量が 10-50 ng/mL の場合には、酵素量が減少するに従って比活性も低下していた。カロマトグラムのピーク強度を比較すると、*rAtPCS1* を 100-500 ng/mL 加えた(B)では、 PC_2 のピーク強度はほぼ加えた *rAtPCS1* の量に比例しているが、10-50 ng/mL 加えた(A)では酵素量とピーク強度が比例していないことが分かる(Ogawa *et al.*, 2010)。

rAtPCS1 濃度と比活性の関係をグラフにしたものを、Fig. 2-12 に示す。*rAtPCS1* 濃度が 100 ng/mL よりも大きい場合には、比活性はほぼ一定の値をとっていることが分かる。また Table 2-5 より、酵素反応液中に BSA を添加することで、1 ng/mL の酵素量でも活性が検出されるとともに、10 ng/mL の酵素量では BSA を添加しないときと比べて比活性が上昇していることが分かった。

また、Fig. 2-12 の各データに対して Langmuir の吸着等温式からモデル式を作成してカーブフィッティングを行ったものを実線で示した。決定係数 $R^2 = 0.9850$ と、理論式に対して良くあてはまることが分かる。以上のことから、比活性の低下は酵素の反応容器の壁面への吸着が原因であると考えられた。

酵素反応液中に BSA を様々な濃度で添加して比活性を求めた結果を Fig. 2-13 に示した。吸着の影響を排除して正しく比活性を求めるためには、ある程度の酵素量が必要であること、および反応液中への BSA の添加が有効であることが分かった。

Table 2-5 様々な rAtPCS1, BSA 濃度における比活性

rAtPCS1 (ng/mL)	BSA (ng/mL)	PCS Activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}\text{-protein}$)
10	0	4.09 ± 0.38
20	0	3.89 ± 0.71
30	0	6.60 ± 0.92
40	0	7.49 ± 0.42
50	0	12.6 ± 1.03
100	0	24.9 ± 2.46
200	0	25.9 ± 1.33
300	0	28.7 ± 2.40
400	0	28.9 ± 1.24
500	0	30.9 ± 0.85
1	0	Not detected
1	100	Not detected
1	10,000	20.9 ± 2.76
10	100	18.4 ± 0.83
10	10,000	30.0 ± 1.04

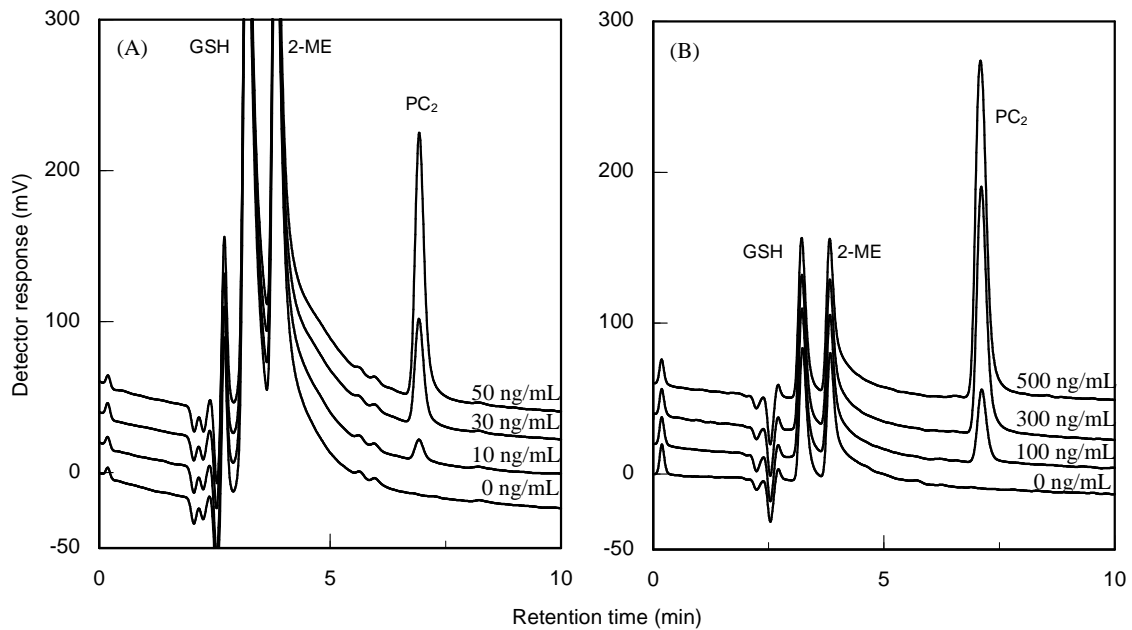


Fig. 2-11 酵素活性測定のカロマトグラム

酵素反応はポリプロピレン製の 1.5 mL マイクロチューブ内で行った. (A)下から rAtPCS1 濃度 0, 10, 30, 50 ng/mL, (B)下から rAtPCS1 濃度 0, 100, 300, 500 ng/mL. 酵素反応終了後の反応液を(A)では 10 倍に, (B)では 100 倍に希釈して HPLC によって分析した. 6.98 min のピークが反応産物の PC₂ である. 酵素反応液中に存在する GSH と 2-mercaptoethanol のピークはそれぞれ 3.30, 3.85 min である.

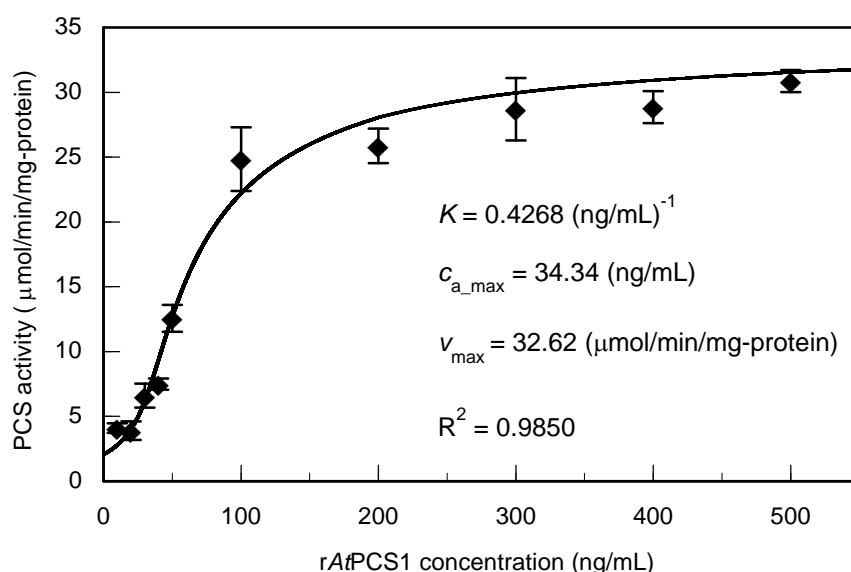


Fig. 2-12 rAtPCS1 濃度と比活性のグラフ

$c_t = c_{total}$, $c_s = c_{solution}$, $c_a = c_{adsorption}$, $c_{a_max} = c_{adsorption_max}$, K を吸着の化学平衡定数をおくと、以下の関係式が成り立つ。

$$c_a = c_{a_max} \frac{c_s K}{1 + c_s K}$$

$$c_t - c_s = c_{a_max} \frac{c_s K}{1 + c_s K}$$

$$c_s = \frac{\sqrt{(c_{a_max} K - c_t K + 1)^2 + 4c_t K} - (c_{a_max} K - c_t K + 1)}{2K}$$

これより反応速度 v は以下の式で示される。

$$v = v_{max} \frac{c_s}{c_t}$$

$$= v_{max} \frac{\sqrt{(c_{a_max} K - c_t K + 1)^2 + 4c_t K} - (c_{a_max} K - c_t K + 1)}{2c_t K}$$

$$= v_{max} \frac{2}{\sqrt{(c_{a_max} K - c_t K + 1)^2 + 4c_t K} - (c_{a_max} K - c_t K + 1)}$$

$$\left(\lim_{c_t \rightarrow 0} v = \frac{v_{max}}{c_{a_max} K + 1} \right)$$

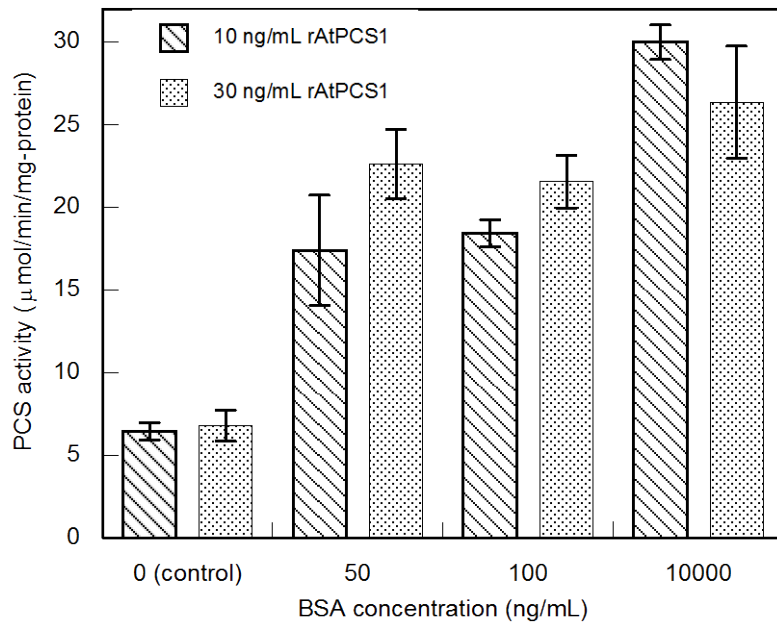


Fig. 2-13 BSA 添加濃度と比活性のグラフ

2-4. 考察

本章では、蛍光試薬 BCS を用いたソフト金属キレーター分析の条件を最適化し、検出感度を向上させた。そしてこの分析方法を PCS の活性測定に適用した。最適化された条件での分析感度は、移動相に用いる有機溶媒によって変動することが明らかとなった。PC₂ で比較した場合、mBBR 法に比べて約 2 倍(移動相に CH₃CN を使用した場合)、および約 5 倍(移動相に CH₃OH を使用した場合)の検出感度が得られた。なお、CH₃CN を用いた移動相の場合、GSH の感度は PC に比べて 20 倍程度低くなった。対して CH₃OH を用いた場合には、GSH も PC と同程度の検出感度が得られた。CH₃CN を用いた場合に GSH に対する検出感度が低いという現象は、本分析法を PCS の酵素活性測定に適用する上では好都合であった。これは酵素反応液中には反応の基質となる GSH や、SH 基を有する還元剤の 2-mercaptoethanol が多量に存在するため、CH₃CN を用いた測定では、これらのピークのテーリングが PC₂ の分析に及ぼす影響を小さくすることができるためである。

本分析法は例示した他の分析法と異なり、ソフト金属配位子を持つ物質のキレート能力に応答し、それらを選択的に分析できるため、*C. merolae* 由来の生物試料を分析した場合、クロマトグラムに Cd 曝露により誘導合成された PC 以外の雑多なピークが現れることはなかった。*C. merolae* 抽出サンプルへの PC 標品添加回収試験では、回収率は 100%に近い値を示し、本分析法が生物試料中のソフト金属キレーターの微量分析に有効であることが確認された。CH₃CN を移動相に用いた場合、CH₃CN 濃度が上昇するに従ってベースラインが上昇した。Cu(I) は CH₃CN と錯結合を形成することが知られており(Nigam *et al.*, 1985)、これにより CH₃CN の濃度が上昇するとともに、BCS-Cu(I) 複合体が解離して蛍光強度が大きくなっていることが原因であると推測される。

本分析法を用いて rAtPCS1 の酵素活性測定を行ったところ、酵素の一部が反応容器の壁面に吸着を起し、不活性化することによる活性の低下が認められていると考えられた。反応速度を測定する際には、酵素量をできるだけ少なくすることが望ましいため、分析系の感度が向上したことは有益であるが、酵素量が少なすぎると吸着の影響が大きくなることが分かった。定量的な酵素活性測定を行うためには、100 ng/mL 以上の酵素量を用い、100 ng/mL 以上の BSA を反応液中に共存させることが望ましいと考えられた。結果として、従来よりも 10~100 倍少ない酵素量での活性測定が可能となった。

以上のように、本分析法は生物試料中の微量なソフト金属キレーターの検出、定量だけではなく、PCS の動力学的解析を行う際に有効に利用できると考えられる。

第3章 *Arabidopsis thaliana* 由来の PCS を用いた

PCS の Cd による活性化機構の解析

3-1. 序

3-1-1. PCS の活性化機構

PCS の触媒機構, 活性化機構については, *At*PCS1 を用いて動力的な研究が進められている. 第1章で述べたように, PC の合成反応は Step1 の γ Glu-Cys 基(γ EC 基)による PCS のアシル化反応と, Step2 の γ EC 基の他分子への転移反応からなる(Fig. 3-1). しかし, この反応における金属イオンの役割は明確になっていない.

Vatamaniuk らによると *At*PCS1 はタンパク質 1 分子あたり 7 個の Cd イオンの結合部位を有し, その解離定数は $5.4 \times 10^{-7} \text{ M}$ (結合定数は $1.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) とされている. 一方, 生体および酵素反応液中では大部分の Cd が Cd-(GSH)₂ 複合体を形成し, 遊離 Cd (H₂O が配位した状態) 濃度は極端に小さくなる. Vatamaniuk らの計算では, 200 mM HEPES-BTP (pH 8.0), 3.3 mM GSH, 25 μM CdCl₂ の条件において, $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{free}} = 6.638 \times 10^{-13} \text{ M}$ とされている. したがって, この条件下では Cd は *At*PCS1 と結合できないと結論され, Cd-(GSH)₂ 複合体が Step2 におけるアクセプターとなる, "blocked thiol theory" が提唱された. さらなる検証により, これは次のような説明に至っている.

(i) Cd-(GSH)₂ 複合体が PCS に結合する.

(ii) Cd-(GSH)₂ 複合体から Cd が PCS に渡され, γ EC 基の転移反応を触媒する.

しかしながら, 種々の生物種における PCS の C ドメインには, Metallothionein や CDF, ZIP ファミリーに属する金属トランスポーター, CPx-ATPase などにみられる典型的な金属結合モチーフが保存されており, PCS は金属イオンと直接結合するという主張も覆されたわけではない. *Ta*PCS には, ペプチドスキニングにより, 7 つの Cd 結合部位が存在すると考えられている(Maier *et al.*, 2003). また, この結合部位の一部は, GSH 存在下においても Cd が結合できることが示されている. また, *At*PCS1 をプロテアーゼ処理した場合, Cd 存在下では切断を受けにくくなることから, Cd 結合によるタンパク質の構造変化・安定化が示唆されている(Ruotolo *et al.*, 2004). さらには, Vatamaniuk らの求めた結合定数は, 7 つの結合部位における "平均値" としての値であり, この中には高い Cd 結合能を有するものが存在する可能性も考えられる. しかしながら, これらの結合部位のうちどの部分に Cd が結合した場合に PCS が活性化されるのか, その詳細なモデルは提唱されていない.

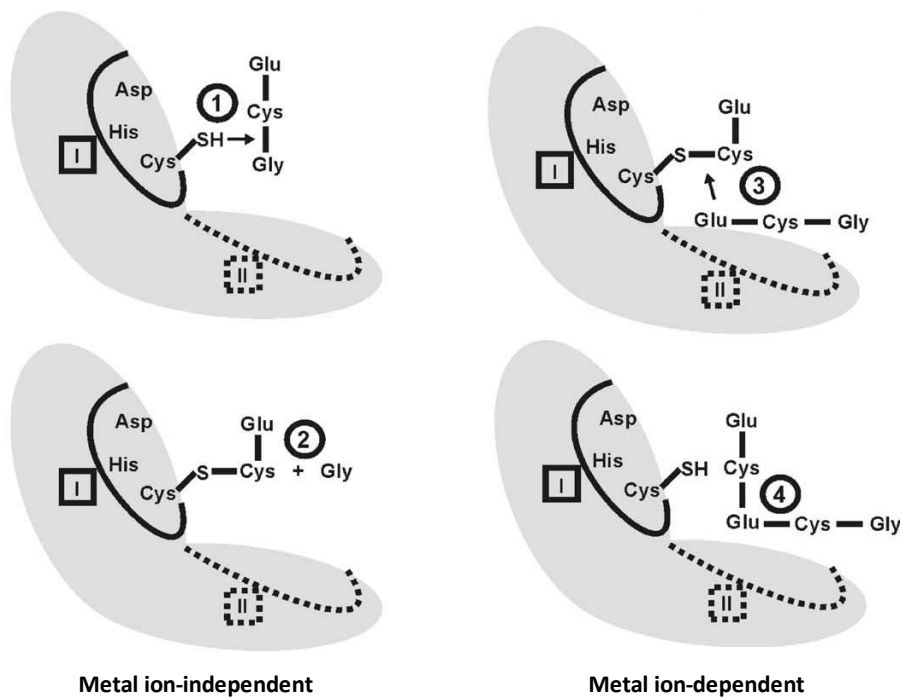


Fig. 3-1 PCS の γ Glu-Cys 基によるアシル化と転移反応

(Clemens, 2006 *J. Plant Physiol.* **163**, 319-332 より引用)

少なくとも I と II の 2 つの部分で基質と結合すると考えられている。

3-1-2. 目的

前述のように PCS の重金属による活性化機構は明確にされていない。本章では、*APCS1* と Cd を用いて、種々の GSH, Cd 濃度条件において酵素活性を測定することで、PCS の金属による活性化機構、すなわち Cd は PCS と直接に結合するのか、または PCS は常に活性化状態にあり Cd-(GSH)₂ 複合体が基質となっているのかを明らかにすることを目的とした。

また、PC 合成時に PCS にアシル化された γ EC 基のアクセプター分子に関する知見を得るために、GSH の他に γ EC や desglysyl PC₂ を基質として使用した酵素反応を行い、反応産物の分析を行った。

なお、本章では特に断らない限り、酵素活性とは反応液中で酵素の触媒機能により生じた産物量を、反応液中加入した酵素の全量と反応に要した時間で除した、 $[\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg-protein}]$ の次元を持つ量と定義する。これは、PCS-Cd 複合体が活性型酵素となると仮定した場合、その割合を示す $[\text{PCS-Cd}]/[\text{PCS}]_{\text{total}}$ の値が Cd 濃度によって変化することに留意する必要があるためである。

3-2. 実験手法

3-2-1. *AtPCS1* の大量発現

AtPCS1 遺伝子は理研バイオリソースより供与された *A. thaliana* cDNA をテンプレートに用いて、Table 3-1 に示したプライマーと PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Takara) を用いて PCR により塩基配列を増幅した。得られた DNA 断片を pET28b (Novagen) ベクターにサブクローニングし、目的の遺伝子が正しく挿入されていることを DNA シークエンサーにより確認した。作製したプラスミドで *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Novagen) を形質転換した。

この大腸菌を前培養し、200 mL の LB 培地に $OD_{600} = 0.1$ となるように加えて 25°C で 2 h 培養した後、IPTG を終濃度 40 μ M となるように加えてさらに 6 h 培養した。培養終了後に集菌し、抽出バッファー(400 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Tween 20, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)を加えて超音波破碎(BRANSON, SONIFIER 250D)を 10 min 行った。この抽出液を遠心分離(13,000 \times g, 10 min, 4°C)して得られた上清を粗抽出液とした。

3-2-2. アフィニティークロマトグラフィー精製

pET-28b ベクターを用いると目的タンパク質の N 末端側に His が 6 残基付加して発現されるため、これを利用して FPLC (Pharmacia) により *AtPCS1* を精製した。カラムには HisTrap HP 1 mL (GE Healthcare) を用い、Binding buffer (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 500 mM NaCl, 40 mM imidazole, 1 mM 2-mercaptoethanol) によって平衡化したカラムに粗抽出液を注入した。Binding buffer で洗浄した後、imidazole 濃度を 40-250 mM まで変化させてカラムに結合しているタンパク質を溶出した。*AtPCS1* は、imidazole 濃度が 150 mM 付近の画分に溶出した。200 mL の菌体培養液から *AtPCS1* は 5 mg 程度得られた。SDS-PAGE で十分な精製度であることを確認し、Bradford 法を用いてタンパク質の濃度を決定し、酵素ストック液(100 ng/ μ L *AtPCS1*, 10% glycerol, 1 mM 2-mercaptoethanol)として液体窒素で急冷して-80°Cで保存した。凍結融解による酵素活性の低下を防ぐため、酵素ストック溶液は小分けにして測定の際に新しいものを使用した。

3-2-3. 酵素活性測定

酵素活性は PC₂ の合成量によって評価した。100 μ L の酵素反応液(200 mM HEPES-NaOH (pH 8.0), 10 mM 2-mercaptoethanol, 0-100 mM GSH, 0-500 μ M CdSO₄, 100 ng/mL BSA)に *AtPCS1* 10 ng を加えたものを、35°C, 15 min

インキュベートした後、25 μ L の 10% TFA を加えて迅速に混和し、氷上で冷却することにより反応を停止させた。反応終了液を適当な PC₂ 濃度になるように 0.1% TFA で希釈して HPLC によって分析した。内標準物質として、desglycyl PC₂ を終濃度 500 nM となるように添加した。

3-2-4. FluoZin-1 を用いた結合定数の測定

FluoZin-1TM(Invitrogen) (Fig. 3-2, 以下 FZ と略す) は生体内で Zn²⁺ の局在を調べるための分子プローブとして用いられており、Zn²⁺ と結合することによって蛍光を示す。FZ は Cd²⁺ と結合することによっても蛍光を示すことが知られている (Leverrier *et al.*, 2007)。200 mM HEPES-NaOH (pH 8.0), 1 μ M FZ 溶液に CdSO₄ を 0-50 μ M 加え、蛍光値を測定して Cd との結合定数を算出した。また、1 μ M FZ, 30 μ M CdSO₄ の条件下で GSH 0-500 μ M を添加した場合の蛍光値から、Cd と GSH との結合定数を算出した。蛍光の測定には FP-6500 Fluorescence spectrometer (JASCO) を使い、波長は Ex/Em = 495/517 nm を設定した。

3-2-5. コンピューターを用いたデータ解析

FZ と Cd, Cd と GSH との結合定数は、Excel 2007 (Microsoft) のソルバーアドインを使用し、非線形最小 2 乗法により算出した。これは一般化減少グラデーション (GRG2) というアルゴリズムを用いて、理論式から導かれる値と観測値との誤差 2 乗和を最小にするようにパラメーターを最適化するものである。

また、酵素活性曲線のフィッティングや各種パラメーターの最適化は、Origin 8.1 (OriginLab) を用いた非線形最小 2 乗法によって行った。

3-2-6. γ EC, desglycyl PC₂ を基質とした酵素反応

Cys⁵⁶ にアシル化された γ EC 基のアクセプターについて解析するために、基質として GSH に加えて γ EC および desglycyl PC₂ を加えた酵素アッセイを実施した。基質濃度以外の条件は 3-2-3 に準じた。

3-2-7. 未知ピークの分取と質量分析

3-2-6 において、10 mM GSH, 100 μ M desglycyl PC₂, 10 μ M CdSO₄, 10 μ g/mL A β PCS1 の条件で酵素反応を行った反応液を用いて、PC₃ の直後に出現するピークの分取を試みた。HPLC によるピークの分離は 2-2-3 および 2-2-4 で記述した方法に準じたが、PC₃ と未知ピークの分離を向上させるために、カラムは TSKgel ODS-80T_M 4.6 mm ϕ \times 250 mm (東ソー) を、移動相には 5% CH₃CN with 0.1% TFA 溶液を使用した (分取時にはポストカラム溶液は使用していない)。分取した溶液は凍結乾燥を行い、少量の 10% CH₃OH に溶解した。

質量分析は以下の条件で行った. マトリックス溶液は α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸(CHCA)の粉末を 40% CH₃CN, 0.05% TFA に懸濁し, 遠心して上清を用いた. 試料 1 μ L を等量のマトリックス溶液と混合し, MTP AnchorChip 600/384 TF (BRUKER) に載せて乾燥後, マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/TOF-MS) (ultraflex TOF/TOF, BRUKER) を用いて測定した. キャリブレーションはスタンダードとして Peptide Calib Standard mono を用いて行った. データの解析には, Compass for flexSeries 1.4 を用いた.

Table 3-1 *AtPCS1* のクローニングに用いたプライマー

Primer	Sequence (5'→3')	制限酵素部位
<i>AtPCS1</i> -fwd	GAGAGCTAGCATGGCTATGGCGAGTTTATATCG	<i>Nhe</i> I
<i>AtPCS1</i> -rev	GAGAGAATTCCTAATAGGCAGGAGCAGCGAGATC	<i>EcoR</i> I

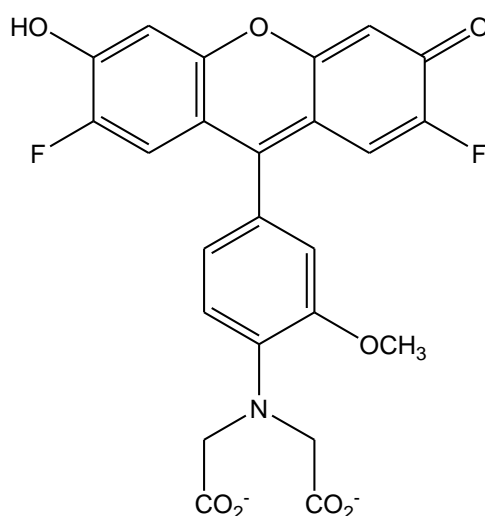


Fig. 3-2 FluoZin-1 の構造

3-3. 結果

3-3-1. *AtPCS1* の発現およびアフィニティークロマトグラフィー精製

AtPCS1 を発現させた大腸菌抽出液の全画分、可溶性画分、アフィニティークロマトグラフィーによる精製サンプルを SDS-PAGE によって分析したものを Fig. 3-3 に示した。発現した *AtPCS1* は 30% 程度が可溶性画分に回収されており、またアフィニティークロマトグラフィーにより十分な純度の精製タンパク質が得られたことを確認した。

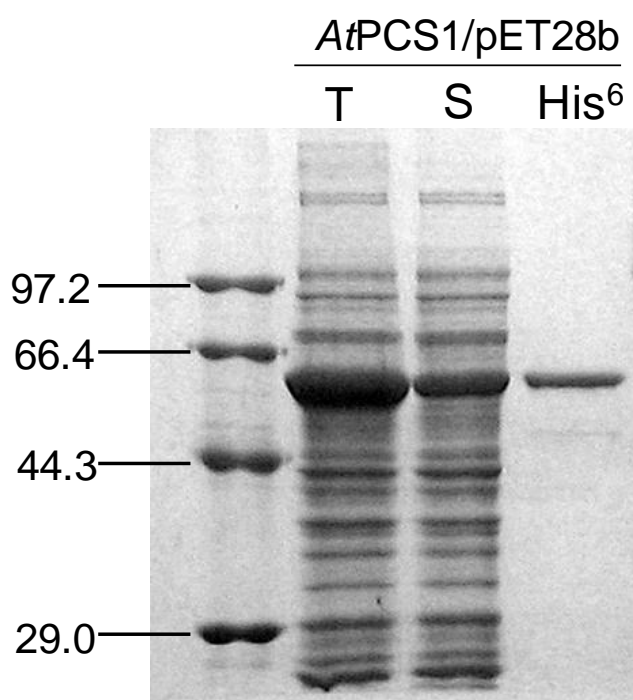


Fig. 3-3 *AtPCS1* の発現 (T: total, S: Sup, His⁶: 精製後のサンプル)

3-3-2. 酵素活性測定系のバリデーション

3-2-3 に示した条件で, GSH 濃度を 10, 50 mM, CdSO₄ 濃度を 50 μM としたときの PC₂~PC₄ の合成量を経時的に調べた(Fig. 3-4). PC₄ に関しては, どちらの条件でも 20 min の時点までには合成がみられなかった. PC₃ に関しては, 例えば GSH 10 mM の条件, 20 min の時点では, PC₂ の合成量のおよそ 1/50 であった.

PC₂ 合成量は 20 min の時点では直線的に増加していることが分かる. また, 例えば GSH 10 mM の条件, 20 min の時点では PC₂ は約 25 nmol 合成されているが, これは基質として GSH が倍の約 50 nmol 分消費されたことになる. 酵素反応溶液全体に最初に存在した GSH は 1 μmol (10 mM × 100 μL) であるので, 約 1/20 の基質が消費された計算になる.

以上のことから, 以後の標準的な実験における酵素反応の反応時間は 15 min とし, PC₂ の合成量から酵素活性の値を算出しても差し支えないと判断した. この根拠としては上に挙げたように, (1) PC₃, PC₄ 等の高次の PC の合成は PC₂ に比べて無視できる量であること, (2) PC₂ の産生量は 15 min の時点では直線的に増加していること, (3) 15 min の時点で消費された GSH の量は, 初期量に比べて無視できる量であること, という 3 点から判断した.

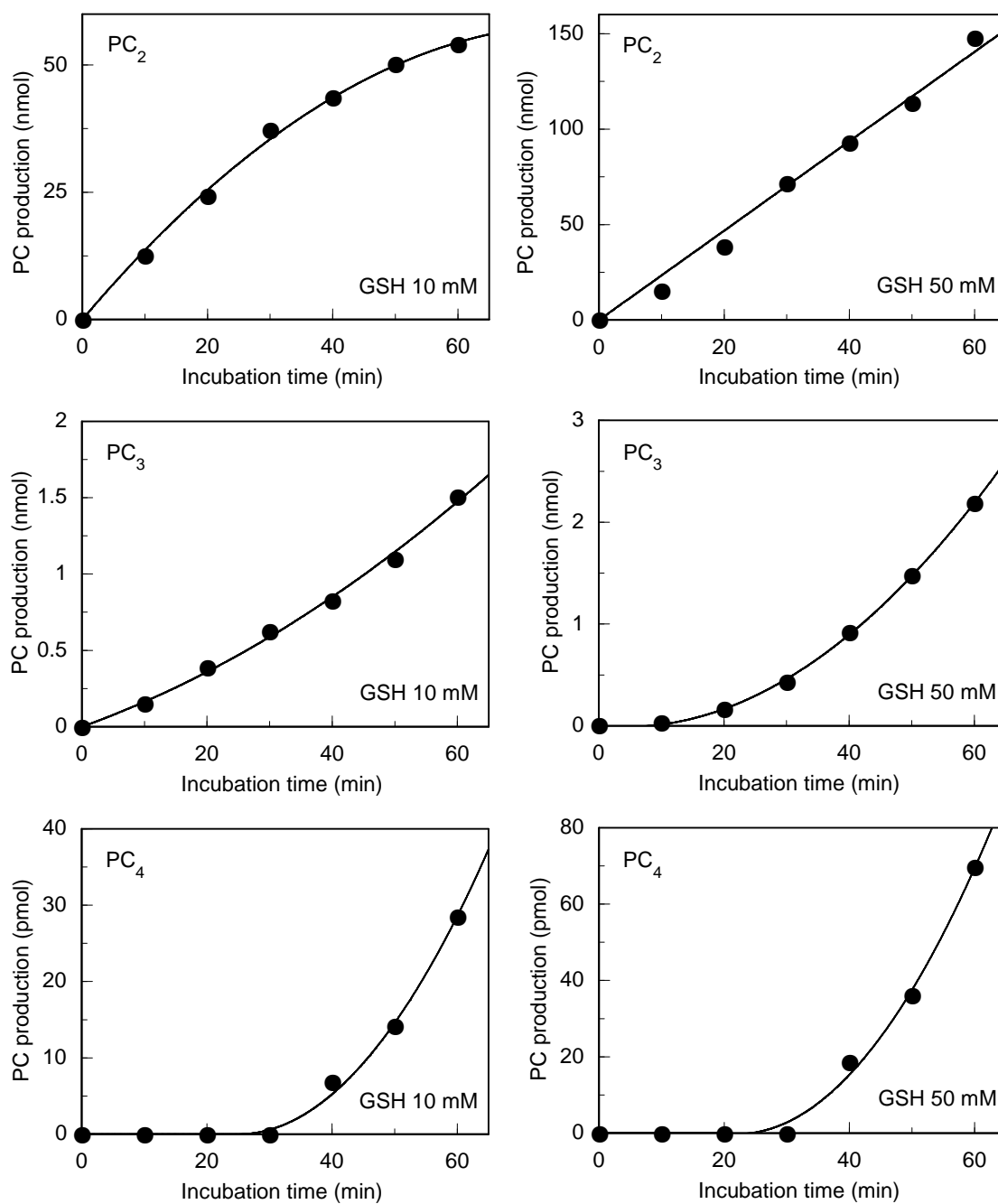


Fig. 3-4 経時的な PC₂~PC₄ の産生量

GSH 10, 50 mM, CdSO₄ 50 μM の条件で経時的にサンプリングし反応を停止させ、0.1% TFA で検量線の線形範囲内に入るように適当に希釈して濃度を測定した。

様々な条件で酵素活性測定を実施すると、その測定 1 バッチに対して丸一日かかる場合もあり、サンプルやポストカラム溶液の経時変化による蛍光シグナルの変化が懸念される。この問題を解決するため、多サンプルの酵素活性測定時にはサンプル溶液中に内標準物質 (I. S.) として desglycyl PC₂ (DGPC₂) を添加し、PC₂ とのピーク面積比を指標とすることでより正確に検量線からの濃度定量を行うことを試みた。

Fig. 3-5 に PC₂ と DGPC₂ のクロマトグラムを示した。ピークの大きさは両者でほぼ同じであった。また DGPC₂ を酵素反応液希釈液に標準添加しても問題なく定量ができることが分かった。以後の測定では、HPLC 測定液の希釈時に終濃度 500 nM の DGPC₂ を添加することに決定した。

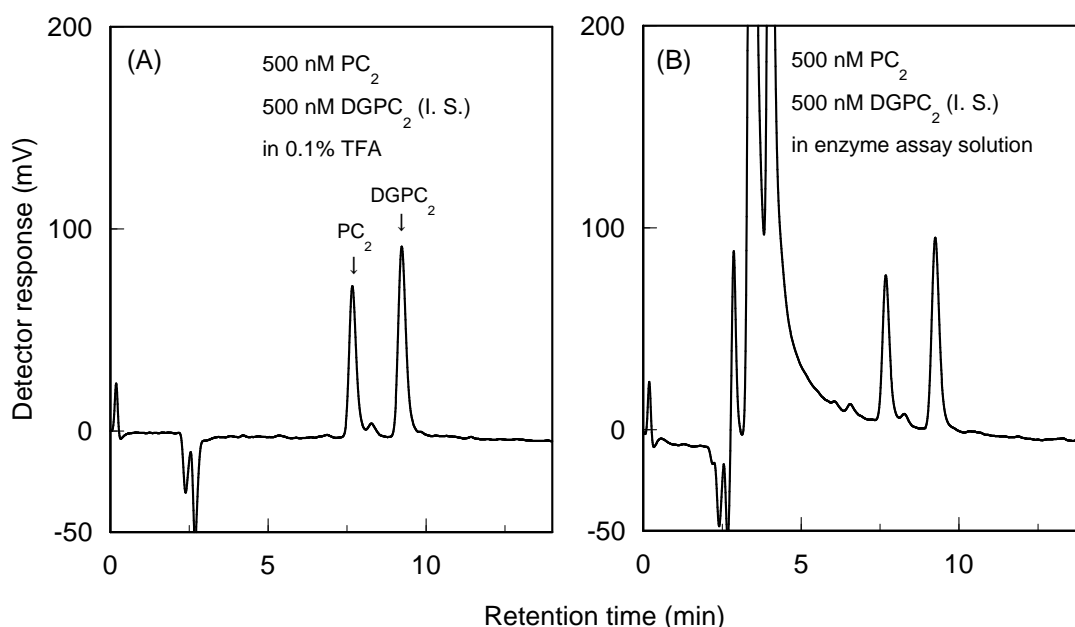


Fig. 3-5 内標準物質を使用した酵素反応液希釈液のクロマトグラム
(A): 0.1% TFA に PC₂ および DGPC₂ を添加したもの。
(B): 酵素反応溶液を 0.1% TFA で 100 倍希釈し、PC₂ および DGPC₂ を添加したもの。

3-3-3. 様々な GSH, Cd 濃度と酵素活性

Fig. 3-6 に, Cd 濃度を 50, 500 μM と固定した条件において, GSH 濃度を 0-80 mM の範囲で変化させたときの酵素活性を示した. Fig. 3-7 には, Cd 濃度をより小さくした 1, 5, 10 μM の条件において, GSH 濃度を 0-50 mM の範囲で変化させたときの酵素活性を示した. GSH 濃度の上昇とともに活性が上昇していき, 最大値に達して以後は活性は減少した. すなわち酵素活性には極大値が存在しており, この極大値を与える GSH 濃度は Cd 濃度に依存し, Cd 濃度とともに増加した.

Fig. 3-8 に, GSH 濃度を 5, 20 mM と固定した条件において, Cd 濃度を 0-500 μM の範囲で変化させたときの酵素活性を示した. なお, GSH 5 mM においては, Cd 濃度 0-40 μM の部を拡大したものを該当図中に示した. 酵素活性は Cd 濃度とともに上昇し, 最大活性を示した後に減少した. このとき最大活性を与える Cd 濃度は GSH 濃度とともに上昇した.

なお, ここで述べた GSH 濃度, Cd 濃度とは, 反応系に加えた全ての GSH, Cd 濃度を意味する. Fig. 3-6, 3-8 の実線はカーブフィッティング(3-4 考察において記述)を行ったものであるが, Fig. 3-7 の実線はカーブフィッティングではなく, 単純に実測値からあてはまりの良い曲線を描画したものである.

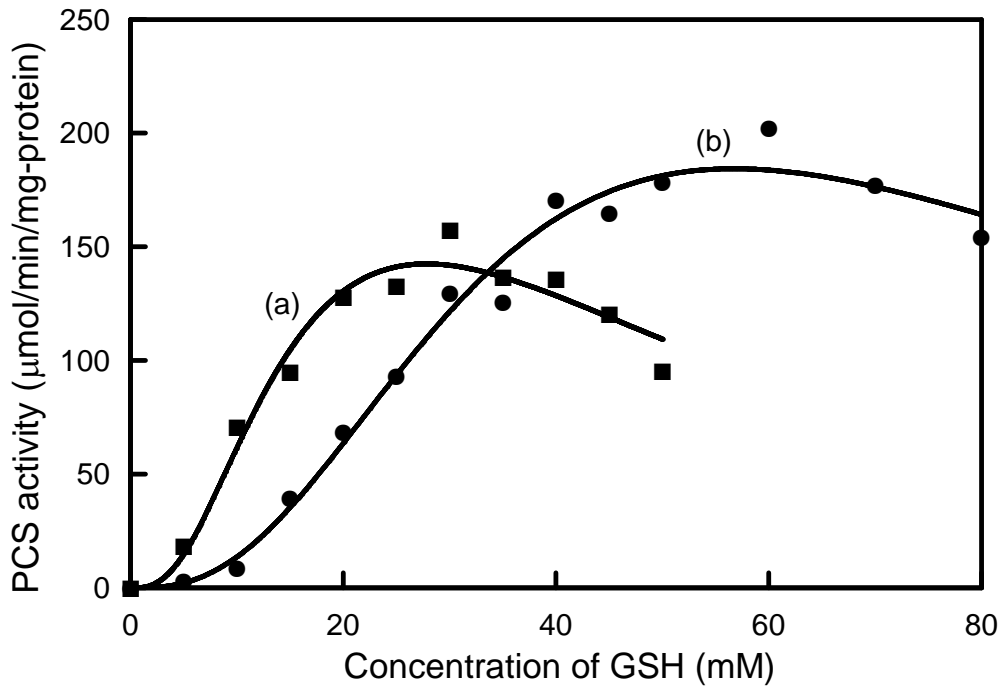


Fig. 3-6 Cd 濃度 50, 500 μM の条件における GSH 濃度と酵素活性
 CdSO₄ 濃度 (a) 50 μM , (b) 500 μM 実線はフィッティング曲線

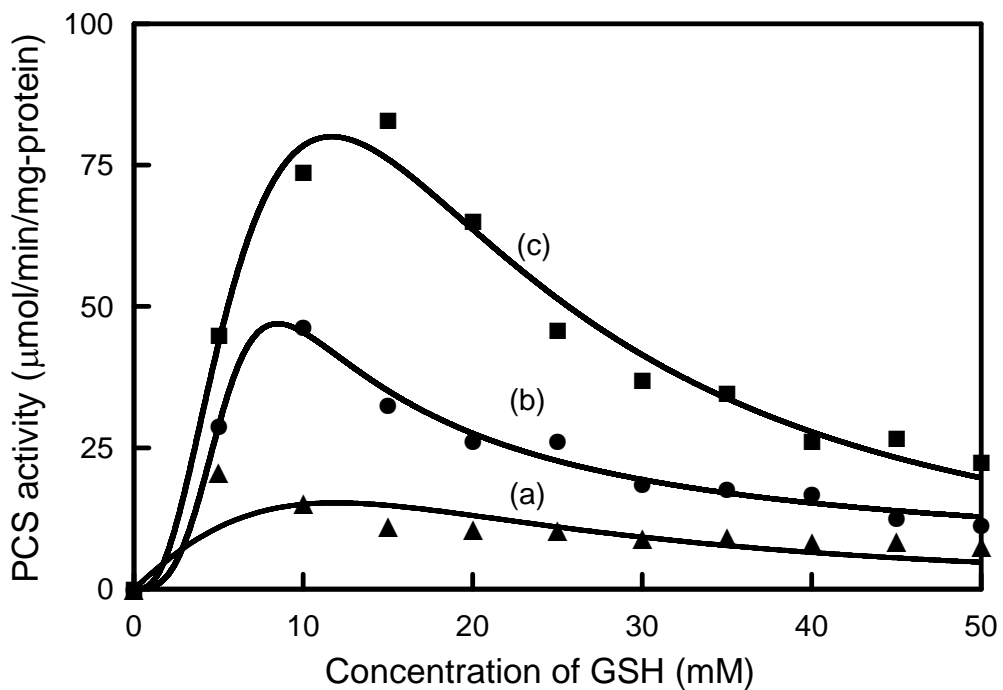


Fig. 3-7 Cd 濃度 1, 5, 10 μM の条件における GSH 濃度と酵素活性
 CdSO₄ 濃度 (a) 1 μM , (b) 5 μM , (c) 10 μM
 実線はフィッティング曲線ではない

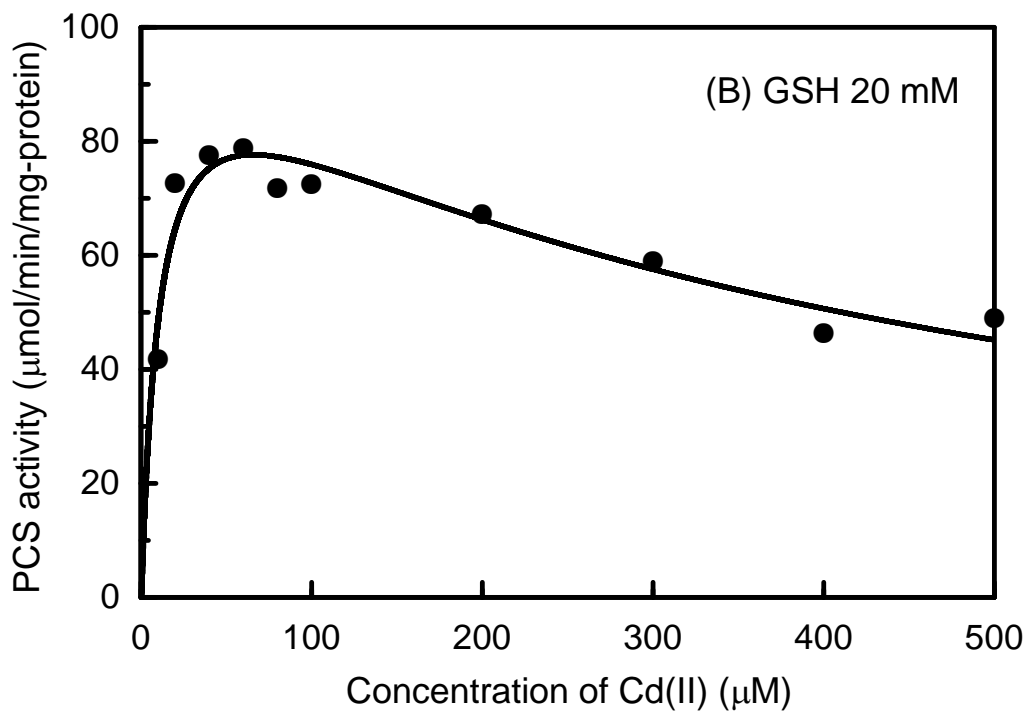
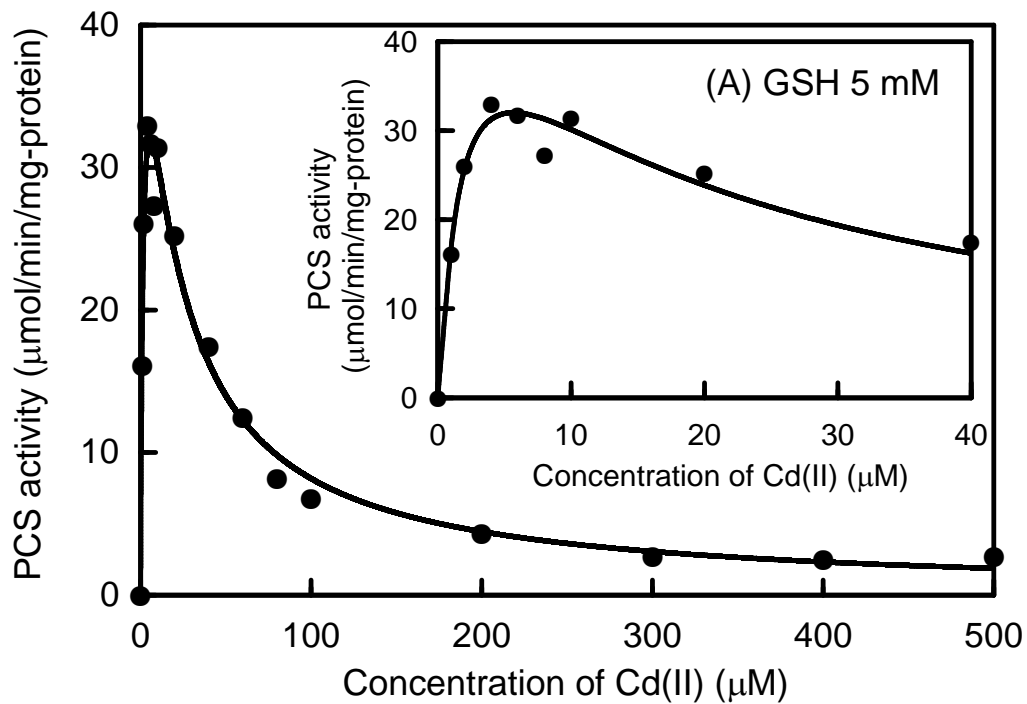


Fig. 3-8 GSH 濃度一定の条件における Cd 濃度と酵素活性
 (A): グラフ内右上部は GSH 0-40 mM の部分を拡大したもの.
 実線はフィッティング曲線

3-3-4. FluoZin-1 を用いた GSH と Cd の結合定数の算出

FZ の溶液に Cd を添加すると, Cd 濃度に従って蛍光強度が増加した(Fig. 3-9). 以後, 測定溶液において, 化学種 X のモル濃度を [X] と, X の化学形態を問わない全モル濃度を, $[X]_{\text{total}}$ と表記する. Cd と FZ の間には, 式(1)に示す化学平衡が成り立っており, この結合定数を式(2)に示すように K_F とする. 測定系中の物質の保存より式(3), (4)が成り立つ. (2)~(4)より [FZ], [Cd] を消去すると式(5)が導かれる. ここで, 式(6)のように蛍光強度 f は [Cd-FZ] に比例するものとし, その比例定数を γ とする. 測定データと理論式から非線形最小 2 乗法により, K_F および γ を求めた(Fig. 3-9). $K_F = 5.021 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $\gamma = 3.905 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ という値が得られた.

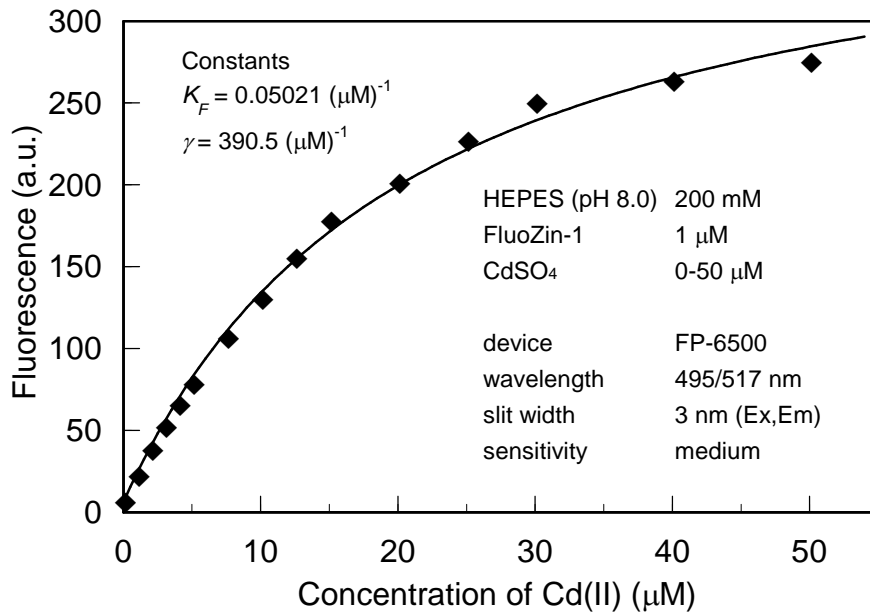
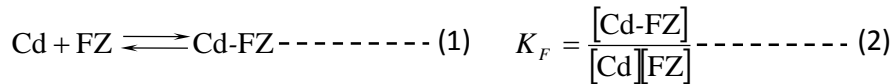


Fig. 3-9 Cd 濃度と FluoZin-1 の蛍光値



$$[\text{FZ}]_{\text{total}} = [\text{FZ}] + [\text{Cd-FZ}] \text{----- (3)}$$

$$[\text{Cd}]_{\text{total}} = [\text{Cd}] + [\text{Cd-FZ}] \text{----- (4)}$$

$$[\text{Cd-FZ}] = \frac{1}{2} \left\{ [\text{Cd}]_{\text{total}} + [\text{FZ}]_{\text{total}} + \frac{1}{K_F} - \sqrt{\left([\text{Cd}]_{\text{total}} + [\text{FZ}]_{\text{total}} + \frac{1}{K_F} \right)^2 - 4[\text{Cd}]_{\text{total}}[\text{FZ}]_{\text{total}}} \right\} \text{----- (5)}$$

$$f = \gamma[\text{Cd-FZ}] \text{----- (6)}$$

次に, FZ と Cd を含む溶液に GSH を添加して蛍光強度を測定した結果を Fig. 3-10 に示す. GSH は Cd に結合するため, GSH の濃度が大きくなるに従って蛍光強度は小さくなった. GSH は水溶液中において Cd と, Cd-GSH, Cd-(GSH)₂ の結合様式を示すことが知られている. Cd, FZ, GSH の間に式(7)~(9)に示した平衡が成り立っており, 物質量の保存から式(10)~(12)が成り立つ. これらから [FZ], [GSH], [Cd-GSH], [Cd-(GSH)₂] を消去したところ, [Cd] および [GSH]_{total} に関して式(13), (14)の関係を導くことができた. [Cd], [Cd-FZ] は蛍光強度 f から, 先に求めた K_F および γ を用いて求めることができる. これにより, 蛍光強度 f と [GSH]_{total} に対して, 式(14)で与えられる関係をもとにして非線形解析を行い, K_{G1} および β_{G2} を決定した. $K_{G1} = 3.229 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $\beta_{G2} = 4.084 \times 10^8 \text{ M}^{-2}$ という値が得られた.

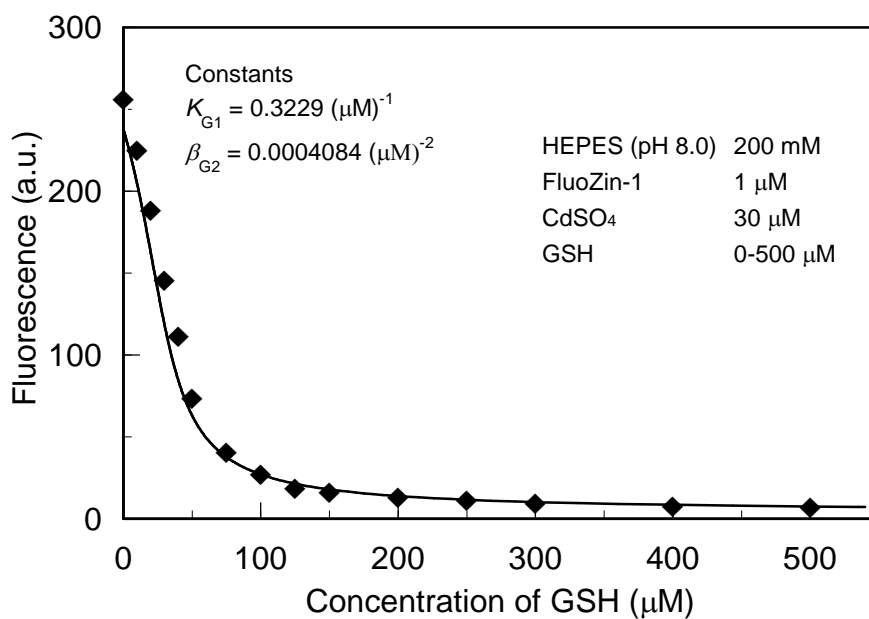
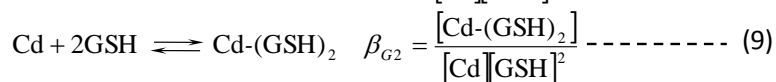
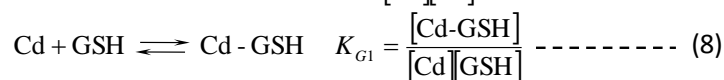
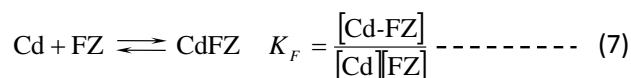


Fig. 3-10 GSH の添加と蛍光強度の変化



$$[\text{FZ}]_{\text{total}} = [\text{FZ}] + [\text{Cd-FZ}] \text{----- (10)}$$

$$[\text{Cd}]_{\text{total}} = [\text{Cd}] + [\text{Cd-FZ}] + [\text{Cd-GSH}] + [\text{Cd-(GSH)}_2] \text{----- (11)}$$

$$[\text{GSH}]_{\text{total}} = [\text{GSH}] + [\text{Cd-GSH}] + 2[\text{Cd-(GSH)}_2] \text{----- (12)}$$

$$[\text{Cd}] = \frac{[\text{Cd-FZ}]}{K_F([\text{FZ}]_{\text{total}} - [\text{Cd-FZ}])} \text{----- (13)}$$

$$[\text{GSH}]_{\text{total}} = \frac{(1-K_{G1}[\text{Cd}])\left(\sqrt{(K_{G1}^2-4\beta_{G2})[\text{Cd}]^2+4\beta_{G2}([\text{Cd}]_{\text{total}}-[\text{Cd-FZ}])[\text{Cd}]-K_{G1}[\text{Cd}]}\right)}{2\beta_{G2}[\text{Cd}]} + 2([\text{Cd}]_{\text{total}} - [\text{Cd}] - [\text{Cd-FZ}]) \text{----- (14)}$$

3-3-5. 遊離 Cd 濃度を一定とした際の酵素活性

[Cd]_{total}と比較して[GSH]_{total}が十分大きい場合、[GSH]は[GSH]_{total}とほぼ等しいと考えることができる。このとき式(8)および(9)と、実験的に求めた K_{G1} と β_{G2} の値から、[Cd-(GSH)₂]と[Cd-GSH]の比は以下の式(15)であらわすことができる。

$$\frac{[\text{Cd}-(\text{GSH})_2]}{[\text{Cd-GSH}]} = \frac{\beta_{G2}[\text{GSH}]_{\text{total}}}{K_{G1}} = 1.25 \times 10^3 [\text{GSH}]_{\text{total}} \quad \text{----- (15)}$$

ゆえに、[GSH]_{total} ≥ 5 mM の場合、[Cd-(GSH)₂]は[Cd-GSH]と比較して十分多いと考えることができる。式(9)および β_{G2} の値から、[Cd-(GSH)₂]と[Cd]の比は以下の式(16)であらわすことができる。

$$\frac{[\text{Cd}-(\text{GSH})_2]}{[\text{Cd}]} = \beta_{G2}[\text{GSH}]_{\text{total}}^2 = 4.09 \times 10^8 [\text{GSH}]_{\text{total}}^2 \quad \text{----- (16)}$$

これより、[GSH]が mM オーダーであるとき、[Cd]は[Cd-(GSH)₂]と比較して非常に小さいことが分かる。このことから、[Cd-(GSH)₂]は[Cd]_{total}とほぼ等しいと考えることができる。なお、反応液中に加えた酵素の濃度(100 ng/mL)は、モル濃度換算で 1.77×10^{-9} M であるため、上記の平衡状態に与える影響は無視できると考えられる。以上の議論より、[Cd]は式(17)であらわすことができ、[Cd]_{total}と[GSH]_{total}²の比を一定に保てば、[GSH]_{total}によらずに一定の値をとるものとみなすことができる。

$$[\text{Cd}] = \frac{[\text{Cd}]_{\text{total}}}{\beta_{G2}[\text{GSH}]_{\text{total}}^2} = 2.45 \times 10^{-9} \frac{[\text{Cd}]_{\text{total}}}{[\text{GSH}]_{\text{total}}^2} \quad \text{----- (17)}$$

式(17)より、GSH 10 mM, CdSO₄ 5 μM の条件での[Cd]を計算すると 1.22×10^{-10} M となる。[Cd]をこの濃度に保ち、GSH 濃度を変化させたときの酵素活性のグラフを Fig. 3-11 に示した。

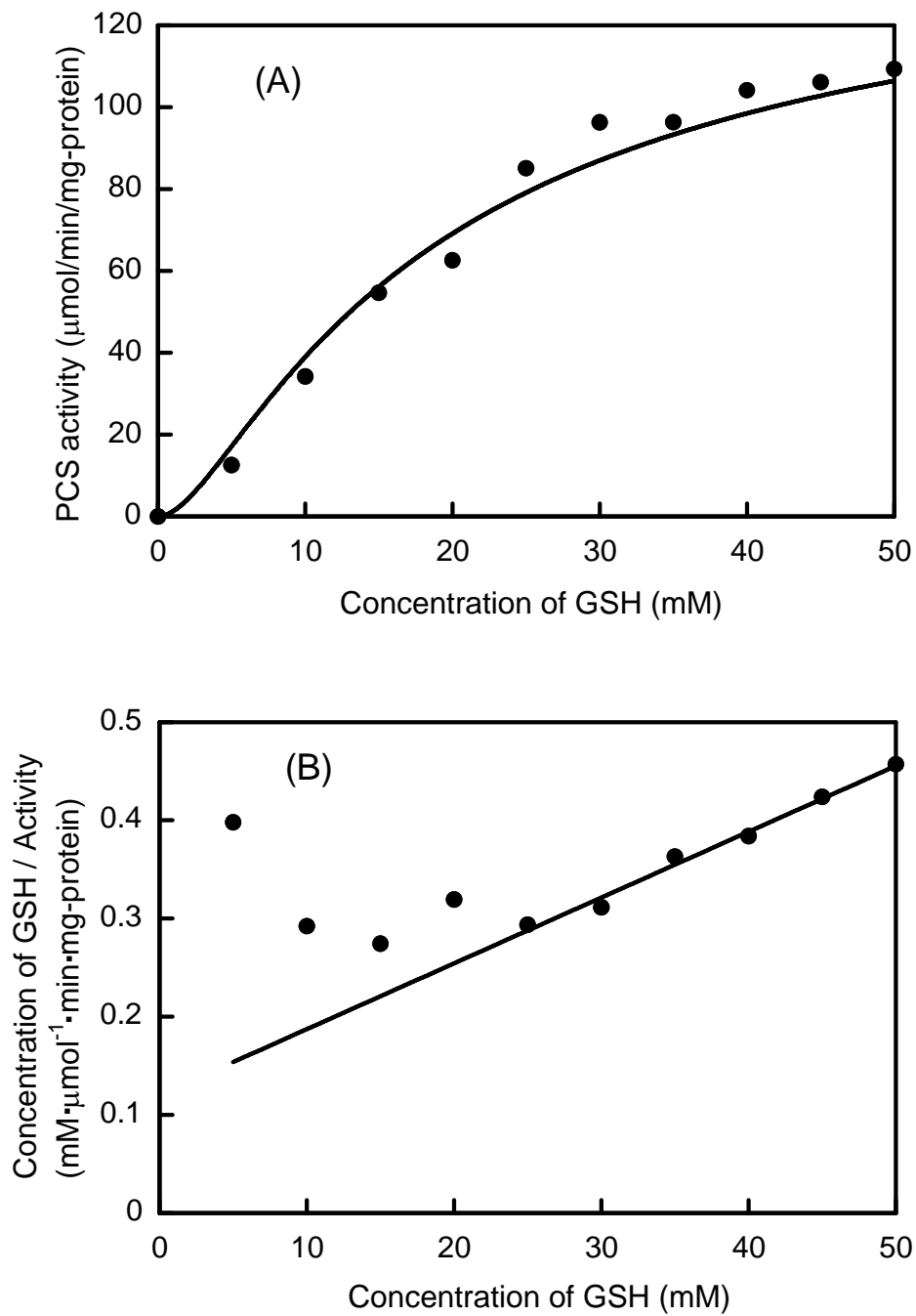


Fig. 3-11 遊離 Cd 濃度を一定とした際の酵素活性
 (A): 遊離 Cd 濃度は 1.22×10^{-10} M. 実線はフィッティング曲線.
 (B): (A)のデータから Hanes plot を作成したもの.

3-3-6. γ EC, desglycyl PC₂を基質とした酵素反応

基質として GSH と同時に γ EC を加えた酵素活性測定の結果を Fig. 3-12 に示した. (A) は γ EC を加えなかったもの, (B) は GSH の濃度と等量の γ EC を加えたものである. γ EC を加えたものについては活性が大きく低下していることが分かる. (B) の GSH 5 mM の点では(A)よりも活性が大きかったが, これは少量の γ EC が Cd をキレートすることにより, 酵素活性阻害サイト(3-4 考察において記述)への Cd の結合が減少したためと考えられた.

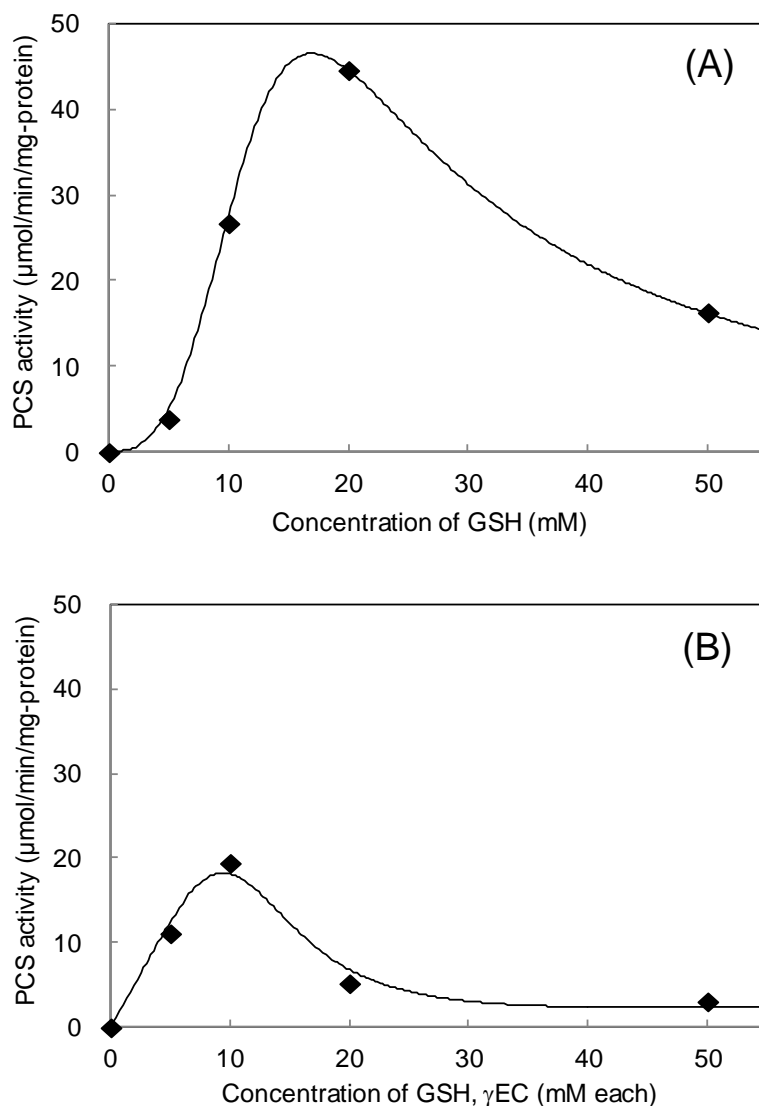


Fig. 3-12 γ EC を加えた酵素活性測定

(A): γ EC なし, (B): GSH と等濃度の γ EC を添加. CdSO₄ 50 μM.

PC₂の他に副産物 (γ EC- γ EC = desglycyl PC₂) の合成はみられなかった.

次に、GSH 濃度を 5 mM に固定し、 γ EC 濃度を変化させた場合の酵素活性を測定した結果を Fig. 3-13 に、酵素反応液のクロマトグラムを Fig. 3-14 に示した。 γ EC を高濃度にしても γ EC- γ EC(= desglycyl PC₂) の合成は起こらないことが分かった。すなわち γ EC は、酵素にアシル化された γ EC のアクセプターにはならないことが分かった。

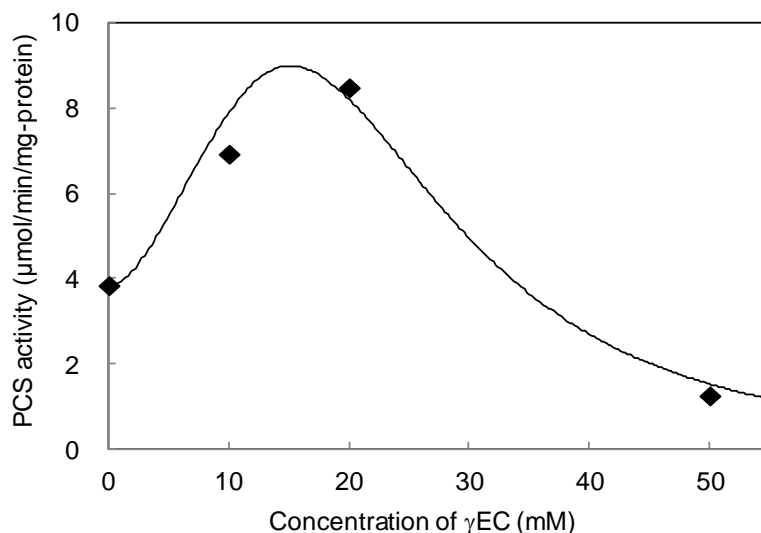


Fig. 3-13 GSH 濃度一定、 γ EC 濃度を変化させた酵素活性測定

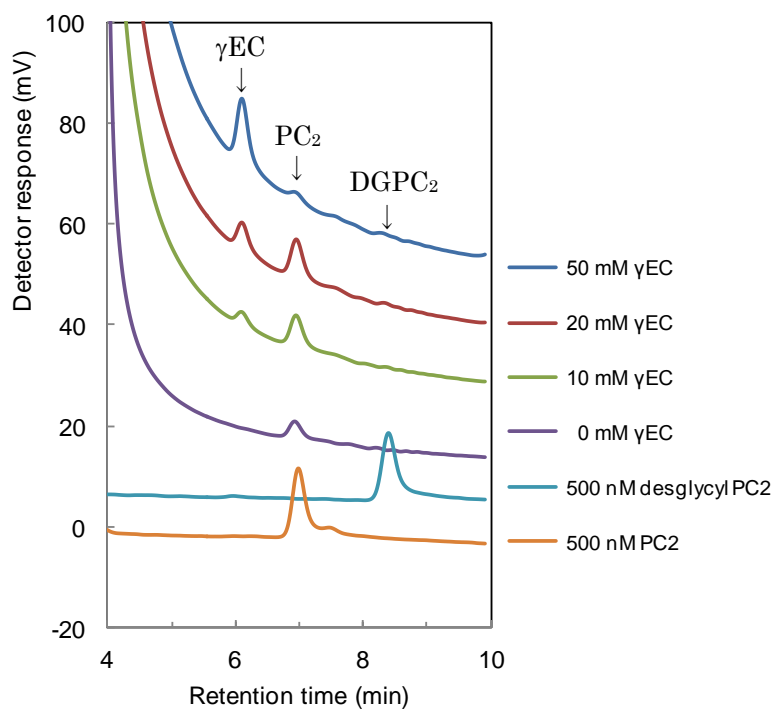


Fig. 3-14 γ EC 濃度を変化させた酵素反応液のクロマトグラム

次に、GSH とともに γ EC- γ EC を基質として加えた場合の酵素反応液のクロマトグラムを Fig. 3-15 に示した。(A)より、 γ EC- γ EC のみでは PC 合成反応は起こらないことが分かった。(C)より、GSH 濃度一定の条件では、添加した γ EC- γ EC の濃度依存的に PC₃ の直後に出てくるピークが大きくなることが分かった。10 mM GSH, 100 μ M γ EC- γ EC の条件では、 γ EC- γ EC の濃度は GSH の 100 分の 1 にも関わらず、この未知ピークの強度は PC₃ と同程度であった。(D)より、 γ EC- γ EC の濃度を 100 μ M で固定して GSH の濃度を変化させた場合、未知ピークの強度は GSH 濃度依存的に大きくなったものの、変化の幅は小さいことが分かった。

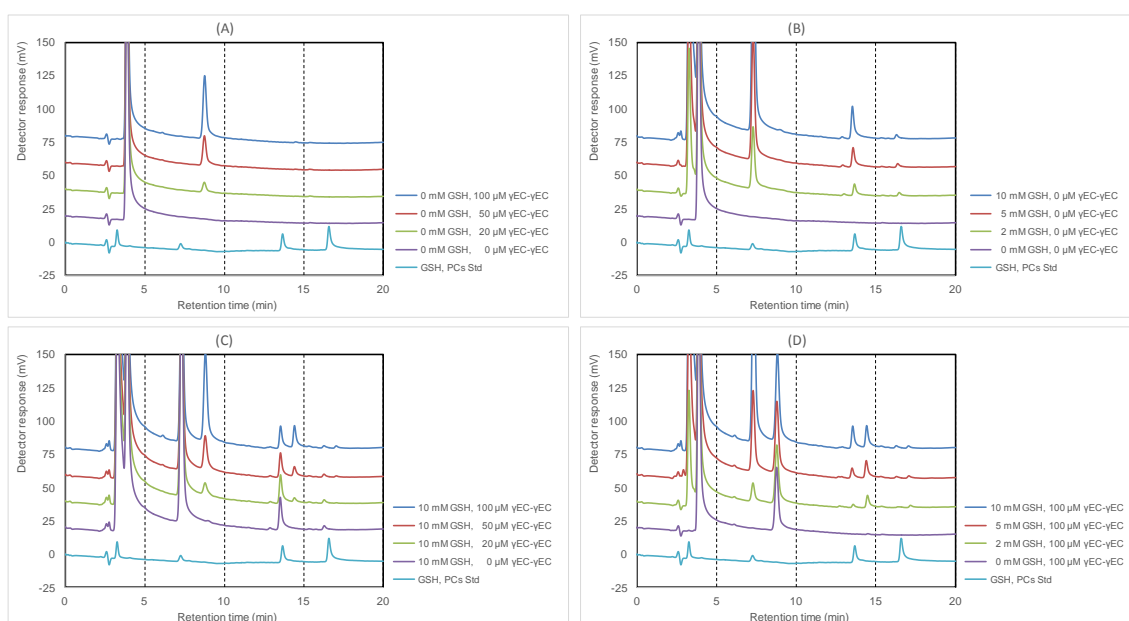


Fig. 3-15 γ EC- γ EC を基質とした酵素反応液のクロマトグラム

カラムは TSKgel ODS-80T_M 4.6 mm ϕ \times 150 mm を、移動相は 5% CH₃CN with 0.1% TFA 溶液を使用した。

スタンダードは GSH 5 μ M, PC₂, PC₃, PC₄ 500 nM を使用した。

3-3-7. 未知ピークの質量分析

PC₃ の直後に出現する未知ピークは、PC₃ の Gly が消失した γ EC- γ EC- γ EC ではないかと考えられた。Gly が消失することで疎水性が上昇し、ODS カラムとの相互作用時間が長くなるためである。この推測を確かめるため、単離精製した未知ピークの質量分析を行った結果を Fig. 3-16 に示した。(B)で観察された分子イオンピークは、 γ EC- γ EC- γ EC の分子量とよく一致した。

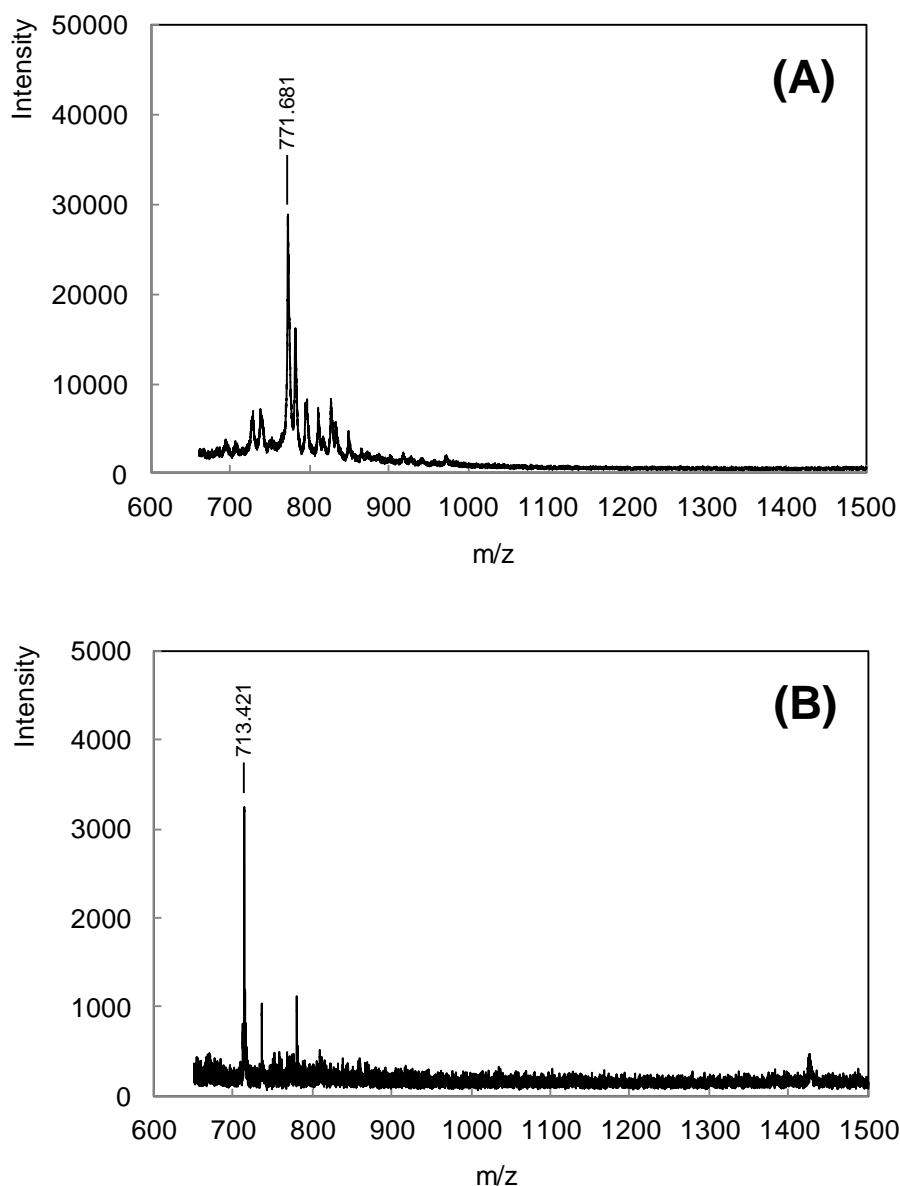


Fig. 3-16 (A):PC₃および (B):未知ピークの MS スペクトル
ネガティブモードで測定、マトリックスには CHCA を使用した。
PC₃ (γ EC- γ EC- γ ECG) は[M]:771.83, γ EC- γ EC- γ EC は[M]:714.78 である。

3-4. 考察

3-4-1. PCS の反応速度論

AtPCS1 の酵素活性測定において、Cd 濃度を一定にして、基質である GSH 濃度を上昇させたところ、酵素活性は GSH 濃度のある一定値までは上昇するが、その後は逆に減少することが明らかとなった(Fig. 3-6, 3-7). この傾向は、Cd 濃度 5, 10, 50, 500 μM の条件において同様に観察された. すなわち、PCS の活性値は単純な Michaelis-Menten 型の反応速度式で記述することができなかった. 最大の酵素活性を示す GSH 濃度が Cd 濃度とともに上昇すること、並びに GSH は Cd に対して高親和性を示すことを考えると、この現象は Cd が PCS と複合体を形成することにより、酵素活性を有するようになるためと解釈することができる. すなわち、GSH の低濃度領域では基質である GSH 濃度の上昇により活性が上昇し、GSH の高濃度領域では GSH 濃度の上昇とともに酵素に結合できる遊離 Cd 濃度が低下して活性型酵素が減少するために、基質濃度は上昇しているのに反して活性値が小さくなると考えられる.

上記の仮説を説明するために、遊離 Cd 濃度一定条件での酵素活性を測定した(Fig. 3-11). この条件では、GSH 濃度の上昇に伴い反応液に加える Cd 濃度も上昇させ、 $[\text{Cd}]_{\text{total}}$ に対する $[\text{GSH}]_{\text{total}}^2$ 比が一定になるように調整した. その結果、GSH 濃度の上昇とともに酵素活性は上昇し、総 Cd 濃度一定の条件で生じたような極大値をとった後の活性の低下はみられなかった.

Vatamaniuk らが提唱していた、PCS の活性化には Cd の結合が必須ではなく、GSH と $\text{Cd}(\text{GSH})_2$ が基質になるというメカニズムは、総 Cd 濃度一定条件の高 GSH 濃度域における活性低下現象と矛盾する. この条件では、総 GSH 濃度が上昇するにつれて、遊離 GSH 濃度も $\text{Cd}(\text{GSH})_2$ 濃度も共に上昇するため、酵素活性値は大きくなるはずであるためである. 仮にこの反応機構が正しいとして今回実験で得られたデータを説明するとすれば、GSH が結合すると活性が阻害される GSH 結合サイトが酵素に存在することである(基質阻害). この場合、遊離 Cd 濃度一定条件での酵素活性の緩やかな上昇(Fig. 3-11(A))は、基質の片側である $\text{Cd}(\text{GSH})_2$ 濃度の上昇が、GSH による阻害効果を上回ったためと考える以外では説明できない. しかしながら、これは Fig. 3-11(A)において GSH 高濃度域での酵素活性が Michaelis-Menten 型の反応になっていることと矛盾することになる. この結果は、高濃度域においては酵素の $\text{Cd}(\text{GSH})_2$ 結合サイトはほとんど飽和しており、また GSH の阻害的結合サイトも存在しないことを示している.

GSH による PCS のアシル化反応は Cd 非存在下でも進行する(Fig. 3-1 ①),

②). PC 合成反応は 2 基質による Ping-Pong 機構であり, 次の一般式(18)であらわすことができる.

$$v = \frac{V_{\max} [A][B]}{K_{mB} [A] + K_{mA} [B] + [A][B]} \text{ ----- (18)}$$

ここで, A および B はそれぞれ酵素と 1, 2 段階目に結合する基質である. K_{mA} および K_{mB} はそれぞれ基質 A, B に対する Michaelis 定数である. A=B の場合, 速度式は通常の Michaelis-Menten 式となる. PCS の場合, Fig. 3-11(B) の Hanes plot は $\text{GSH} < 25 \text{ mM}$ の濃度域で非線形となっているため, 同一の基質ではないと考えられる. この結果は, GSH および $\text{Cd}(\text{GSH})_2$ がそれぞれ 1, 2 段階目の基質になっていると考えるとうまく説明でき, これは Vatamaniuk らの報告と合致する. 式(18)において, $[A]=[\text{GSH}]$, $[B]=[\text{Cd}(\text{GSH})_2]$ とし, 式(16)の関係を代入すると, 遊離 Cd 濃度一定の場合の v は次の式(19)であらわすことができる.

$$v = \frac{V'_{\max} [\text{GSH}]_{\text{total}}^2}{\frac{K_{mB}}{\beta_{G2}[\text{Cd}]} + K_{mA} [\text{GSH}]_{\text{total}} + [\text{GSH}]_{\text{total}}^2} \text{ ----- (19)}$$

この式において V'_{\max} は Cd が結合して活性化している酵素量に依存するので, 直接実測することはできない値である. 式(19)を用いて Fig. 3-11(A) のデータのカーブフィッティングを試みたが満足な結果は得られなかった. これは Fig. 3-11(B) の Hanes plot に示されるように, $\text{GSH} \geq 25 \text{ mM}$ の濃度域での K_{mB} の寄与が小さいためであると考えられた. そのため, まず GSH 濃度 $25 \cdot 50 \text{ mM}$ のデータを用いて, K_{mB} を 0 と設定して V'_{\max} および K_{mA} を最適化した. そのうえで, 全てのデータを用いて, 最適化された V'_{\max} および K_{mA} の元で K_{mB} を最適化した. その結果, $V'_{\max} = 149 \pm 9 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg-protein}$, $K_{mA} = 18.0 \pm 3.2 \text{ mM}$ ($1.80 \pm 0.32 \times 10^{-2} \text{ M}$), $K_{mB} = 5.14 \pm 1.22 \text{ } \mu\text{M}$ ($5.14 \pm 1.22 \times 10^{-6} \text{ M}$) という値が得られた. この値を用いて式(19)の曲線を作成したものを Fig. 3-11(A) に実線で示したところ, 実際の測定値とよく一致することが分かった. また今回求められた K_{mA} , K_{mB} の値は, Vatamaniuk らが過去に報告した値(それぞれに相当する値は $13.6 \pm 3.3 \text{ mM}$, $9.2 \pm 2.3 \text{ } \mu\text{M}$) と近いことが確認された. なお, 式(19)を Hanes plot の形式に書き換えると以下の式(20)となる.

$$\frac{[\text{GSH}]_{\text{total}}}{v} = \frac{\frac{K_{mB}}{\beta_{G2}[\text{Cd}]} + K_{mA} [\text{GSH}]_{\text{total}} + [\text{GSH}]_{\text{total}}^2}{V'_{\max} [\text{GSH}]_{\text{total}}} \text{ ----- (20)}$$

式(20)の曲線を Fig. 3-11(B) の Hanes plot に当てはめたグラフを Fig. 3-18 に示した. $\text{GSH} \leq 20 \text{ mM}$ の濃度域でのデータを説明できていることが分かる.

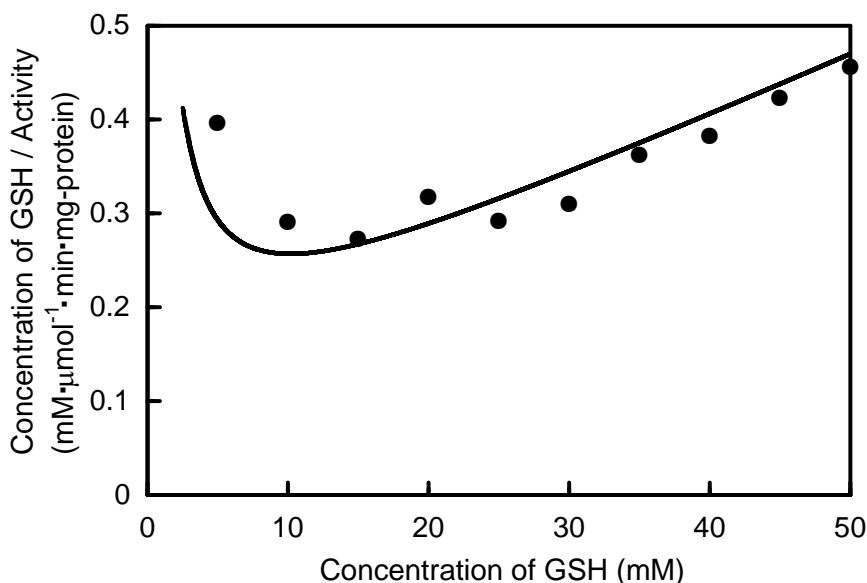


Fig. 3-18 式(20)を用いて作成した Hanes plot の曲線

ここまでの考察で, Cd が酵素に直接結合して酵素を活性化することが明らかとなった. すなわち, 遊離 Cd と *AtPCS1* の間には以下の平衡反応が存在していると考えられ, その結合定数を K_{E1} とおくことができる.



Cd-*AtPCS1* 複合体が酵素活性を有するものとして反応モデルを考察した(Fig. 3-19). なお, GSH の酵素へのアシル化は Cd の有無に関わらず起こるが, アシル化されることによって, Cd との結合定数は影響を受けないと考える.

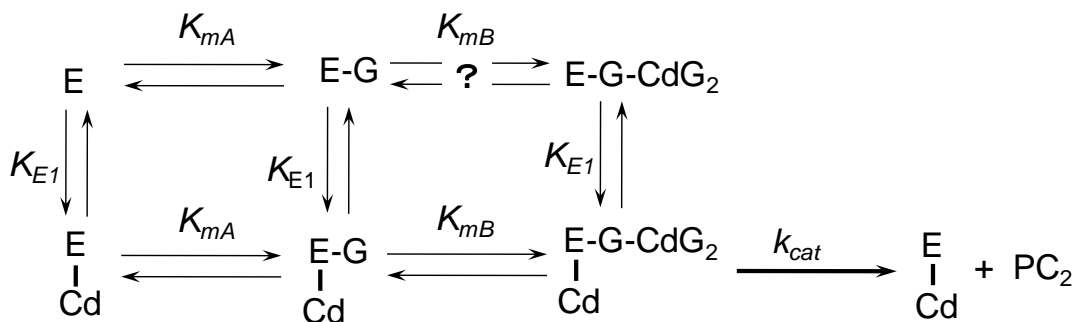


Fig. 3-19 PCS-Cd 複合体が酵素活性を有する反応モデル

E は PCS 酵素, G は GSH を表わす. K_{E1} は PCS と Cd との結合定数, K_{mA} , K_{mB} はそれぞれ酵素と GSH, Cd-(GSH)₂ との Michaelis 定数である. PC₂ は反応産物, k_{cat} は PC₂ 産生段階の反応速度定数である.

このモデルから導かれる反応速度式は式(21)で示される。なお、遊離 Cd 濃度の算出には式(17)を用いた。

$$v = \frac{f_1 V_{\max} [\text{GSH}]_{\text{total}}}{K_{mA} + (1 + \frac{K_{mB}}{[\text{Cd}]_{\text{total}}}) [\text{GSH}]_{\text{total}}}, \quad f_1 = \frac{1}{1 + \frac{\beta_{G2}}{K_{E1}} \cdot \frac{[\text{GSH}]_{\text{total}}^2}{[\text{Cd}]_{\text{total}}}} \quad \text{----- (21)}$$

式(21)は Ping-Pong 型の反応速度式を基本とし、GSH 濃度の上昇に伴う遊離 Cd 濃度の減少によって、活性型酵素の割合が減少する影響を補正したものである。このモデル式の示す曲線を用い、Fig. 3-6 および Fig. 3-7 の各条件での実測値に対して、非線形最小 2 乗法を用いてパラメーターの最適化を行った。\$K_{mA}\$、\$K_{mB}\$の値は、遊離 Cd 濃度一定の条件において得られた値を使用した。最適化されたパラメーター \$V_{\max}\$ および \$K_{E1}\$の値を Table 3-2 に示した。また、Fig. 3-7 のデータについて、最適化されたパラメーターと式(21)を用いて作成した活性曲線を Fig. 3-20 に実線で示した。Cd 濃度が 5, 10 \$\mu\text{M}\$ の条件において、\$V_{\max}\$ および \$K_{E1}\$ は近い値が得られたと考えると差し支えなく、決定係数 \$R^2\$ は 0.9 以上の値が得られた。対して Cd 濃度が 1 \$\mu\text{M}\$ の条件においては、10 \$\mu\text{M}\$ の条件と比較して \$K_{E1}\$ は 10 倍以上の値となり、\$R^2\$ も 0.681 と低い値であった。この原因としては、Cd 濃度が 1 \$\mu\text{M}\$ の条件においては、活性の極大値を与える GSH 濃度(\$K_{E1}\$ が関与する)のデータポイントがなく、GSH 濃度の上昇とともに活性は減少していったためであると考えられる。Fig. 3-20 (b) および (c) のフィッティング曲線は、極大値を与えるデータポイントとの若干のずれはあるものの、実験値と概ね合致する結果であった。

対して、Cd 濃度が 50 \$\mu\text{M}\$ の条件における \$K_{E1}\$ は、Cd 濃度が 5, 10 \$\mu\text{M}\$ の条件と比較して大きくなり、またその標準誤差も得られた推定値の 60% 程度であったことから、フィッティングの精度としては良いものでなかったと判断される。更には、Cd 濃度が 500 \$\mu\text{M}\$ の条件における \$K_{E1}\$ は非常に大きく現実的にあり得ない値に収束した。Cd 濃度が 50, 500 \$\mu\text{M}\$ の条件においては、\$R^2\$ も Cd 濃度が 5, 10 \$\mu\text{M}\$ の条件よりも小さな値となった。Cd 濃度が 50, 500 \$\mu\text{M}\$ の条件において、Table 3-2 のパラメーターを用いて作成したフィッティング曲線を Fig. 3-21 に示した。以上の数値的考察および Fig. 3-21 より、これらの条件において式(21)を用いることは不適當であることが分かった。これは、Fig. 3-6 から分かるように、GSH 濃度が低い領域では活性がシグモイド状に上昇することが理由ではないかと考えられた。GSH 濃度が低い場合には遊離 Cd 濃度が相対的に高くなり、酵素の活性を阻害している可能性が考えられた。そのため、Cd 濃度と酵素活性の関連についてより詳細に調べることにした。

Table 3-2 式(21)を用いて最適化した V_{max} および K_{EI}

Cd _{total} (μM)	Range of GSH _{total} (mM)	V_{max} (μmol/min/mg-protein)	K_{EI} (×10 ⁹ M ⁻¹)	R ²
1	0 – 50	152 ± 22	269 ± 102	0.681
5	0 – 50	193 ± 17	28.4 ± 5.1	0.926
10	0 – 50	302 ± 25	15.9 ± 2.7	0.938
50	0 – 50	255 ± 27	45.5 ± 26.0	0.870
500	0 – 80	205 ± 16	3.45 × 10 ¹⁸	0.771

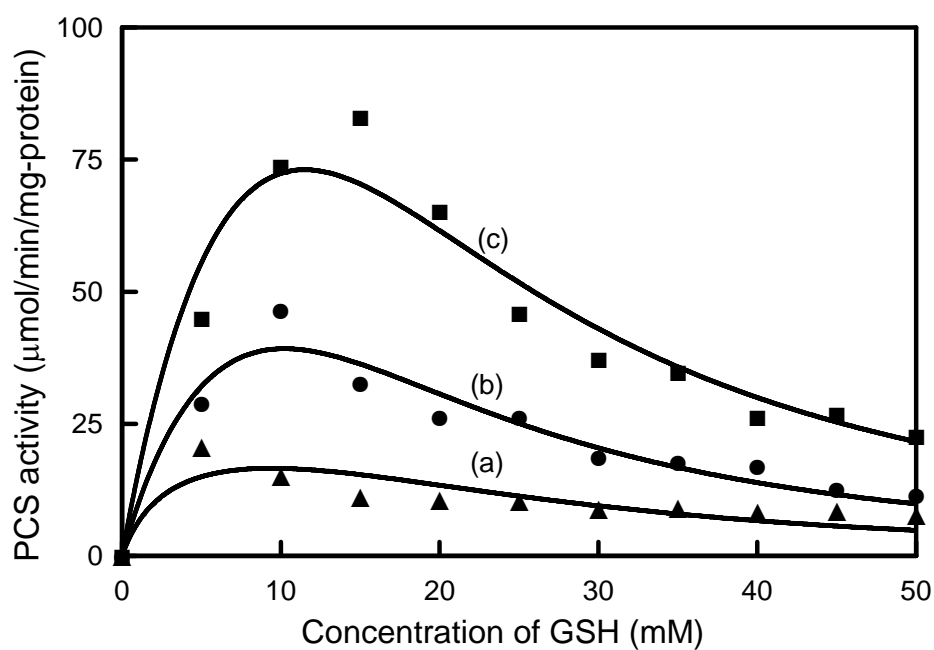


Fig. 3-20 Cd 濃度 1, 5, 10 μM の条件における速度式のカーブフィッティング
(a): Cd 1 μM, (b): Cd 5 μM, (c): Cd 10 μM.

フィッティング曲線は Table 3-2 のパラメーターを用いて作成した.

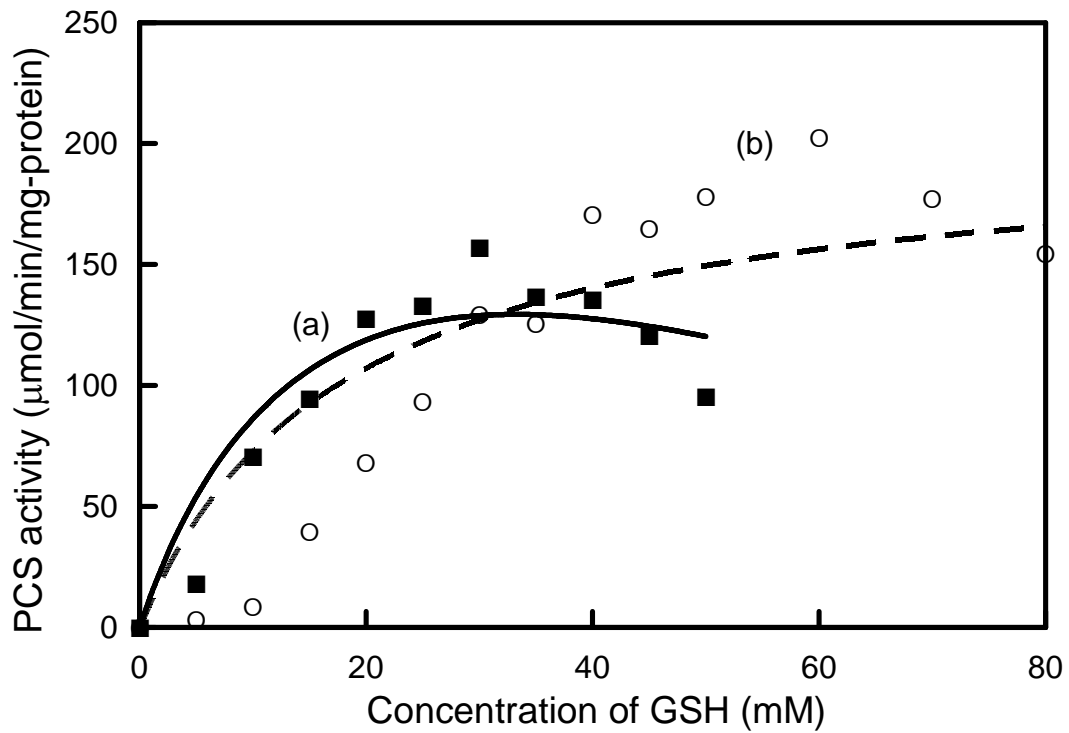


Fig. 3-21 Cd 濃度 50, 500 μM の条件における速度式のカーブフィッティング
 (a): Cd 50 μM, ■, 実線 (b): Cd 500 μM, ○, 破線
 フィッティング曲線は Table 3-2 のパラメーターを用いて作成した.
 フィッティング曲線は特に GSH 低濃度域において, 実測値との解離が大きい.

Fig. 3-8 より, GSH 濃度を一定とした条件では, 酵素活性は Cd 濃度によって変化し, 極大値を与える Cd 濃度が存在することが分かった. また, 一定とした GSH 濃度が大きくなるに従って, 極大値を与える Cd 濃度も高濃度側にシフトすることが分かった. 今回実験を行った条件では, GSH 濃度が一定の場合, Cd 濃度が大きくなるに従って遊離 Cd 濃度, Cd-(GSH)₂ 濃度はともに上昇し, Cd と結合していない GSH 濃度の減少は無視できる程度であると考えられる. 活性型酵素の割合と基質の量が増加するため, 酵素活性は Cd 濃度が大きくなるにつれて寧ろ上昇するはずであり, このことは式(21)からも理論的に導かれる. 高濃度の Cd で酵素活性が低下する現象は, 酵素に活性化サイトとは別に Cd 結合サイトが存在し, そのサイトに Cd が結合することで酵素活性が抑制されると考えると説明することができる. 抑制サイトと Cd とのアフィニティーは, 活性化サイトとのアフィニティーに比べて低いと考えられる. この仮説は, Fig. 3-6 で見られたシグモイド状の活性上昇も説明することができる. Cd 濃度に比べて GSH 濃度が低い濃度域では遊離 Cd 濃度が高くなり, 抑制サイトと Cd が結合して不活性型となった酵素の割合が増えるためであると考えられる. 以上を踏まえると, 遊離 Cd と活性型酵素 Cd-AtPCS1 の間には以下の平衡反応が存在していると考えられ, その結合定数を K_{E2} とおくことができる.



Cd-AtPCS1 複合体が酵素活性を有し, Cd₂-AtPCS1 複合体は不活性型酵素であるとして反応モデルを考察した(Fig. 3-22).

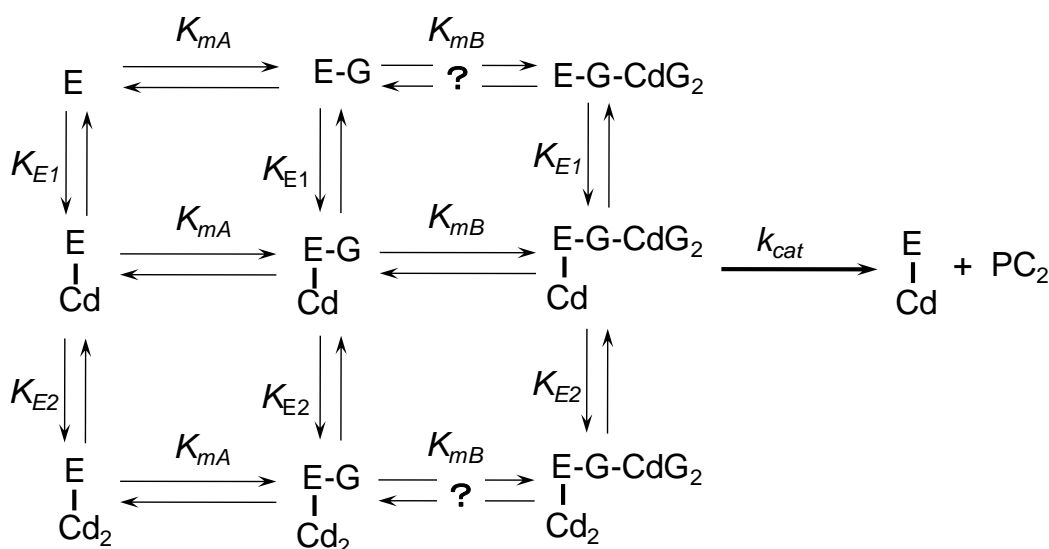


Fig. 3-22 PCS-Cd₂ 複合体が不活性型酵素である場合の反応モデル

このモデルから導かれる反応速度式は式(22)で示される。

$$v = \frac{f_2 V_{\max} [\text{GSH}]_{\text{total}}}{K_{mA} + (1 + \frac{K_{mB}}{[\text{Cd}]_{\text{total}}}) [\text{GSH}]_{\text{total}}}, \quad f_2 = \frac{1}{1 + \frac{\beta_{G2}}{K_{E1}} \cdot \frac{[\text{GSH}]_{\text{total}}^2}{[\text{Cd}]_{\text{total}}} + \frac{K_{E2}}{\beta_{G2}} \cdot \frac{[\text{Cd}]_{\text{total}}}{[\text{GSH}]_{\text{total}}^2}} \quad (22)$$

このモデル式の示す曲線を、Fig. 3-6 および Fig. 3-8 の各条件での実測値に対して、非線形最小 2 乗法を用いてパラメーターの最適化を行った。最適化されたパラメーター V_{\max} , K_{E1} および K_{E2} の値をそれぞれ Table 3-3 および 3-4 に示した。さらに、最適化されたパラメーターと式(22)を用いて作成した活性曲線を Fig. 3-6 および 3-8 に実線で示した。

Table 3-3 式(22)を用いて最適化した V_{\max} , K_{E1} および K_{E2} (Fig. 3-6)

Cd _{total} (μM)	Range of GSH _{total} (mM)	V_{\max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$ /mg-protein)	K_{E1} ($\times 10^9 \text{ M}^{-1}$)	K_{E2} ($\times 10^9 \text{ M}^{-1}$)	R ²
50	0 – 50	399 ± 62	14.2 ± 4.6	0.961 ± 0.442	0.971
500	0 – 80	472 ± 94	4.55 ± 1.88	0.924 ± 0.333	0.984

Table 3-4 式(22)を用いて最適化した V_{\max} , K_{E1} および K_{E2} (Fig. 3-8)

GSH _{total} (mM)	Range of Cd _{total} (μM)	V_{\max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$ /mg-protein)	K_{E1} ($\times 10^9 \text{ M}^{-1}$)	K_{E2} ($\times 10^9 \text{ M}^{-1}$)	R ²
5	0 – 100	244 ± 17	23.4 ± 9.8	0.557 ± 0.081	0.986
20	0 – 500	194 ± 14	25.3 ± 8.6	0.403 ± 0.085	0.968

GSH 濃度一定の場合、5, 20 mM GSH の各条件で最適化された V_{\max} , K_{E1} および K_{E2} は近い値となった。また、これらの値を用いて作成した活性曲線は実際の測定値とよく一致した(Fig. 3-8)。この結果は、A₁PCS1 には Cd が結合する活性化サイトとは別の、抑制性の Cd 結合サイトが存在することを明確に示している。なお、Cd 濃度が高いことで酵素の一部が変性している可能性も考えられたが、遊離 Cd 濃度は 5 mM GSH, 500 μM CdSO₄ の条件においても概算値 49 nM と低濃度であること、CdSO₄ 10 μM を添加して保存した酵素が活性測定時には十分な比活性を示すこと(第 6 章参照)から、変性の影響はないか、あったとしても軽微であると考えられる。また、Cd 濃度 50, 500 μM の条件において、Table 3-2 と Table 3-3 とで算出された K_{E1} および R² を比較すると、式(22)を用いることで K_{E1} の標準誤差は小さくなり、R² の値も 1 に近づいている。Cd 濃度一定条

件における GSH 低濃度域でのシグモイド状の活性上昇(Fig. 3-6)も、式(22)によってうまく説明できることが分かった。

ここまでの考察により、*AtPCS1* には活性化、抑制性の 2 つの Cd 結合サイトが存在することが導かれた(Ogawa *et al.*, 2011). V_{max} , K_{E1} および K_{E2} に関しては、用いたモデル式とデータセットによって若干ぶれはしたものの、概ね同一のオーダーの値に収束したと考えてよい. Table 3-2 の Cd 濃度 1, 50, 500 μM 条件で得られたパラメーターに関しては、用いたデータセットが不十分、もしくはモデル式が適切ではなかったと考えられる. これらの値を除外して、パラメーターの平均値を求めると、 $V_{max} = 301 \pm 48 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg-protein}$, $K_{E1} = (1.86 \pm 0.61) \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $K_{E2} = (7.11 \pm 2.83) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ となった. 実際の結合定数 K_{E2} の値は、式(22)を用いて求められた値よりも大きい値である可能性がある. これは、式(22)は抑制性サイトに Cd が結合すると活性が完全になくなると仮定して導いたモデル式であるためである. しかしながら、例えば GSH 濃度が 5 mM で一定の Fig. 3(A)において、Cd 濃度 500 μM の場合の活性は Cd 濃度 4 μM の場合の約 8%程度であることから、抑制性サイトに Cd が結合した場合、酵素活性が残存するとしても非常に限られたものであることを示しており、今回求められた K_{E2} の値はモデルを考察する上では問題のない信頼度であると考えられる. 遊離 Cd 濃度一定条件での酵素活性(Fig. 3-11)においては、 $[\text{Cd}] = 1.22 \times 10^{-10} \text{ M}$ として酵素の状態の比率を計算すると、*AtPCS1* : Cd-*AtPCS1* : Cd₂-*AtPCS1* = 28.8 : 65.5 : 5.7 となる. この値から $V_{max} = 227$ と求まり、先ほど算出した V_{max} の平均値とよく一致することが分かる.

今回の実験から求められた K_{E1} の平均値は、 $1.86 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ であり、これは解離定数としては、 $1/K_{E1} = 5.4 \times 10^{-11} \text{ M}$ である. この値は Vatamaniuk らが計算している解離定数 $5.4 \times 10^{-7} \text{ M}$ と比べるとかなり小さいものであった. また、彼らが SOLCON プログラムを用いて計算している遊離 Cd 濃度は、GSH 3.3 mM, CdCl₂ 25 μM の条件で $6.638 \times 10^{-13} \text{ M}$ であるが、今回の実験で算出した β_{G2} の値から求めると、 $5.6 \times 10^{-9} \text{ M}$ となり、約 1000 倍も大きい値となった. Vatamaniuk らは、解離定数が 10^{-6} M オーダーに対し、遊離 Cd 濃度は 10^{-13} M オーダーであることから、酵素反応時において *AtPCS1* と Cd は結合しないと結論付けている. しかしその解離定数は平衡透析法で求めたものであり、*AtPCS1* に存在する 7 つの Cd 結合部位の平均値としての値を示したものである. この点を考慮すれば、本研究で得られた値との矛盾はない. すなわち、7 つの結合部位の中には、Cd との親和性が平均値より数オーダー高い結合部位が存在すると考えられる. また、遊離 Cd 濃度は彼らが予測した値よりも実際にはかなり

大きい値であると考えられる。今回の実験で得られた K_{EI} の値と遊離 Cd 濃度の値は、GSH の存在下で遊離 Cd 濃度が下がっている状態においても、酵素に対して Cd が十分に結合可能であることを示すものである。

なお、*AtPCS1* に存在する抑制性の Cd 結合サイトについては、生物学的な意義は不明である。細胞内においては、GSH が mM オーダーで存在することに加え、Cd の暴露により速やかに PC の合成や Cd-PC 複合体の輸送により解毒が図られ、細胞内の遊離 Cd 濃度は抑制性の Cd 結合サイトに結合できる濃度まで大きくなることはないと考えられる。この現象は、遺伝子組換え酵素を調製し、様々な条件で *in vitro* 酵素活性測定を行った結果判明したタンパク質の特性であると考えられる。

Cd 結合による γ EC 基の転移反応の反応機構を考察する。PCS に Cd が結合することで構造が変化し、 γ EC 基のアシル化部位(Cys⁵⁶)とアクセプターである Cd-(GSH)₂ 認識部位が空間的に近接することが考えられる。また、これまでの研究報告では、GSH から PC が合成される過程において、副産物として同時に γ EC が生じることが分かっている (Tsuji *et al.*, 2005; 吉富, 2009)。すなわち、アシル化された PCS から γ EC が生じる加水分解反応と、 γ EC 基の Cd-(GSH)₂ への転移反応が、どちらも Cd 存在下でのみ触媒されることから、次のような反応機構が推定される (Fig. 3-23, Cd 結合位置は便宜上 N ドメイン上に図示)。Cd は *AtPCS1* のアシル化部位の、立体構造上での近傍に結合し、アシル化した γ EC 基のカルボニル基の電子を引きよせ、カルボニル炭素を正に帯電させることで、求核反応を受けやすいように活性化した反応中間体を形成すると考えられる。この反応中間体を形成した後、*AtPCS1* にアシル化された γ EC 基がアクセプター分子に転移する反応が起こると考えられる。例えば、H₂O がアクセプターである場合は、H₂O の O 原子の電子対が γ EC 基の Cys の正に帯電したカルボニル炭素に対して求核反応を起こし、チオエステルを加水分解して γ EC が生じる。Cd-(GSH)₂ がアクセプターである場合は、同カルボニル炭素に対して Cd-(GSH)₂ の N 末端 Glu のアミノ基の N 原子の電子対が求核反応を起こして、ペプチド結合が形成されて PC₂ が合成されることが考えられる。 γ EC 基の転移反応機構の詳細は、Cd 結合部位の解析や、PCS の立体構造解析などによって今後明らかにされるものと考えている。

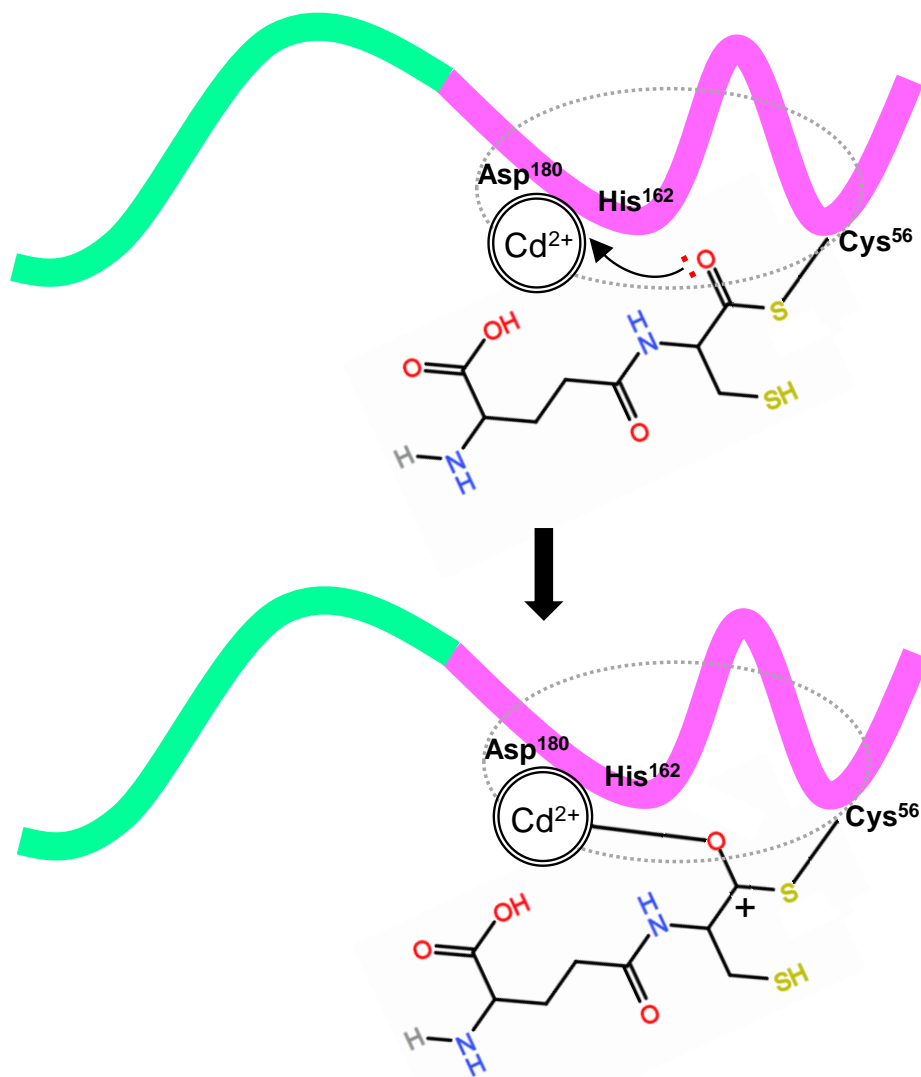


Fig. 3-23 Cd 結合による γ EC 基の転移反応機構の仮説を示す模式図

3-4-2. PCS の基質認識機構

GSH, γ EC をともに基質として添加した酵素反応においては PC_2 のみが合成され, γ EC- γ EC は合成されなかった. このことより γ EC は, $PCS-\gamma$ EC アシル化複合体からの γ EC 基のアクセプターとしては機能しないことが分かった. しかし GSH とともに γ EC- γ EC を基質として添加した場合には γ EC 基の転移反応が生じ, γ EC- γ EC- γ EC が産物として生じた. これは PC_2 が PC_3 産生の基質として使用される場合と類似している. PC_2 の合成時には $Cd-GSH_2$ が基質となるが, GSH と同様に γ EC も Cd と結合するため, $Cd-\gamma EC_2$ として存在しているが PCS に認識されていないものと考えられる. *AtPCS1* の 3D モデルを作成し, アシル化部位近傍のポケットと γ EC 基とのドッキングシミュレーションを行った報告が存在するが (Chia *et al.*, 2013), γ EC 自体が基質としては認識されないことから, 不完全なモデルであると考えられる. Fig. 3-24 に, 基質とならない γ EC, 基質となる GSH(= γ ECG) および γ EC- γ EC の構造式を示した. これらの構造式を見比べて分かることは, 基質となる GSH, γ EC- γ EC には N 末端から 3 残基目の同一の位置にカルボキシル基が存在していることである (赤枠内). iso-PC と呼ばれる, $(\gamma EC)_n$ -Xaa の C 末端の Xaa が Gly ではなく β -Ala, Glu, Gln, Ser などに置換されたものを考えても, 初めに γ EC-Xaa が基質となっている段階では同一の位置にカルボキシル基が存在している. この位置のカルボキシル基の形状および負電荷が基質認識において決定的に寄与していることが示唆される. Chia らの報告においては, 変異体を用いた活性評価から Arg¹⁵², Lys¹⁸⁵ 等のアミノ酸が活性に重要であることが明らかになっている. これらの正電荷を有するアミノ酸が, 基質の N 末端から 3 残基目の位置のカルボキシル基と相互作用している可能性が考えられる.

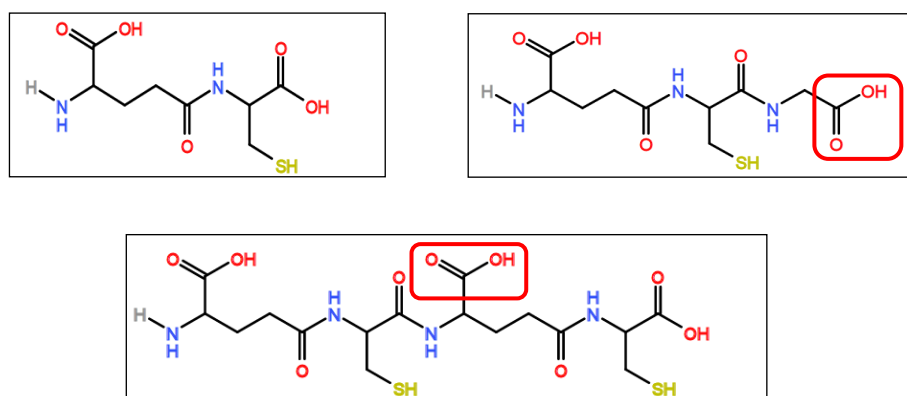


Fig. 3-24 γ EC, GSH(= γ ECG), γ EC- γ EC の構造式 (赤枠は同一位置の-COOH)

第4章 *At*PCS1 を用いたアミノ酸改変による

機能部位解析と安定化 PCS の作製

4-1. 序

4-1-1. PCS の Cys 残基変異と酵素活性

前章では、PCS の活性化機構について主に酵素反応速度論の観点から解析を行った。しかしながら、PCS のどの部分に Cd^{2+} イオンが結合して活性型酵素になるのか、 γEC 基のアクセプターとなる $\text{Cd}-(\text{GSH})_2$ が具体的にどのアミノ酸残基と相互作用をしているのか等の詳細な情報は得られていない。

このような情報を得るためには、X 線結晶構造解析が最も有効な手段であるが、PCS の発見から 20 年以上が経った現在でも、活性を有する PCS の結晶構造は得られていない。唯一得られている *Ns*PCS の結晶構造は N 末端側領域に限定されたものであるが、アシル化部位、catalytic triad に関する情報は得られている (Vivares *et al.*, 2005)。しかしながら現在でも、この結晶構造を鋳型としてホモロジーモデルを構築できるのは PCS の N 末端側領域のみである。C 末端側領域は十分な相同性を有する類似結晶構造が存在せず、その立体構造は依然として手がかりさえつかめない状況である。

一方で、遺伝子工学的手法を用いた変異 PCS の解析により、特定のアミノ酸残基の活性への寄与が調べられている。そのうち Cys 残基に関するものを Table 4-1 にまとめた。また、特定のドメインを欠失させることによる活性への影響も検討されている (Romanyuk *et al.*, 2006; Ruotolo *et al.*, 2004)。また、Cys 残基以外のアミノ酸残基にも注目して変異体を作製し、Cd 結合に関与する残基の検討を行った知見も存在する (Chia *et al.*, 2013)。俯瞰してみると、Cys 残基の point mutation を行った研究は多くなく、また評価方法も揃っていないために確定的な結論を導くのは難しい。また、活性や Cd 結合性に着目した研究は多いが、PCS 活性の保存安定性に着目したものはほとんどないと思われる。

Table 4-1 *AtPCS* の Cys 変異体と酵素活性

N ドメイン							C ドメイン										評価 法	活 性	
56	90	91	109	113	138	144	231	342	343	358	359	363	366	402	404	471			
S																		a	×
	S																	a	○
		S																a	○
			S															a	○
				S														a	○
	S	S	S	S														b	○
										A	A	A	A					c	△

a: 遺伝子導入酵母の Cd 耐性能, および PC 合成能で評価(Vatamaniuk *et al.*, 2004)

b: 遺伝子導入酵母の Cd 耐性能で評価(小川, 2010)

c: 大腸菌で発現させた酵素を精製して *in vitro* で評価(Vestergaard *et al.*, 2008)

○: WT と同程度の活性, △: WT よりも低い活性, ×: 活性なし

A は Ala に, S は Ser に置換を示す.

4-1-2. 目的

前述のように, PCS の完全な結晶構造は得られておらず, また C ドメイン中に存在する Cys の機能も未知な部分が多い. PCS はフリーの Cys に富んだアミノ酸配列を持ち, 溶存酸素等の影響を受けやすく不安定であると考えられ, 実際のところ冷蔵条件では失活しやすい(第 6 章参照). このことは結晶化を試みる上でも不利な性質であると考えられる. 本章では, *AtPCS1* に存在する Cys を Ser に置換した様々な変異 *AtPCS1* を用いて, その活性を調べることにより各 Cys 残基の活性への寄与の有無を明らかにするとともに, より多くの Cys を改変し, 安定性の向上した改変 PCS の作製を試みることを目的とした.

なお, 本章の実験は 2013-2014 年度に当研究室の修士課程に在籍していた堀内志保氏と共同で行った.

4-2. 実験手法

4-2-1. 使用遺伝子, ベクター, 菌株

3-2-1 で示した方法で作製した, pET28b_*AtPCS1* ベクターを用いて野生型の *AtPCS1* を発現させた. 本章の実験では全て, pET28b ベクターを発現ベクターとして, *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Novagen) を発現宿主として用いた.

4-2-2. 種々の Cys 変異 *AtPCS1* 発現ベクターの作製

作製した変異 *AtPCS1* は Table 4-2 に記載した. pET28b_*AtPCS1* ベクターをテンプレートに用いて, Table 4-3 に示したプライマーと PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Takara) を用いて PCR により塩基配列を増幅した. 2 断片を混合して *AtPCS1*-fwd, *AtPCS1*-rev プライマーで再度 PCR を行い, 1 つの変異導入断片を得た. 複数個所への変異導入には, 既に他の個所への変異導入に成功したベクターをテンプレートとして用いて同様の操作を実施した.

得られた DNA 断片を pET28b ベクターにサブクローニングし, 目的の遺伝子が正しく挿入されていることを DNA シークエンサーにより確認した. 作製したプラスミドで *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Novagen) を形質転換した. pET28b, pET28b_*AtPCS1* で形質転換した大腸菌をそれぞれ mock, *AtPCS1*(WT)を示した. 変異体に関しては, 例えば Table 4-2 のプラスミド A1 で形質転換した大腸菌を A1 と示した.

Table 4-2 作製した Cys 変異 *AtPCS1* のリスト

Clone name	N ドメイン							C ドメイン									
	56	90	91	109	113	138	144	231	342	343	358	359	363	366	402	404	471
A1						S	S				S	S	S	S	S	S	
A2						S	S				S	S	S	S			S
A3											S	S	S	S	S	S	S
A4						S	S				S	S	S	S			
A5											S	S	S	S	S	S	
A6											S	S	S	S			S
A7						S	S				S	S	S	S	S	S	S
A8											S	S	S	S			
B1		S	S														
B2				S	S												
B3						S	S		S	S	S	S	S	S	S	S	
B4						S	S	S			S	S	S	S	S	S	
B5						S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
C1		S															
C2			S														
C3				S													
C4					S												
C5		S		S		S	S		S	S	S	S	S	S	S	S	
C6		S			S	S	S		S	S	S	S	S	S	S	S	
C7			S	S		S	S		S	S	S	S	S	S	S	S	
C8			S		S	S	S		S	S	S	S	S	S	S	S	

Table 4-3 種々の Cys 変異 *AtPCS1* のクローニングに用いたプライマー

Primer	Sequence (5'→3')	制限酵素部位
<i>AtPCS1</i> -fwd	GAGAGCTAGCATGGCTATGGCGAGTTTATATCG	<i>Nhe</i> I
<i>AtPCS1</i> -rev	GAGAGAATTCCTAATAGGCAGGAGCAGCGAGATC	<i>EcoR</i> I
<i>AtPCS1_C90S</i> -fwd	CAATGTTGGATTCTGCGAACCTCTG	
<i>AtPCS1_C90S</i> -rev	CAGAGGTTTCG CAGGAATCCAACATTG	
<i>AtPCS1_C91S</i> -fwd	GTTGGATTGCTCGAACCTCTGGAAG	
<i>AtPCS1_C91S</i> -rev	CTTCCAGAGGTTTCG GAGCAATCCAAC	
<i>AtPCS1_C90, 91S</i> -fwd	GTTGGATTCTCTCGAACCTCTGGAAG	
<i>AtPCS1_C90, 91S</i> -rev	CTTCCAGAGGTTTCG GAGGAATCCAAC	
<i>AtPCS1_C109S</i> -fwd	GAAAAGTTGTCTCTTTGGCTCATTG	
<i>AtPCS1_C109S</i> -rev	CAATGAGCCAAAAGAGACAACCTTTTC	
<i>AtPCS1_C113S</i> -fwd	GTTTGGCTCATTCTTCAGGAGCAAAG	
<i>AtPCS1_C113S</i> -rev	CTTTTGCTCCTGAAGAATGAGCCAAAC	
<i>AtPCS1_C109, 113S</i> -fwd	CTTTGGCTCATTCTTCAGGAGCAAAG	
<i>AtPCS1_C109, 113S</i> -rev	CTTTTGCTCCTGAAGAATGAGCCAAAG	
<i>AtPCS1_C138, 144S</i> -fwd	GTCGTCAAATCCACGAGTTCTGAGAATTCTCATATGATC	
<i>AtPCS1_C138, 144S</i> -rev	GATCATATGAGAATTCTCAGAACTCGTG GATTTGACGAC	
<i>AtPCS1_C231S</i> -fwd	ACTCTGAGCTCCAAGGATGAAAGC	
<i>AtPCS1_C231S</i> -rev	GCTTTCATCCTTG GAGCTCAGAGT	
<i>AtPCS1_C342, 343S</i> -fwd	GCAAAGGCTTCTTCCAAGGAGCT	
<i>AtPCS1_C342, 343S</i> -rev	AGCTCCTTGGGAAGAAGCCTTTGC	
<i>AtPCS1_C363, 366S</i> -fwd	TCGGGAAACTTCCGTGAAATCCATCAAAGGTCCTGATGACTC	
<i>AtPCS1_C358, 359, 363S</i> -rev	ACGGAAGTTTCCCGAGAAGAAAACCTTTTGATGGGCTTC	
<i>AtPCS1_C402, 404S</i> -fwd	GAGTCTGAATCTGGTCCTGAAGCAACTTATC	
<i>AtPCS1_C402, 404S</i> -rev	ACCA GATTCA GACTCAGTTTTCGTTCGATGGC	
<i>AtPCS1_C471S</i> -rev	GAGAGAATTCCTAATAGGCAGGAGCAGCGAGATCATCCTCTTC CTTGTTCTCTTGGGATCGTTTTAGCAGCTGAAGT	<i>EcoR</i> I

4-2-3. *AtPCS1* および変異体の発現チェック

mock, *AtPCS1*(WT), A 群, B 群, C 群の大腸菌それぞれを, カナマイシン (Kanamycin, Km), クロラムフェニコール(Chloramphenicol, Cm)を添加した 2 mL の LB 培地に植菌して 37°C で 18 h 振盪培養(前培養)した. $OD_{600} = 0.4$ に調整し, 25°C で 2 h 振盪培養した後, IPTG 40 μ M を添加し, 25°C で 16 h 振盪培養(本培養)した. 濁度の測定には分光光度計 V-550 (JASCO) を用いた. 培養液 2 mL 分を集菌し, 200 μ L の抽出バッファー(25 mM Tris-HCl (pH8.0), 400 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% Tween20, 1 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)を加えて冷却しながら超音波破碎 (U200S control, IKA Labortechnik) を 1 min 行った(*1). この菌体破碎液を遠心分離 (22,000 $\times g$; 10 min, 4°C)し, 上清を回収し菌体粗抽出液とした(*2). *1 を Total(T)画分, *2 の上清(菌体粗抽出液)を Soluble(S)画分, *2 の沈殿を 200 μ L の抽出バッファーに懸濁したものを Precipitation(P)画分として, SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングによる *AtPCS1* および変異体の発現チェックに用いた. pET28b ベクターを用いると, 目的タンパク質の N 末端側に His が 6 残基付加して発現されることを利用して, ウエスタンブロッティングでは一次抗体に Monoclonal Anti-polyHistidine antibody produced in mouse (Sigma) を 1/3000 希釈で, 二次抗体に Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) preadsorbed (abcam) を 1/10000 希釈で用いた. 検出試薬は ECL Prime Western Blotting Detection System (GE Healthcare)を用い, ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) で化学発光検出を行った. 感度は high, 露光時間は 10 sec とした.

4-2-4. 大腸菌粗抽出液を用いた PCS 活性の測定

AtPCS1(WT), A 群, B 群, C 群の大腸菌について, 菌体粗抽出液の PCS 活性を PC₂ 合成量によって評価した(3-2-3 で示した方法に準じた). 具体的には, 100 μ L の酵素反応液(200 mM HEPES-NaOH (pH 8.0), 10 mM GSH, 10 mM 2-mercaptoethanol, 50 μ M CdSO₄, 100 ng/mL BSA)に 2.5 μ L の菌体粗抽出液をそれぞれ加えた. 35°C で 15 min インキュベートした後, 25 μ L の 10% TFA を加えて混和し, 氷上で冷却することで反応を停止させた. 反応液を 0.1% TFA で希釈し, HPLC により合成された PC₂ 濃度を定量した. 内標準物質として, 終濃度 500 nM の desglycyl PC₂ を添加した.

4-2-5. *AtPCS1*(WT), *AtPCS1*(B3)の大量精製

AtPCS1(WT)大腸菌と *AtPCS1*(B3)大腸菌を 100 mL の LB 培地(+Km, +Cm)に加えて 37°C で 18 h 振盪培養(前培養)した. 500 mL の LB 培地にスケールアップし, 25°C で 2 h 振盪培養した. $OD_{600} = 0.4$ に調整して 2 L の LB 培地にス

ケールアップし、25°Cで2 h 振盪培養した。IPTG 40 μ M を添加後、25°Cで16 h 振盪培養(本培養)した。2 L の菌体培養液を100 mL ずつ小分けにして遠心して集菌し、液体窒素中で急速凍結した後、-80°Cで保存した。100 mL の培養液から回収した菌体当たり、10 mL の抽出バッファー(25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 400 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% Tween20, 1 mM DTT, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM imidazole)を加えて冷却しながら超音波破碎(SONIFIER 250D)を5 min 行った。この菌体破碎液を遠心分離(13,000 \times g, 10 min, 4°C)し、上清を回収した(S1 画分)。得られた沈殿には5 mL の抽出バッファーを加えて1回目と同様に超音波破碎を3 min 行い、遠心し、上清を回収した(S2 画分)。S1 画分と S2 画分を混合し、0.45 μ m フィルター(Millipore)に通したものを菌体粗抽出液とした。

回収した菌体粗抽出液について、HisTrap HP 1 mL (GE Healthcare) を用いて FPLC による *AtPCS1*, *AtPCS1(B3)* の大量精製を行った。FPLC の条件は Table 4-4 に示した。FPLC による精製から得られた *AtPCS1(WT)* および *AtPCS1(B3)* を含む溶出画分について、NAP-25 Column (GE Healthcare) を用いてバッファー置換を行った。平衡化には 12.5 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 62.5 mM NaCl, 1.25 mM DTT 組成のバッファーを用いた。2.5 mL の FPLC 溶出画分を添加し、3.5 mL で回収した画分を、Amicon Ultra-15 30kDa (Millioire) を用いて限外濾過により濃縮した。濃縮により得られた溶液について、Nanodrop (Thermo Scientific) によりタンパク質濃度を測定し、50% Glycerol を 1/5 vol. (最終溶液組成 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% Glycerol) となるように添加し、精製酵素溶液とした。液体窒素中で小分けにして急速凍結した後、-80°Cで保存した。*AtPCS1(WT)*, *AtPCS1(B3)* の吸光係数はそれぞれ 1.087, 1.090 ($L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$)を用いた(Pace *et al.*, 1995)。

Table 4-4 FPLC を用いた精製条件

バッファー	imidazole 以外の組成	20 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 500 mM NaCl, 1 mM DTT
	imidazole	平衡化: 40 mM 洗浄: 80 mM 溶出: 80 mM → 200 mM (10 mM/min Linear gradient)
流速	1.0 mL/min	
検出器	UV 280 nm (光路長 2 mm)	

4-2-6. *AtPCS1*(WT), *AtPCS1*(B3)の保存安定性の検討

酵素溶液 A(200 mM HEPES-NaOH (pH 8.0), 10 mM 2-mercaptoethanol, 10 ng/μL BSA, 10 ng/μL PCS), B(A に 10 μM CdSO₄を加えたもの), C(A に 1 mM GSH を加えたもの)を作製し, A~C の溶液を 4°C および 25°C に置き, 1, 2, 4, 6 日目に酵素活性の測定を行い, 保存性安定を検討した.

4-2-7. *AtPCS1*(WT)の 3D モデル構造の作成

モデリングソフトウェアとして MOE 2013.08 (CCG) を使用した. 力場パラメーターは Amber10EHT, Solvation: Born を設定した. 鋳型として PDB: 2BTW を使用した.

4-2-8. *AtPCS1*(WT), *AtPCS1*(B3)の SH 基の定量

AtPCS1(WT)と *AtPCS1*(B3)について, 4-2-5 で得られた精製酵素溶液を用いて, DTNB 法(Ellman *et al.*, 1959)により SH 基の定量を行った. 保存溶液中の DTT を除くため, Amicon Ultra-0.5 mL 遠心式フィルター (Millipore) を用いて, 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 50 mM NaCl にバッファー交換した. DTNB をリン酸緩衝液(pH 7.0)に溶解し, 10 mM DTNB 溶液を調製した. DTT を除いた精製酵素溶液 90 μL に, リン酸緩衝液(pH 8.0) 60 μL と超純水 150 μL を加えた. DTNB 溶液 2 μL を加え, 経時的に 412 nm の吸光度を測定した.

4-2-9. *AtPCS1*(WT)の結晶化条件のスクリーニング

AtPCS1(WT)について, 4-2-5 で得られた精製 *AtPCS1* 溶液を用いて結晶化条件のスクリーニングを行った. スクリーニングキットは Crystal Screen・Crystal Screen 2 (Hampton Research) を使用し, 計 98 種類の試薬溶液を試した. 96

穴ウェルプレート MRC-2(AS ONE)を用い、シットティングドロップ法により行った。プレートのリザーバーウェルに 100 μL のバッファーを入れ、ドロップウェルに 1 μL の精製 *A β* PC51 溶液を入れ 1 μL のバッファーと混合し、マイクロプレートシール(AS ONE)を貼った。プレートを 20°C に静置し、実体顕微鏡 (SMZ1500, NIKON) より経過観察を行った。

4-3. 結果

4-3-1. 各種変異 *AtPCS1* の発現の確認

各種変異 *AtPCS1* を発現させた大腸菌の粗抽出液可溶性画分 1 μ L をウェスタンブロッティングによって分析した(Fig. 4-1~4-3). *AtPCS1(p)* は精製したタンパク質を 100 ng 泳動したものである. 各大腸菌抽出液において, *AtPCS1(p)* と同位置にバンドが観察されており, 目的の変異タンパク質が発現していると推定された. Fig. 4-3 より, C5 と C6 についてはバンドの濃さが他の変異体と比較して非常に薄く, 可溶性画分への回収はほとんど確認されないことが分かった. 逆に, B1 と B2 については, バンドの濃さが他の変異体と比較して濃くなっており, 発現量が向上していると推定された. それ以外の変異体の発現量は, 概ね揃っていると考えて差し支えない範囲であると見積もられた.

AtPCS1(WT) や, B1, B2, C1~C4 といった変異導入数の少ない変異体ではバンドがブロードになったが, 変異導入数の多いものではシャープなバンドが検出されるという傾向が認められた.

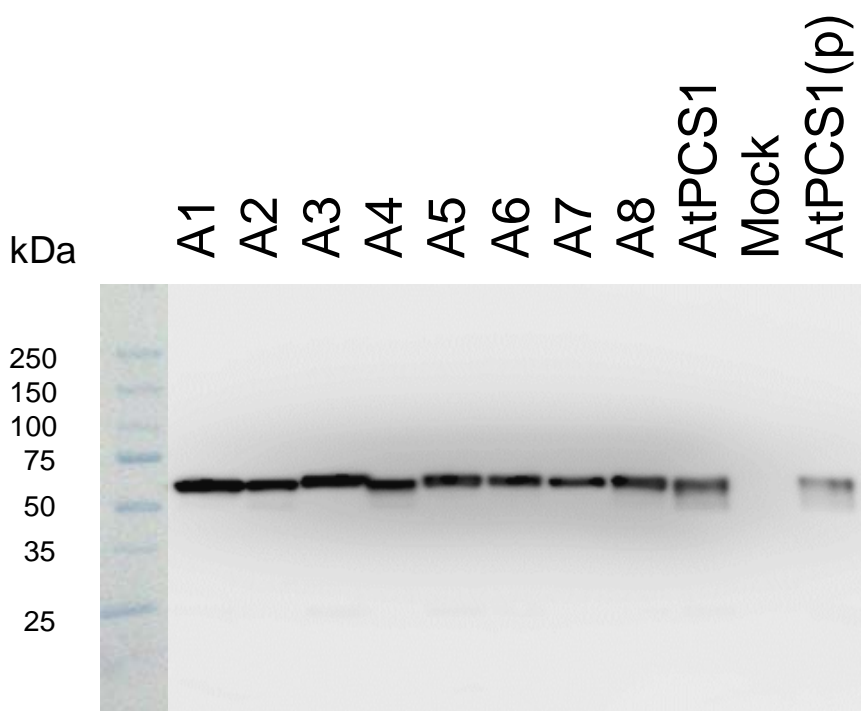


Fig. 4-1 *AtPCS1* 変異体 A 群のウェスタンブロッティング

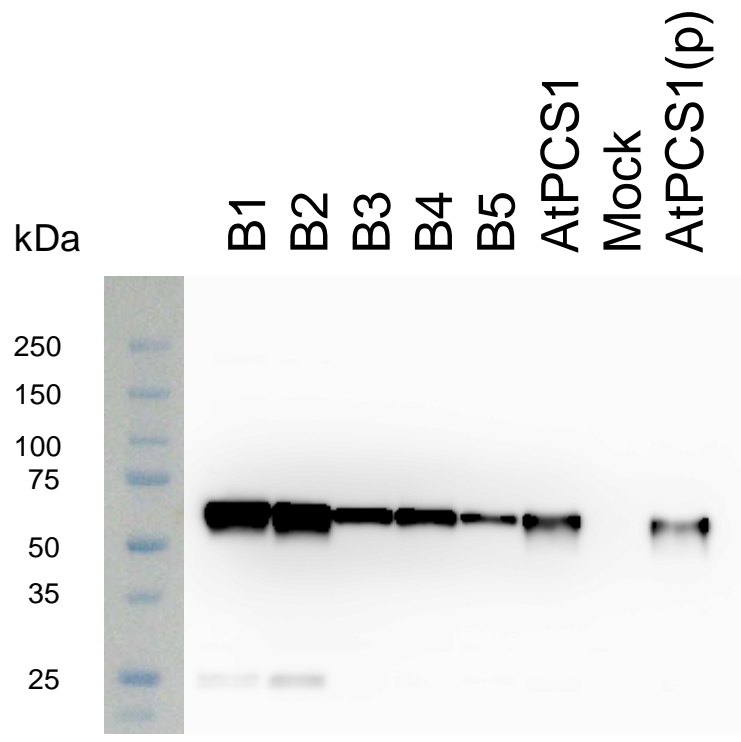


Fig. 4-2 *AtPCS1* 変異体 B 群のウエスタンブロッティング

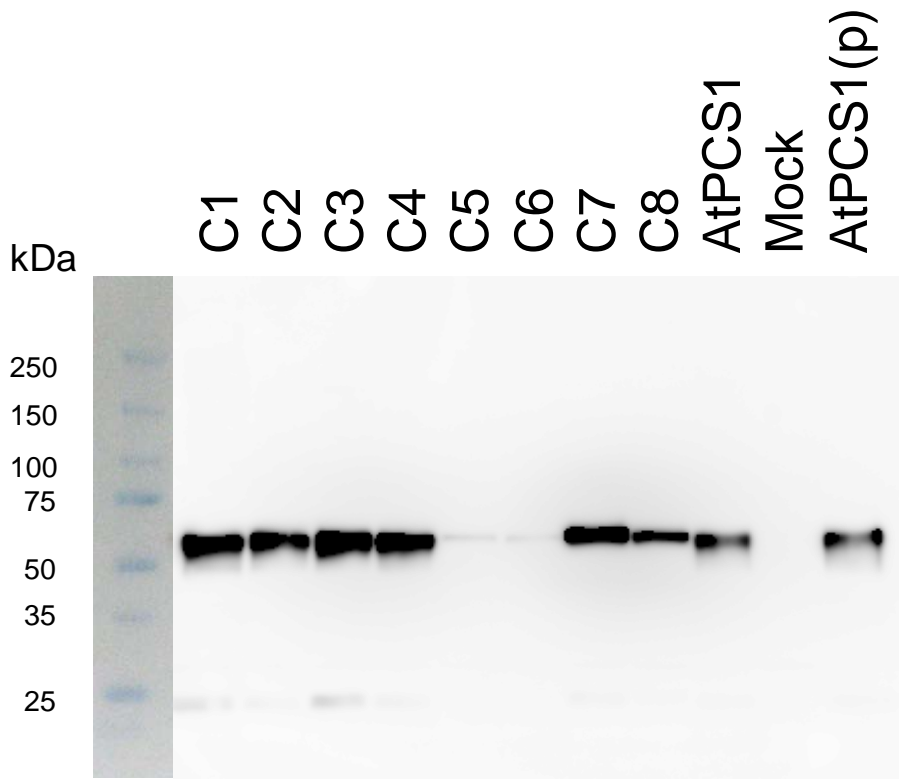


Fig. 4-3 *AtPCS1* 変異体 C 群のウエスタンブロッティング

4-3-2. 大腸菌粗抽出液を用いた PCS 活性の測定

各種変異 *AtPCS1* を発現させた大腸菌の粗抽出液可溶性画分の PC₂ 合成能を測定した結果を Fig. 4-4~4-6 に示した. *AtPCS1* とその変異体の大腸菌を培養して得られた抽出液は酵素反応液を 1000 倍希釈し, mock 大腸菌を培養して得られた菌体粗抽出液は反応液を 100 倍希釈したものを測定した. なお, 1000 倍希釈では PC₂ のピークが検出されなかった反応液は 10 倍希釈したものも測定した. クロマトグラム中で, GSH, PC₂, 内標準(I. S.: desglycyl PC₂) の Retention time はそれぞれ 3.17, 6.67, 7.97 min であった. PC₂ と I. S. のピーク面積比(1000 倍希釈換算)を算出し, PC₂ 合成能を *AtPCS1*(WT)の合成能に対する比率で表し, Table 4-5 に示した.

Fig. 4-4 より, A 群では全ての変異体において PC₂ の合成が確認された. A4, A5, A8 の変異体の PC₂ 合成能比は WT と比較して遜色ない値であった. Fig. 4-5 より, B 群では B3, B4 の変異体で PC₂ の合成が確認され, B3 の変異体の PC₂ 合成能比は WT と比較して遜色ない値であったが, B4 の PC₂ 合成能比は WT の 100 分の 1 以下であった. Fig. 4-6 より, C 群では C1, C2, C3, C4, C7 変異体で PC₂ の合成が確認されたが, WT と比較して遜色ない PC₂ 合成能比であったものは C3 のみであった.

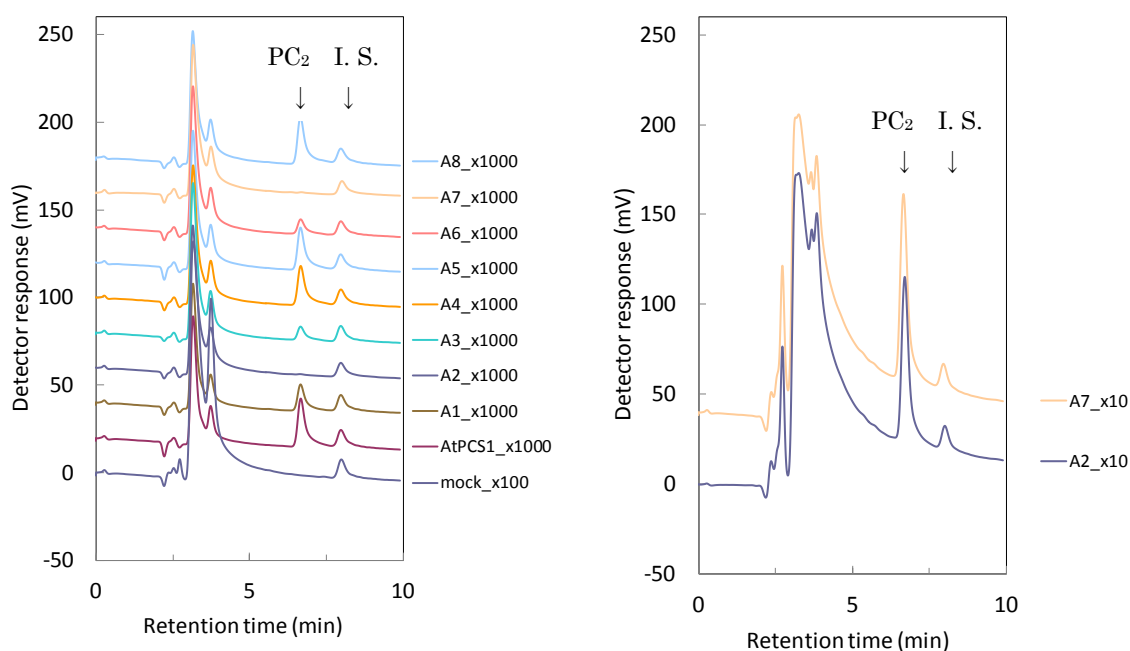


Fig. 4-4 A 群変異体の PCS 活性測定のクロマトグラム
PC₂, I. S. の Retention time はそれぞれ 6.7, 8.0 min.

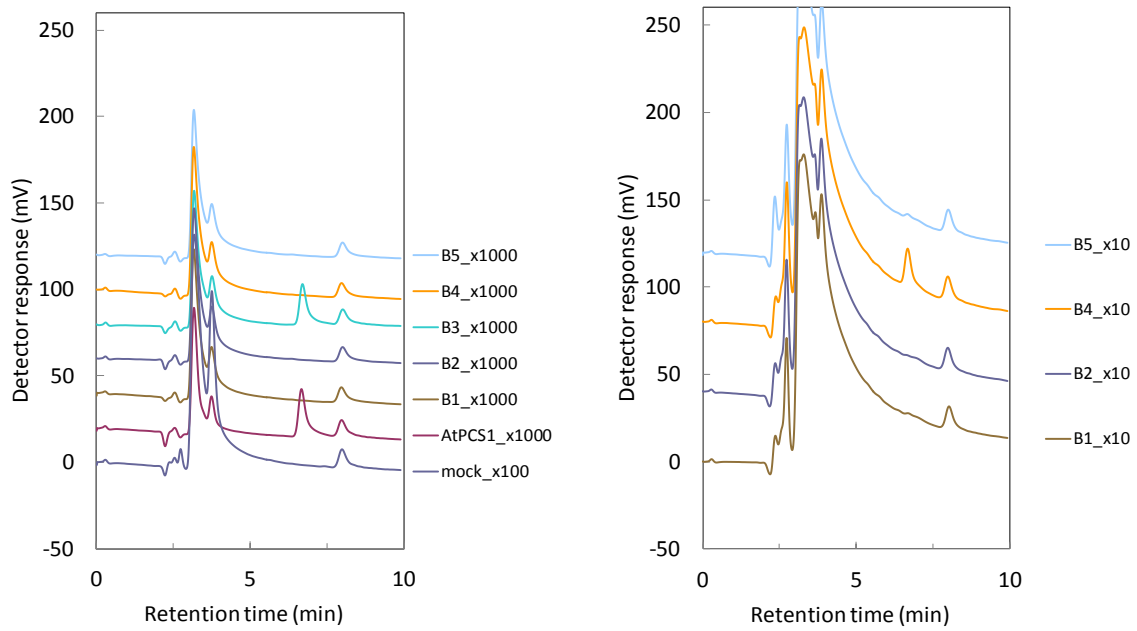


Fig. 4-5 B 群変異体の PCS 活性測定のコロマトグラム

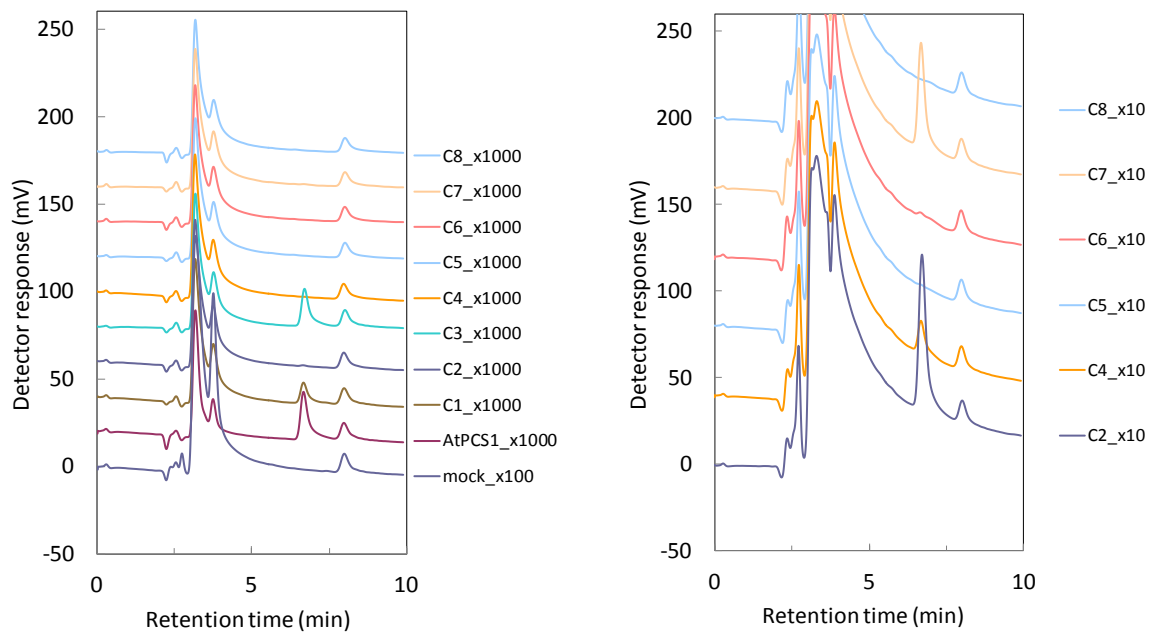


Fig. 4-6 C 群変異体の PCS 活性測定のコロマトグラム

Table 4-5 各種変異 *AtPCS1* の PC₂ 合成能の WT との比率

Clone	ピーク面積比(PC ₂ / I. S., ×1000 換算)	PC ₂ 合成能(※)
mock	0.00	0.000
<i>AtPCS1</i> (WT)	2.75	1.000
A1	1.58	0.574
A2	0.08	0.029
A3	0.70	0.256
A4	2.15	0.783
A5	2.45	0.892
A6	0.92	0.335
A7	0.09	0.031
A8	2.83	1.030
B1	0.00	0.000
B2	0.00	0.000
B3	2.38	0.865
B4	0.02	0.006
B5	0.00	0.000
C1	1.07	0.391
C2	0.08	0.029
C3	2.45	0.892
C4	0.01	0.004
C5	0.00	0.000
C6	0.00	0.000
C7	0.05	0.018
C8	0.00	0.000

※*AtPCS1*(WT)での PC₂ 合成能に対する比率

4-3-3. *AtPCS1*(WT), *AtPCS1*(B3)の大量精製

AtPCS1(WT), *AtPCS1*(B3)について, FPLC による大量精製の検討結果のクロマトグラムチャートを Fig. 4-7 および Fig. 4-8 に示した. 溶出開始およびピークの imidazole 濃度およびタンパク質の総溶出量を Table 4-6 に示した. 溶出量は UV 値と吸光係数から溶出濃度を求め, ピーク面積を三角形で近似することにより概算した. *AtPCS1*(B3)は *AtPCS1*(WT)よりも低い imidazole 濃度で溶出した. また, *AtPCS1*(B3)の溶出量は *AtPCS1*(WT)の約 3 分の 1 であった.

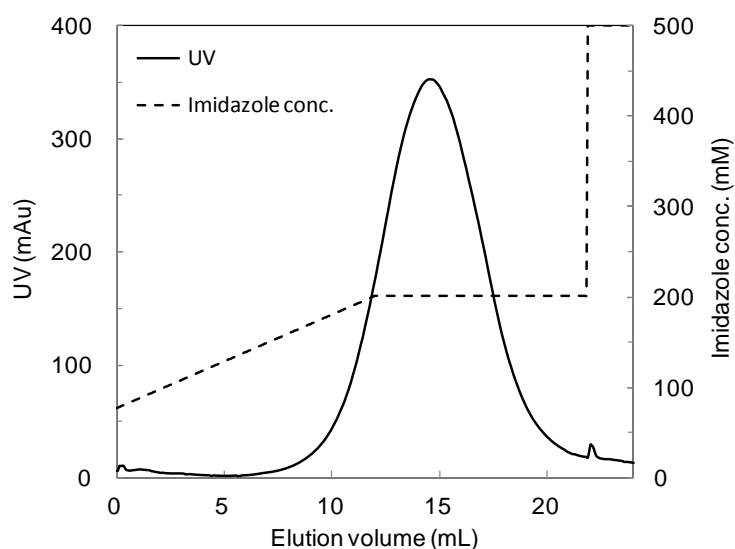


Fig. 4-7 *AtPCS1*(WT)の精製時のクロマトグラムチャート

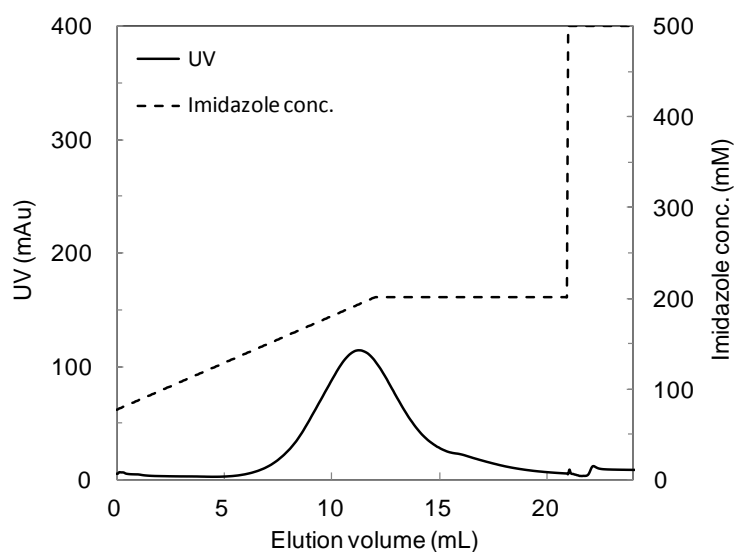


Fig. 4-8 *AtPCS1*(B3)の精製時のクロマトグラムチャート

Table 4-6 *AtPCS1*(WT)と *AtPCS1*(B3)の溶出 imidazole 濃度と溶出量

		<i>AtPCS1</i> (WT)	<i>AtPCS1</i> (B3)
imidazole 濃度	溶出 start	140 mM	130 mM
	溶出 peak	>200 mM	190 mM
溶出量(/100 mL culture)		7.8 mg	2.5 mg

なお、本検討では 100 mL 培養液相当の菌体を用いたが、一度に処理する菌体量を多くすると、ソニケーションの効率が悪くなるためかタンパク質の回収量が思ったように増加しないことが経験的に分かった。また、数回のカラムの使用により、タンパク質の溶出が始まる imidazole 濃度が低濃度側にシフトし、*AtPCS1*(WT)、*AtPCS1*(B3)でそれぞれ 110 mM, 75 mM 程度まで低下してしまい、初期に検討した条件での精製が困難となった。溶出 imidazole 濃度低下の問題は 0.1 M NiSO₄をカラムにリチャージすることで改善が見られた。実際には以上に挙げた要因もあり、特に *AtPCS1*(B3)については数十 mg のタンパク質量を単一ロットで精製することは困難であった。

4-3-4. *AtPCS1*(WT), *AtPCS1*(B3)の比活性および保存安定性

まず、*AtPCS1*(WT)と *AtPCS1*(B3)の比活性について精査した。精製した酵素(複数の精製ロット)を用いて 10 mM GSH, 50 μM CdSO₄の反応条件で比活性を測定した結果を Table 4-7 に示した。*AtPCS1*(WT)、*AtPCS1*(B3)の比活性はそれぞれ約 80, 30 μmol/min/mg-protein であることが分かった。*AtPCS1*(WT)に比べて *AtPCS1*(B3)の比活性は約 4 割弱まで低下していることが分かった。

Table 4-7 *AtPCS1*(WT)と *AtPCS1*(B3)の比活性(複数ロット)

	1回目	2回目	3回目	Ave.	S. D.
<i>AtPCS1</i> (WT) :lot-1	81.9	80.1	70.9	77.6	4.8
<i>AtPCS1</i> (WT) :lot-2	93.2	73.4	90.7	85.8	8.8
<i>AtPCS1</i> (B3) :lot-1	29.8	35.9	25.4	30.4	4.3
<i>AtPCS1</i> (B3) :lot-2	25.3	35.6	25.3	28.7	4.9

(活性値 μmol/min/mg-protein)

次に、*AtPCS1*(B3)について、基質濃度を変化させた場合の酵素活性の曲線グラフが *AtPCS1*(WT)に比べて変化するかを調べた結果を Fig. 4-9 に示した。*AtPCS1*(B3)の活性曲線は、第 3 章で詳細に議論した *AtPCS1*(WT)と同様の傾向を示した。反応液中の Cd 濃度が上昇すると、酵素活性の極大値を与える GSH 濃度が上昇するという点も、*AtPCS1*(WT)と *AtPCS1*(B3)で同様の傾向を示した。

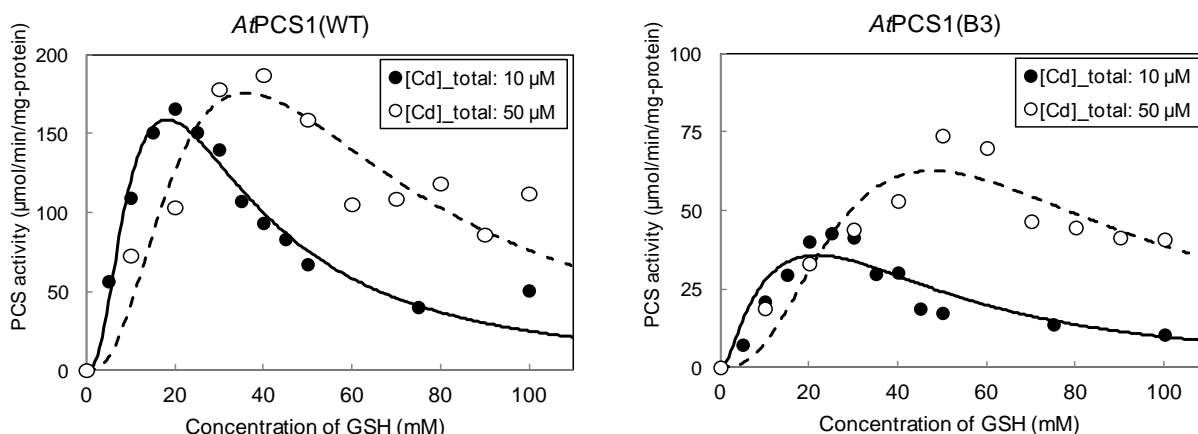


Fig. 4-9 *AtPCS1*(WT)と *AtPCS1*(B3)の Cd, GSH 濃度に対する活性曲線

AtPCS1(WT)と *AtPCS1*(B3)について、酵素のみ, Cd 存在下, GSH 存在下という 3 条件で保存性を検討した結果を Table 4-8 に示した. *AtPCS1*(B3)の酵素活性は, *AtPCS1*(WT)と同様に日を追うごとに大きく低下しており, 低下するスピードとしても *AtPCS1*(WT)と比較して大差はないことが分かった.

Table 4-8 *AtPCS1*(WT)と *AtPCS1*(B3)の保存安定性

PCS 活性残存率 (%)		Day				
Temp.	Clone	0	1	2	4	6
4°C	<i>AtPCS1</i> (WT)	100.0	49.1	54.6	8.7	12.0
	<i>AtPCS1</i> (WT) w/ Cd	100.0	33.7	19.8	4.8	4.2
	<i>AtPCS1</i> (WT) w/ GSH	100.0	46.0	53.6	16.2	9.8
25°C	<i>AtPCS1</i> (WT)	100.0	11.6	6.3	n. d.	0.2
	<i>AtPCS1</i> (WT) w/ Cd	100.0	5.2	4.1	n. d.	n. d.
	<i>AtPCS1</i> (WT) w/ GSH	100.0	17.9	6.3	0.4	0.1

PCS 活性残存率 (%)		Day				
Temp.	Clone	0	1	2	4	6
4°C	<i>AtPCS1</i> (B3)	100.0	70.7	33.8	13.1	8.3
	<i>AtPCS1</i> (B3) w/ Cd	100.0	60.8	48.7	18.2	7.4
	<i>AtPCS1</i> (B3) w/ GSH	100.0	71.0	38.6	9.8	3.3
25°C	<i>AtPCS1</i> (B3)	100.0	20.7	10.0	n. d.	n. d.
	<i>AtPCS1</i> (B3) w/ Cd	100.0	25.7	13.7	1.3	n. d.
	<i>AtPCS1</i> (B3) w/ GSH	100.0	19.9	9.8	2.4	4.5

n. d.: Not detected. それぞれの保存条件において, Day0 における活性を 100% とした際の Day1-6 における酵素活性を%で示した.

4-3-5. *A*tPCS1(WT)の3Dモデル構造

*A*tPCS1(WT)の3Dモデル構造を Fig. 4-10 および Fig. 4-11 に示した。モデル構造中で, catalytic triad の3残基を赤色で示した。また, Cys⁹⁰, Cys⁹¹, Cys¹⁰⁹, Cys¹¹³, Cys¹³⁸, Cys¹⁴⁴ の側鎖原子をハイライトした。ハイライトした Cys は catalytic triad の反対側に存在することが分かった。また, Cys⁹⁰, Cys⁹¹ と Cys¹⁰⁹, Cys¹¹³ は一次配列上では離散した位置に存在するが, 立体構造上では近接した部位に配置していることが分かった。

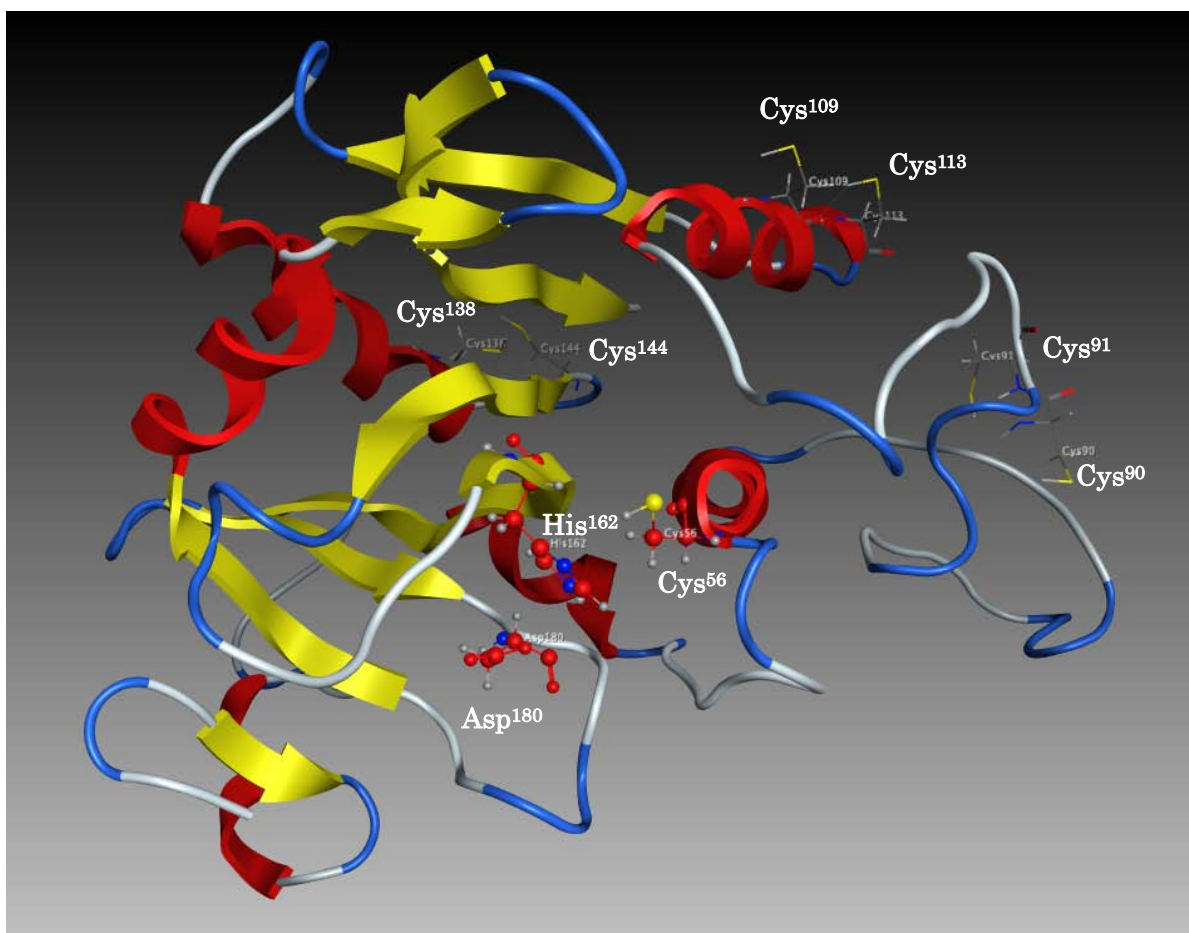


Fig. 4-10 *A*tPCS1(WT)の3Dモデル構造(catalytic triad 側から見たもの)

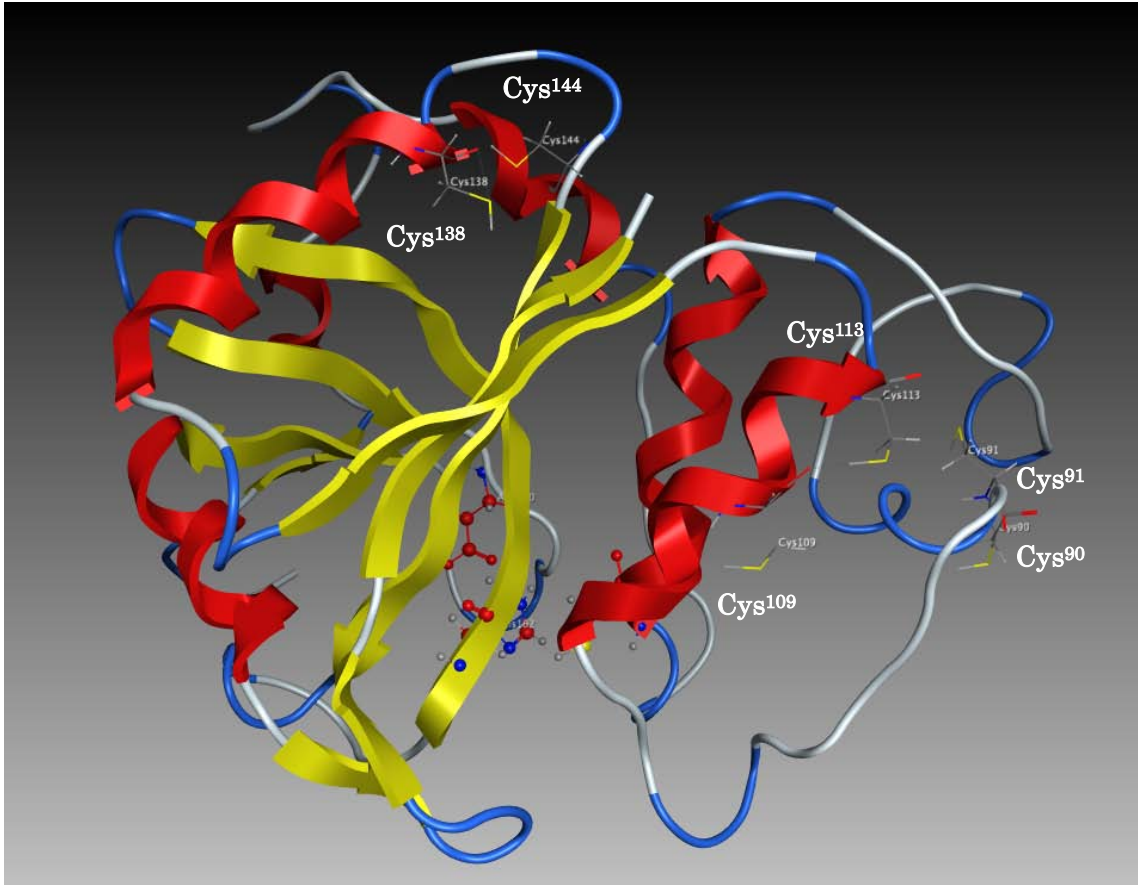


Fig. 4-11 *AtPCS1*(WT)の 3D モデル構造(catalytic triad の逆側から見たもの)

4-3-6. *AtPCS1*(WT), *AtPCS1*(B3)のSH基の定量

AtPCS1(WT)と *AtPCS1*(B3)について、精製タンパク質溶液を用いた DTNB 法による SH 基の定量において、経時的に反応する SH 基濃度を測定した。

DTNB と SH 基の反応により生成する 2-nitro-t-mercaptobenzoic acid のモル吸光係数 ϵ は $14,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ である (Riener *et al.*, 2002). 412 nm の吸光度, 光路長 10 mm から, 2-nitro-t-mercaptobenzoic acid の濃度を求めることで反応した SH 基濃度を定量した. Fig. 4-12 に, *AtPCS1*(WT)および *AtPCS1*(B3)を反応させたときの吸光度を反応時間の変化とともに示した. 20 min 測定を行ったが, 実際の反応は 10 min 程度で終了した. 反応終了時点に到達するまでの間のグラフで, *AtPCS1*(B3)は *AtPCS1*(WT)よりも緩やかな上昇を示した.

吸光度からタンパク質 1 mol 当たり反応した SH 基の量を換算し, 反応時間の変化とともに Fig. 4-13 に示した. 反応終了時点で, *AtPCS1*(WT)は *AtPCS1*(B3)の約 2 倍の SH 基が反応したことが確認された.

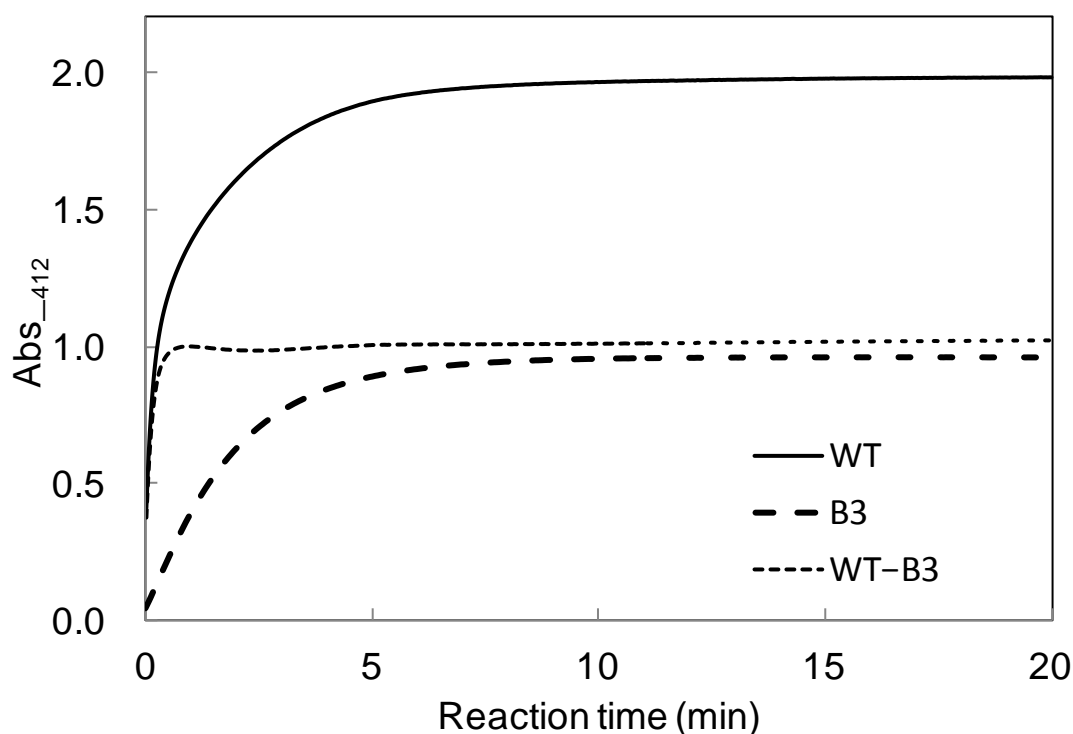


Fig. 4-12 吸光度の経時変化のグラフ

DTNB 反応液中の酵素濃度は, WT, B3 でそれぞれ 0.66, 0.61 mg/mL

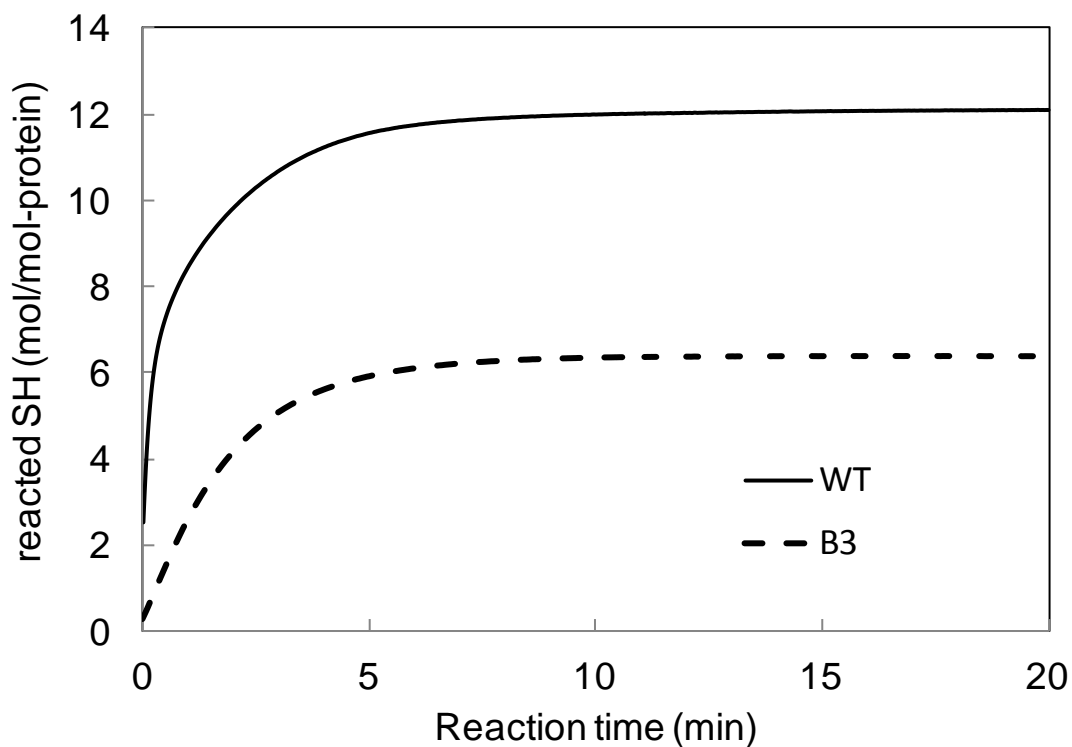


Fig. 4-13 反応した SH 基の経時変化のグラフ

Fig. 4-12 のデータからタンパク質 1 mol 当たりの反応した SH 基を換算した.

4-3-7. *AfPCS1*(WT)の結晶化条件のスクリーニング

AfPCS1(WT)について、2.0 mg/mL の精製タンパク質溶液を用いて結晶化条件のスクリーニングを行い、1 ヶ月間にわたり実体顕微鏡による観察を行ったが、結晶の生成を観察することはできなかった。

4-4. 考察

本章では様々な *AtPCS1* 変異体を作製して活性評価を行った。大腸菌粗抽出液での活性評価結果を Table 4-9 にまとめた。網掛けで示した部分の Cys は Ser に変異させても変異体の発現や活性に与える影響が少ないと考えられた。

まず、*AtPCS1* の S-S 結合について考察する。PCS は細胞内タンパク質であり、細胞内には mM オーダーの GSH が存在するため、還元的な環境である。また、大腸菌で発現、精製を行った組換え *AtPCS1* は、1 mM DTT 存在下で精製を行っている。更には、*in vitro* PCS 活性の測定では 10 mM 2-ME 存在条件下で活性を有している。精製した組換え *AtPCS1* を還元剤非添加条件下で加熱変性させて SDS-PAGE を行うと、還元剤添加条件下で変性させたものと同一位置にバンドが観察される。3D モデリングにより、Cys⁹⁰, Cys⁹¹, Cys¹⁰⁹, Cys¹¹³ はこれらの Cys 間で S-S 結合を形成することが可能な位置には配置されていないことが分かった。Cys¹³⁸, Cys¹⁴⁴ は S-S 結合を形成することの可能な位置に配置しているが、この両 Cys を Ser に置換した変異体が WT と同等の PCS 活性を有すること(後述)から、S-S 結合を形成してタンパク質の構造を規定しているものとは考えにくい。以上の事象から総合的に判断すると、*AtPCS1* には S-S 結合は存在せず、全ての Cys がフリーの状態が存在するものと考えられた。

A8 の結果より、Cys³⁵⁸, Cys³⁵⁹, Cys³⁶⁶, Cys³⁶⁸ 変異は活性に影響を与えないと考えられた。また、A2, A3, A6, A7 の比較より、Cys⁴⁷¹ 変異により活性が低下すると考えられた。A1, A4, A5 の比較より、Cys¹³⁸, Cys¹⁴⁴ もしくは Cys⁴⁰², Cys⁴⁰⁴ 変異は活性がやや下がっているようにも見られるが、発現量の差異や実験誤差の範囲内であると判断して差し支えないと考えた。A1, B3, B4, B5 の比較より、Cys²³¹ 変異により活性が低下すると考えられた。

N ドメインの Cys⁹⁰, Cys⁹¹, Cys¹⁰⁹, Cys¹¹³ について考察する。B1, B2, C2, C4 の比較より、Cys⁹¹, Cys¹¹³ は活性に影響を与える Cys と考えられた。C1 の結果より、Cys⁹⁰ 単独変異で活性が下がる傾向がみられるが、C3 の結果からは、Cys¹⁰⁹ 単独変異での活性の低下は見られない。しかしながら、Cys⁹⁰, Cys¹⁰⁹ を同時に変異させた C5 ではタンパク質の可溶性画分への発現自体が見られなくなっている。また、B2 と C4 の比較によると、Cys¹¹³ 単独変異では弱いながらも活性が残っていたのに対し、Cys¹⁰⁹ 変異を加えると完全に活性が失われた。以上より、Cys⁹⁰, Cys¹⁰⁹, Cys¹¹³ は補完的に働いている可能性があり、どれも活性に関与している可能性は高いと考えられた。N ドメインの中でも、Cys⁵⁶ の他に Cys⁹⁰, Cys⁹¹, Cys¹⁰⁹, Cys¹¹³ については、*AtPCS1*, *TaPCS*, *CmPCS*, *CePCS*, *SpPCS* において高度な保存性を示している。3D モデリングにより、これら 4 つの Cys は catalytic triad の反対側で、近接した部位に存在することが推定された。こ

これらの Cys は, *At*PCS1 の溶解性や, 構造変化を介した活性化に寄与していることが示唆される.

以上の検討から, *At*PCS1 の活性や特性を保持しつつ, かつ Cys を最大限 Ser に置換したものとして, 変異体 B3 を選択した. 合計で 10 個の Cys を Ser に置換することに成功した.

Table 4-10 種々の変異導入と大腸菌粗抽出液が示した活性評価

	N ドメイン							C ドメイン									活性 評価	
	56	90	91	109	113	138	144	231	342	343	358	359	363	366	402	404		471
A1	\	-	-	-	-	S	S	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	++
A2	\	-	-	-	-	S	S	-	-	-	S	S	S	S	-	-	S	+
A3	\	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	S	++
A4	\	-	-	-	-	S	S	-	-	-	S	S	S	S	-	-	-	+++
A5	\	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	+++
A6	\	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S	-	-	S	++
A7	\	-	-	-	-	S	S	-	-	-	S	S	S	S	S	S	S	+
A8	\	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S	-	-	-	+++
B1	\	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	\	-	-	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B3	\	-	-	-	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	-	+++
B4	\	-	-	-	-	S	S	S	-	-	S	S	S	S	S	S	-	+
B5	\	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
C1	\	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
C2	\	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C3	\	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
C4	\	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C5	\	S	-	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
C6	\	S	-	-	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
C7	\	-	S	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	-	+
C8	\	-	S	-	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-

※発現や活性への寄与がない、もしくは寄与が少ないと判断した Cys を網掛けで示した。

※Table 4-5 に示した PC₂ 合成能=X とし、以下のように活性評価を定義した。

$X \geq 0.7$	+++
$0.7 > X \geq 0.1$	++
$0.1 > X \geq 0.001$	+
$X < 0.001$	-

FPLC での His-tag 精製では, *AtPCS1*(WT)と比較して *AtPCS1*(B3)はより低い imidazole 濃度でタンパク質が溶出した. *AtPCS1*(WT)では Ni と His-tag のイミダゾール環の結合に加え, Ni と Cys の SH 基との結合が寄与している可能性が考えられる. *AtPCS1*(B3)では 10 個の Cys が Ser に置換されているため, Ni レジンとの結合力が弱まったことが溶出 imidazole 濃度が低下した原因ではないかと考えられる. この考察は, DTNB 法での SH 基定量における, *AtPCS1*(WT)と *AtPCS1*(B3)の挙動の違いからも支持される. *AtPCS1*(WT)は試薬を加えて即座に反応が起こっているのに対して, *AtPCS1*(B3)はグラフの立ち上がり方が緩やかである. また, *AtPCS1*(WT)と *AtPCS1*(B3)のグラフの差を取ったものを見ると, 一定量の SH 基が瞬時に反応していることが読み取れる. すなわち, DTNB が容易にアクセスできる *AtPCS1*(WT)の分子表面上に存在する Cys が, *AtPCS1*(B3)では存在しなくなったことを示唆している. 逆にいえば, *AtPCS1*(B3)で置換された Cys は, 分子表面上に存在していたものである可能性が高い. B3 で置換されなかった 7 個の Cys は, 分子の内側などのアクセスしづらい部分に存在しているため, DTNB との反応にある程度時間がかかっているものと考えられる. なお, *AtPCS1*(WT)には 1 分子あたり 17 個の Cys が存在するはずであるが, DTNB 法での定量では約 12 個の Cys しか定量されなかった. この原因としては, 最終吸光度が 2 付近で定量していたために反応産物濃度が少なく見積もられたことや, SH 基の保護に加えた DTT を除去してアルカリ性寄りのバッファーへの置換を行ったために SH 基の還元状態が維持できなくなり, 分子内または分子間で S-S 結合が生じたこと, DTNB 試薬が時間をかけてもアクセスできないタンパク質内側部に Cys が存在する等の理由が考えられる.

精製した *AtPCS1*(B3)は, *AtPCS1*(WT)と比較して安定性が向上していることが期待されたが, 残念ながら失活速度は *AtPCS1*(WT)と比較して大きな差はなかった. これは *AtPCS1* の酵素としての不安定さが, *AtPCS1*(B3)で置換した Cys の SH 基由来の不安定さには直接関与していなかったことを示している. 活性の維持に必須な Cys が同時に不安定さに寄与している可能性が考えられる. *AtPCS1*(B3)は *AtPCS1*(WT)と比較して比活性が 4 割程度だったが, 検討した限りでは酵素としての挙動の差異は認められなかった. 第 3 章で議論した 2 つ目の Cd 結合による活性阻害が起こるのか等を調べる必要があると考えられる.

今回の検討内では, *AtPCS1*(WT)の結晶の生成を観察することはできなかった. 2.0 mg/mL のタンパク質溶液を用いたため, タンパク質濃度が低いことも懸念されるが, 3 分の 1 程度のウェルで沈殿が観察されたことから, 濃度条件は悪くなかったと考えている. 結晶化については更なる条件検討が必要である.

第 5 章 *Cyanidioschyzon merolae* 由来の PCS への

変異導入と酵素活性

5-1. 序

5-1-1. *C. merolae* について

C. merolae は高温酸性の環境に生息する微細な単細胞紅藻である。細胞構造が核、ミトコンドリア、葉緑体が一つずつと非常に単純な構造をしており、形は楕円形、サイズは $1.5 \times 3.5 \mu\text{m}$ 、分裂で増殖し、細胞壁と液胞を持たない。また、系統解析によって紅藻の中でも特に原始的な位置を占めていることが分かり、真核生物の初期進化の解析に極めて有益な情報を得ることができると期待されている。*C. merolae* は、2004 年にシゾンゲノムプロジェクトにより、藻類として初めて核ゲノムの全塩基配列が決定された。これによると、*C. merolae* のゲノムサイズは約 1,650 万塩基対、染色体数 20 本、遺伝子数 5,331 個であり、このうちタンパク質をコードしているものは 4,775 個である。この遺伝子数は真核生物としては最小クラスであり、全遺伝子の 99.5% が単一エクソンからなることが分かっている(Matsuzaki *et al.*, 2004)。

C. merolae にも他の生物種の PCS と相同性の高い遺伝子(*CmPCS*)が存在し、この翻訳産物が *in vivo*, *in vitro* で実際に PCS として機能することが明らかとなり、これは藻類においては初めての PCS 遺伝子の同定となった(Osaki *et al.*, 2008)。*CmPCS* において特筆すべきは、PCS の活性中心と考えられている N 末端側領域(N ドメイン)と、可変部位である C 末端側領域(C ドメイン)の他に、これまでに報告されている他の真核生物の PCS には存在しない、N 末端側に延長された固有のドメインが存在していることである(第 1 章 Fig. 1-4)。このドメインの機能は現在のところ不明であり、以降このドメインを X ドメインと称す。また、*CmPCS* の C ドメインには他の生物種に見られる特徴的な金属結合モチーフが 1 つしか見られず(第 1 章 Fig. 1-4, Table 1-1)、様々な金属による活性化の程度が *AtPCS1* とは異なっていることが分かっている(Osaki *et al.*, 2009)。

5-1-2. 目的

本章では *CmPCS* の X ドメインの機能を解析するため、出芽酵母を用いて各種変異 PCS の活性を評価した。また、活性中心であると考えられるアミノ酸 Cys¹⁶⁴, His²⁸³, Asp³⁰¹ 以外に, Arg³³⁸ が活性に関与していることが示唆されているため(大崎, 2008), このアミノ酸がどのように活性に関与しているのかを検討した。また, N 末端, C 末端からタンパク質のアミノ酸残基を順々に削除していくことで, 最小機能保持領域を決定することを試みた。これは, タンパク質の分子量が小さい方が, 一般に大腸菌による大量発現系での可溶性は高くなるために, 大量発現系の構築・結晶化による立体構造解析を見越して行ったものである。

一方, 一般的に PCS は非常に不安定な酵素であり, 精製したタンパク質の取り扱いが難しい。これは特徴的な Cys 配列を持っていることに起因すると考えられるが, このことがタンパク質の結晶化を困難にしている原因の一つである可能性がある。*CmPCS* は好熱性の藻類由来であるために, そのタンパク質は安定性が高いことが期待される。このため, 酵母を用いた機能解析とは別に, 結晶化や NMR による立体構造解析に用いることができる *CmPCS* を十分量取得するための, 大腸菌による大量発現系の構築を試みた。

5-2. 実験手法

5-2-1. 使用菌株, ベクター, 培地

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDR135c::kanMX4) は Euroscarf より購入した。出芽酵母には PCS 遺伝子が存在せず, 菌体内の Cd を GSH との複合体(Cd-(GSH)₂)として液胞中へ輸送することで Cd の解毒を図っている。今回使用した酵母はこの輸送系を欠いた変異株(Δ *ycf1*)であり, Cd に対して感受性が高い。*CmPCS* による Cd 耐性能の付与を評価するため, この変異株を用いることにした。

酵母による *CmPCS* 遺伝子の異種発現は pYES2 (Invitrogen) ベクターを用いた。これは GAL1 プロモーター, CYC1 ターミネーターを持つシャトルベクターである。選択マーカーとしては *URA3* を利用できる。

酵母の培養は YPD 培地または SD 培地を用いた。SD 培地の組成を Table 5-1 に示す。GAL1 プロモーターはガラクトースで誘導されるが, グルコースで強く抑制され, ラフィノースではあまり抑制されない。SD 培地中の糖を選択することで PCS 遺伝子の発現を制御した。

Table 5-1 SD 培地の組成

Source of carbon, nitrogen, etc.	Final conc.
Glucose/ Galactose/ Raffinose	20 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g/L
NaCl	0.1 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1 g/L
MgSO ₂ ·7H ₂ O	0.5 g/L
KH ₂ PO ₄	0.85 g/L
K ₂ H PO ₄	0.15 g/L
Kanamycin sulfate	50 mg/L
(Agar)	20 g/L
<hr/>	
Vitamine	
Biotin	20 µg/L
Calcium pantothenate	2 mg/L
Folic acid	2 µg/L
Inositol	10 mg/L
Niacin	400 µg/L
p-Aminobenzoic acid	200 µg/L
Pyridoxine hydrochloride	400 µg/L
Riboflavin	200 µg/L
Thiamine hydrochloride	400 µg/L
<hr/>	
Micro elements	
BoricAcid (H ₃ BO ₄)50 mg	500 µg/L
Copper Sulfate (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	40 µg/L
Ferric chlorode (FeC ₁₃ ·7H ₂ O)	200 µg/L
Manganese Sulfate (MnSO ₄ ·4-5H ₂ O)	400 µg/L
Potassium iodide (KI)	100 µg/L
Sodium Molybdate (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	200 µg/L
Zinc Sulfate (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	400 µg/L
<hr/>	
Amino acid	
L-histidine	20 mg/L
L-leucine	60 mg/L
L-methionine	20 mg/L

5-2-2. 形質転換酵母の作製

560 アミノ酸からなる *CmPCS* 完全長(1_560)が挿入されたベクターを基本テンプレートにして, 種々の変異 *CmPCS* 遺伝子断片を PCR によって増幅した. このとき使用したプライマーは Table 5-2 に示す. 得られた DNA 断片を pYES2 ベクターにサブクローニングし, 目的の遺伝子が正しく挿入されていることを DNA シークエンサーにより確認した. ここでは, 野生型 *CmPCS* のアミノ酸配列の *m* 番目から *n* 番目までで構成される変異タンパク質を, *trm_n* と表記する.

作製したプラスミドは, 酢酸リチウム法により酵母細胞に導入した. *Δycf1* を YPD 培地で $OD_{600} = 0.4-0.8$ となるまで 30°C で培養し, 集菌して 0.1 M LiOAc, 次いで滅菌水で洗浄した. 菌体に形質転換溶液(1 M LiOAc 36 μL , 50% (w/v) PEG4000 240 μL , 10 mg/mL Sermon sperm DNA 5 μL , プラスミド DNA 溶液 79 μL)を加えて混合し, 42°C で 40 min インキュベートした後, 滅菌水で洗浄してから SD 培地(Glucose, -Ura)へ塗布した.

5-2-3. スポット実験による形質転換酵母の Cd 耐性能の観察

種々の形質転換酵母を, SD 培地(Raffinose, -Ura)で $OD_{600} = 1.0-2.0$ となるまで振盪培養し, 集菌して SD 培地を捨て NaCl-CaCl₂ 溶液(0.1 g/L NaCl, 0.1 g/L CaCl₂·2H₂O)に再懸濁した. この懸濁液を, $OD_{600} = 1.0, 0.1, 0.01, 0.001$ となるように希釈して, それぞれ 10 μL ずつ SD 寒天培地にスポットした. スポットに使用した寒天培地は, SD 培地(Galactose, -Ura)中に CdSO₄ を 0, 50, 100 μM となるように添加した. また, 一部の形質転換体ではこれに加えて PC 合成阻害剤である buthionine sulfoximine (BSO) を 1 mM 添加したものも使用した. プレートは 30°C で 48 h 培養し, 酵母の生育を観察した.

5-2-4. 形質転換酵母の PC 合成量の測定

変異 *CmPCS* を酵母細胞内で発現させ, Cd に曝露したときの PC 合成量を測定した. 一部は N 末端または C 末端に FLAG-tag を付加したタンパク質を発現させた(詳細は結果に記述). SD 培地(Raffinose, -Ura)で前培養した形質転換体を, 5 mL の新しい SD 培地(Galactose, -Ura)で 10 倍に希釈し, 24 h 培養した後, CdSO₄ を 100 μM 添加し, さらに 2 h 培養した. 集菌し, 菌体 2 U(*)あたり 380 μL の 0.1% TFA に懸濁し, 100 μL の Glass beads を加えて時々氷冷しながら 10 分間激しくボルテックスを行った. 遠心分離(22,000 $\times g$, 5 min, 4 \square)により Glass beads と菌体残渣を分離した上清に, 1 M HClO₄ を終濃度 0.05 M となるように加え(1/19 vol.), ポアサイズ 0.22 μm のメンブレンフィルター(Millipore)を通して沈殿物を除いた. 得られた溶液 20 μL を HPLC によって分析した. PC 合成量は検出された PC₂ の値で示した(酵母形質転換体では, $n>2$

の PC はほとんど合成されないため).

(*OD₆₀₀ = 1.0 の培養液 1 mL から得られる菌体量を 1 U とする)

5-2-5. 酵母抽出液のクロマトグラム上の未知ピークの分析

tr111_392-F を形質転換した酵母を SD 培地(Galactose,-URA)で培養し, CdSO₄を終濃度 100 μM になるように加えてさらに 12 h 培養し, 集菌した. 抽出バッファー(5% CH₃CN, 0.1% TFA)と Glass beads を加えて破碎し, 遠心分離後の上清を Sep-Pak® Cartridges C18 (Waters) に通し, 凍結乾燥を行った. 乾燥粉末を少量の抽出バッファーに懸濁し, 分析用カラム TSKGel ODS-80T_M 4.6 mm φ×250 mm (東ソー) によって分離し, 目的ピークを分取したものを凍結乾燥した. カラムによる分離と凍結乾燥は 2 回繰り返した. 精製された未知物質は 10% CH₃OH 溶液に溶解して LC-ESI-TOFMS(日本電子)により分析した.

5-2-6. 大腸菌を用いた *CmPCS* の発現

CmPCS およびその変異タンパク質として, 1_560(全長), tr111_560, tr111_338 の大量発現系の構築を試みた. ベクターとして, pColdII (Takara), pET28b (Novagen), pGEX6p1 (GE Healthcare) を用いた. Table 5-3 に示したプライマーを用いて増幅した DNA 断片をそれぞれのベクターにサブクローニングし, 目的の遺伝子が正しく挿入されていることを DNA シークエンサーにより確認した. 作製したプラスミドで *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Novagen) を形質転換した. 目的タンパク質の発現には LB 培地を用いた. 前培養した菌体を植え継ぎ, OD₆₀₀ = 0.5-1.0 となった段階で, pColdII は培養液を 15°C に冷却して 16 h, pET28b, pGEX6p1 は適量の IPTG を加えて 25°C で 6 h 培養し, タンパク質を発現させた.

培養後の菌体に, 抽出バッファー(25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 400 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Tween 20, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)を加えて超音波破碎(U200 Control instrument, Ika Labortechnik; Cycle 0.6, Amplitude 50%)を 1 min 行った. この懸濁液を全タンパク画分(Total, T)とし, 遠心分離を行って得られた上清をポアサイズ 0.22 μm のフィルター(Millipore)を通し, これを可溶性画分(Supernatant, S)とした. SDS-PAGE と CBB 染色により各タンパク質の可溶性を検討した.

pColdII, pET28b は目的タンパク質の N 末端に His-tag が, pGEX6p1 は GST-tag が付加される. 可溶化発現のために, *CmPCS* の N 末端に可溶性タグである, SUMO1 を付加したものも検討を行った(Malakhov *et al.*, 2004).

Table 5-2 クローニング(酵母発現用)に用いたプライマー(1)

Primer	Sequence (5'→3')	制限酵素部位
<i>CmPCS</i> -fwd	GAGAAAGCTTACCATGATCATTTGGCGTCCGTTGGTACG	<i>Hind</i> III
<i>CmPCS</i> -rev	GAGAGAATTCCTACTTGTFTTGCTCCTGTTGCTGTTGCTG	<i>Eco</i> RI

Primer	Sequence (5'→3')	制限酵素部位
<i>CmPCS</i> -63-fwd	GAGAAAGCTTACCATGCCAGTTCAGACGCCGTCGAGTCG	<i>Hind</i> III
<i>CmPCS</i> -71-fwd	GAGAAAGCTTACCATGACACAACCTGCTCCTGCGCTACC	
<i>CmPCS</i> -81-fwd	GAGAAAGCTTACCATGGACGCCACGGTGCTGCGTACACAGAC	
<i>CmPCS</i> -91-fwd	GAGAAAGCTTACCATGCAGACGATAACGGTGACGACGACG	
<i>CmPCS</i> -101-fwd	GAGAAAGCTTACCATGACGACGAGGATACCGAGCGC	
<i>CmPCS</i> -111-fwd	GAGAAAGCTTACCATGCCGGCGGTGTCGTTCTATCG	
<i>CmPCS</i> -121-fwd	GAGAAAGCTTACCATGCCGGCAACGTGCATCGCGCTG	
<i>CmPCS</i> -131-fwd	GAGAAAGCTTACCATGGAGGGTCGAGCTTTGTTGAG	
<i>CmPCS</i> -141-fwd	GAGAAAGCTTACCATGTTTTCGGGCCTAGCAGAGC	
<i>CmPCS</i> -112-fwd	GAGAAAGCTTACCATGGCGGTGTCGTTCTATCGTCGC	<i>Hind</i> III
<i>CmPCS</i> -113-fwd	GAGAAAGCTTACCATGGTGTGTCGTTCTATCGTCGCCCCG	
<i>CmPCS</i> -114-fwd	GAGAAAGCTTACCATGTGTCGTTCTATCGTCGCCCCGCTTC	
<i>CmPCS</i> -115-fwd	GAGAAAGCTTACCATGTTCTATCGTCGCCCCGCTTCCG	
<i>CmPCS</i> -116-fwd	GAGAAAGCTTACCATGTATCGTCGCCCCGCTTCCGGCAAC	
<i>CmPCS</i> -117-fwd	GAGAAAGCTTACCATGCGTCGCCCCGCTTCCGGCAACG	
<i>CmPCS</i> -118-fwd	GAGAAAGCTTACCATGCGCCCCGCTTCCGGCAACGTGC	
<i>CmPCS</i> -119-fwd	GAGAAAGCTTACCATGCCGCTTCCGGCAACGTGCATC	
<i>CmPCS</i> -120-fwd	GAGAAAGCTTACCATGCTTCCGGCAACGTGCATCGCG	
<i>CmPCS</i> -122-fwd	GAGAAAGCTTACCATGGCAACGTGCATCGCGCTGGAC	

Table 5-2 クローニング(酵母発現用)に用いたプライマー(2)

Primer	Sequence (5'→3')	制限酵素部位
<i>CmPCS_337</i> -rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTACACCATAGCGAGACCCCGGGGCATC	<i>EcoRI</i>
<i>CmPCS_338</i> -rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTAACGCACCATAGCGAGACCCCGGGGCAT	
<i>CmPCS_392</i> -rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTATACTCAGTTAGCGCTCTAGCGGTTTC	
<i>CmPCS_R338A</i> -rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTAAGCCACCATAGCGAGACCCCGGGGCAT	
<i>CmPCS_R338D</i> -rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTAAGTCCACCATAGCGAGACCCCGGGGCAT	
<i>CmPCS_R338E</i> -rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTACTCCACCATAGCGAGACCCCGGGGCAT	
<i>CmPCS_R338F</i> -rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTAAGAACACCATAGCGAGACCCCGGGGCAT	
<i>CmPCS_R338G</i> -rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTATCCACCATAGCGAGACCCCGGGGCAT	
<i>CmPCS_R338H</i> -rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTAATGCACCATAGCGAGACCCCGGGGCAT	
<i>CmPCS_R338K</i> -rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTACTTCACCATAGCGAGACCCCGGGGCAT	
<i>CmPCS_R338L</i> -rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTAACACACCATAGCGAGACCCCGGGGCAT	
<i>CmPCS_R338M</i> -rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTACATCACCATAGCGAGACCCCGGGGCAT	
<i>CmPCS_R338P</i> -rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTACGGCACCATAGCGAGACCCCGGGGCAT	
<i>CmPCS_R338Q</i> -rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTACTGCACCATAGCGAGACCCCGGGGCAT	
<i>CmPCS_R338T</i> -rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTACGTCACCATAGCGAGACCCCGGGGCAT	
<i>CmPCS_R338W</i> -rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTAACACACCATAGCGAGACCCCGGGGCAT	
<i>CmPCS_(R338E)</i> -fwd	CTCGCTATGGTGAGCGTCCGCGGTC	
<i>CmPCS_(R338E)</i> -rev	GACCGGCCGACGCTCCACCATAGCGAG	
<i>CmPCS_(R338F)</i> -fwd	CTCGCTATGGTGTTTCGTCGGCCGTC	
<i>CmPCS_(R338F)</i> -rev	GACCGGCCGACGAACACCATAGCGAG	
<i>CmPCS_(C367A)</i> -fwd	CGGTACGCCCGGCTGCGTGCGTCCG	
<i>CmPCS_(C367A)</i> -rev	CGGACGCCACGCAGCCGGGCGTACCG	
<i>CmPCS_(C367S)</i> -fwd	CGGTACGCCCGTCCGCGTGCGTCCG	
<i>CmPCS_(C367S)</i> -rev	CGGACGCCACGCCGACGGGCGTACCG	

Table 5-3 クローニング(大腸菌発現用)に用いたプライマー

Primer	Sequence (5'→3')	制限酵素部位
<i>CmPCS</i> -fwd	GAGAGA <u>AATTC</u> ATGATCATTGGCGTCCGTTGGTACGTTG	<i>EcoRI</i>
<i>CmPCS</i> -fwd	GAGACATATGATCATTGGCGTCCGTTGGTACGTTGCGTTAC	<i>NdeI</i>
<i>CmPCS</i> -rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTACTTGTGTTGCTCCTGTTGCTGGTGC	<i>EcoRI</i>
<i>CmPCS</i> -111-fwd	GAGAATTCATATGCCGGCGGTGTCGTTCTATCG	<i>EcoRI/NdeI</i>
<i>CmPCS</i> -338-rev	GAGAGA <u>AATTC</u> CTAACGCACCATAGCGAGACCCCGGGGCAT	<i>EcoRI</i>

5-3. 結果

5-3-1. Cd 含有培地上での形質転換酵母の生育

Fig. 5-1 に, pYES2 ベクターのみ, *CmPCS* 全長(1_560), C ドメインを欠失した tr1_337, tr1_338 を形質転換した酵母の Cd 含有培地上での生育を示した. これより, *CmPCS* 遺伝子により酵母が Cd 耐性能を付与されること, また, Arg³³⁸ を削除すると Cd 耐性が失われることが分かった.

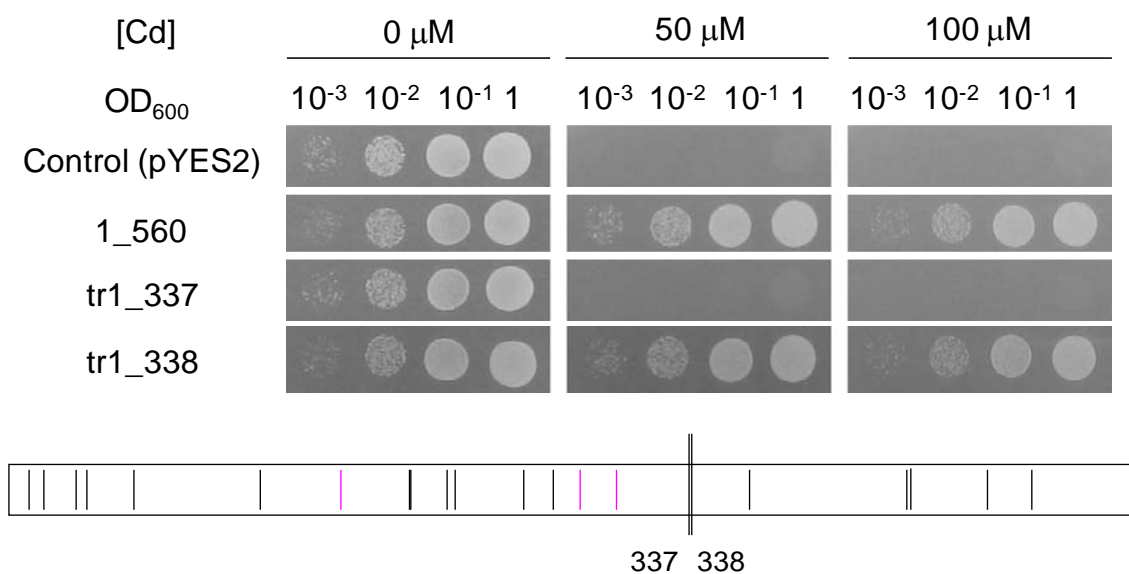


Fig. 5-1 *CmPCS* 全長(1_560)と C ドメイン削除断片による形質転換酵母の生育

Fig. 5-2 に, *tr1_338* において, Arg³³⁸ を 13 種類の別のアミノ酸に変換した, *tr1_338*(R338X) を形質転換した酵母の Cd 含有培地上での生育を示した. Arg³³⁸ を Asp³³⁸, Pro³³⁸ に変換した変異体では, 形質転換酵母の Cd 耐性能が失われ, Glu³³⁸ に変換した変異体では, Cd 耐性能が減少していることが分かった.

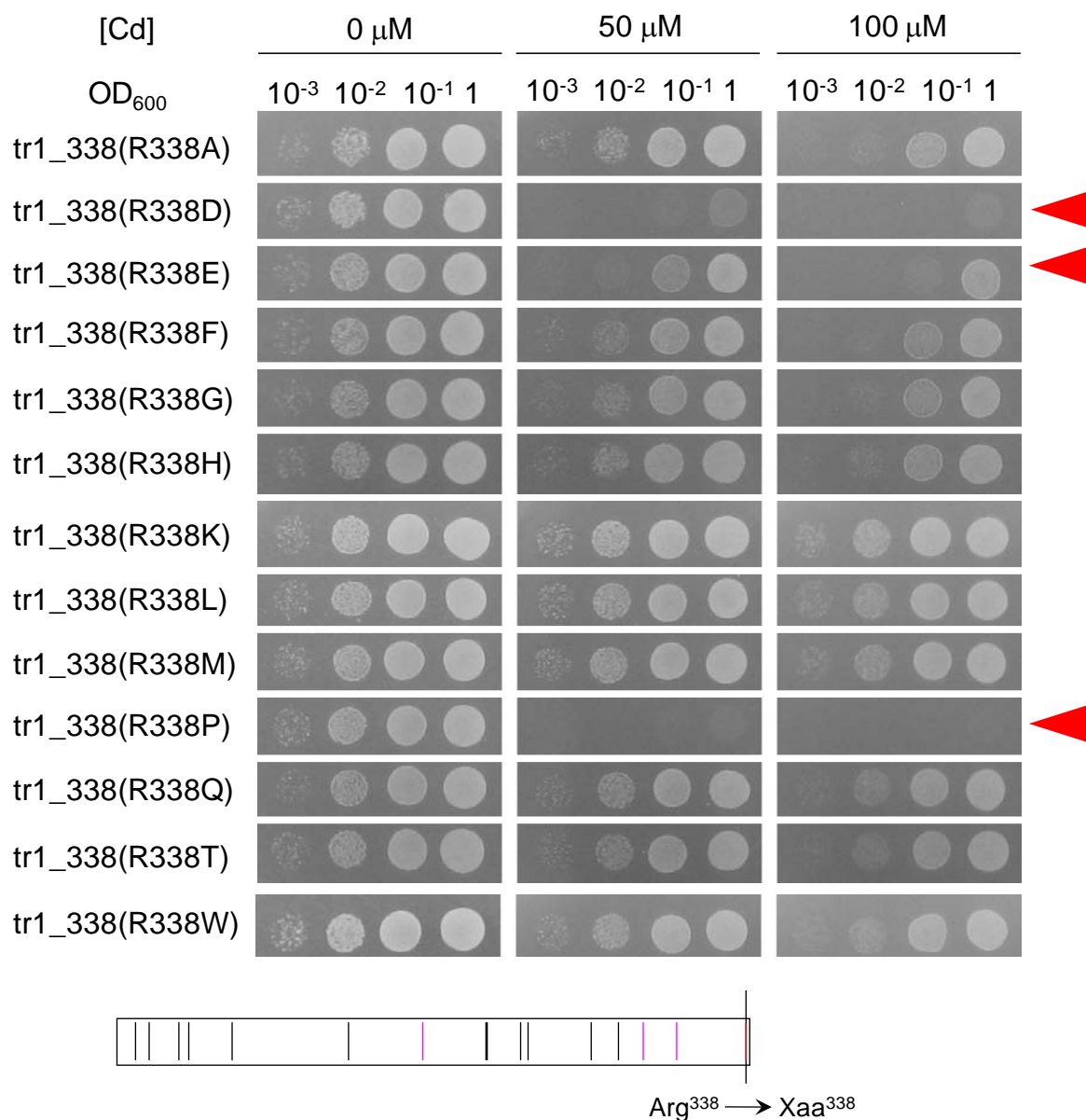


Fig. 5-2 *tr1_338*(R338X) 断片による形質転換酵母の生育
赤色の矢印の形質転換体では, Cd によって生育が阻害されていることが分かる.

Fig. 5-3 に、N 末端側から徐々にアミノ酸配列を削除した、tr_x_560 を形質転換した酵母の Cd 含有培地上での生育を示した。N 末端が 111~120 付近の位置まで削除すると、形質転換酵母の Cd 耐性が弱くなることが分かった。

Fig. 5-4 に、C ドメインを Arg³³⁸ の位置で削除した断片の、さらに N 末端側から徐々にアミノ酸配列を削除した、tr_x_338 を形質転換した酵母の Cd 含有培地上での生育を示した。N 末端から 114 アミノ酸を削除した tr115_338 では、形質転換酵母の Cd 耐性能はほぼ失われることが分かった。なお N 末端側では、Arg³³⁸ の場合のように、1 アミノ酸を削除すると Cd 耐性能が急に失われるのではなく、徐々に減弱していく様子であった。

この結果より、C ドメインと X ドメインを削除した tr111_338 を形質転換した酵母は Cd 耐性を有することが分かった。

Fig. 5-5 に、Arg³³⁸ を他のアミノ酸(Glu, Phe)に変換した CmPCS 全長(1_560)、また C ドメイン中の Cys³⁶⁷ を Ala, Ser に変換した CmPCS 全長(1_560)およびその削除断片を形質転換した酵母の Cd 含有培地上での生育を示した。全ての形質転換酵母が Cd 耐性能を有していた。Arg³³⁸ は、C ドメイン削除体では Cd 耐性の付与に関与していると考えられたが、全長(1_560)が存在する場合には、tr1_338(R338E)で見られたような Cd 耐性能の低下はみられなかった。また Cys³⁶⁷ は、C ドメイン中の金属結合サイトの候補であったが(大崎, 2008)、いくつかの変異断片で形質転換酵母を作製したところ、Cd 耐性には影響しなかった。

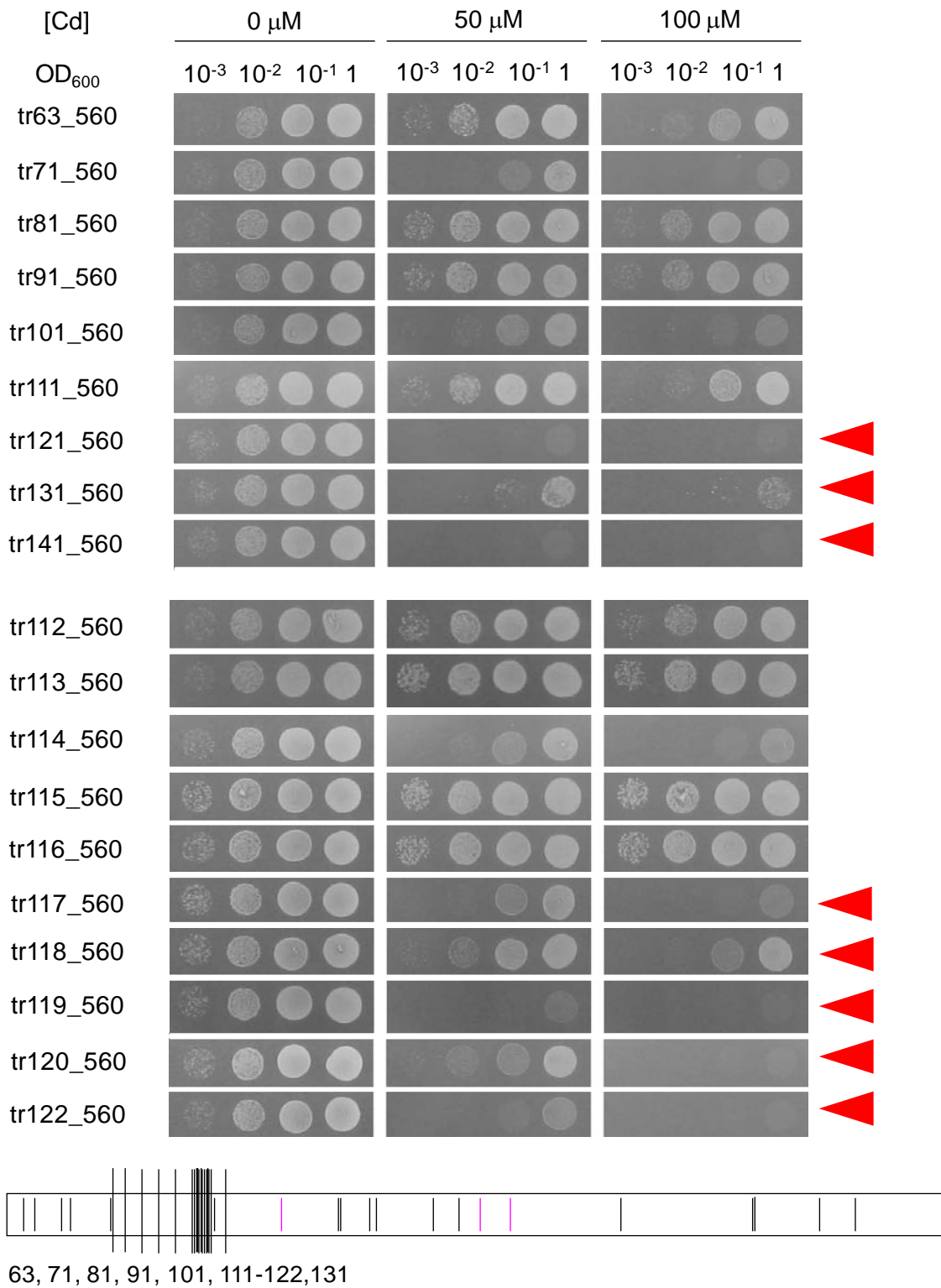


Fig. 5-3 *tr_x_560* 断片による形質転換酵母の生育

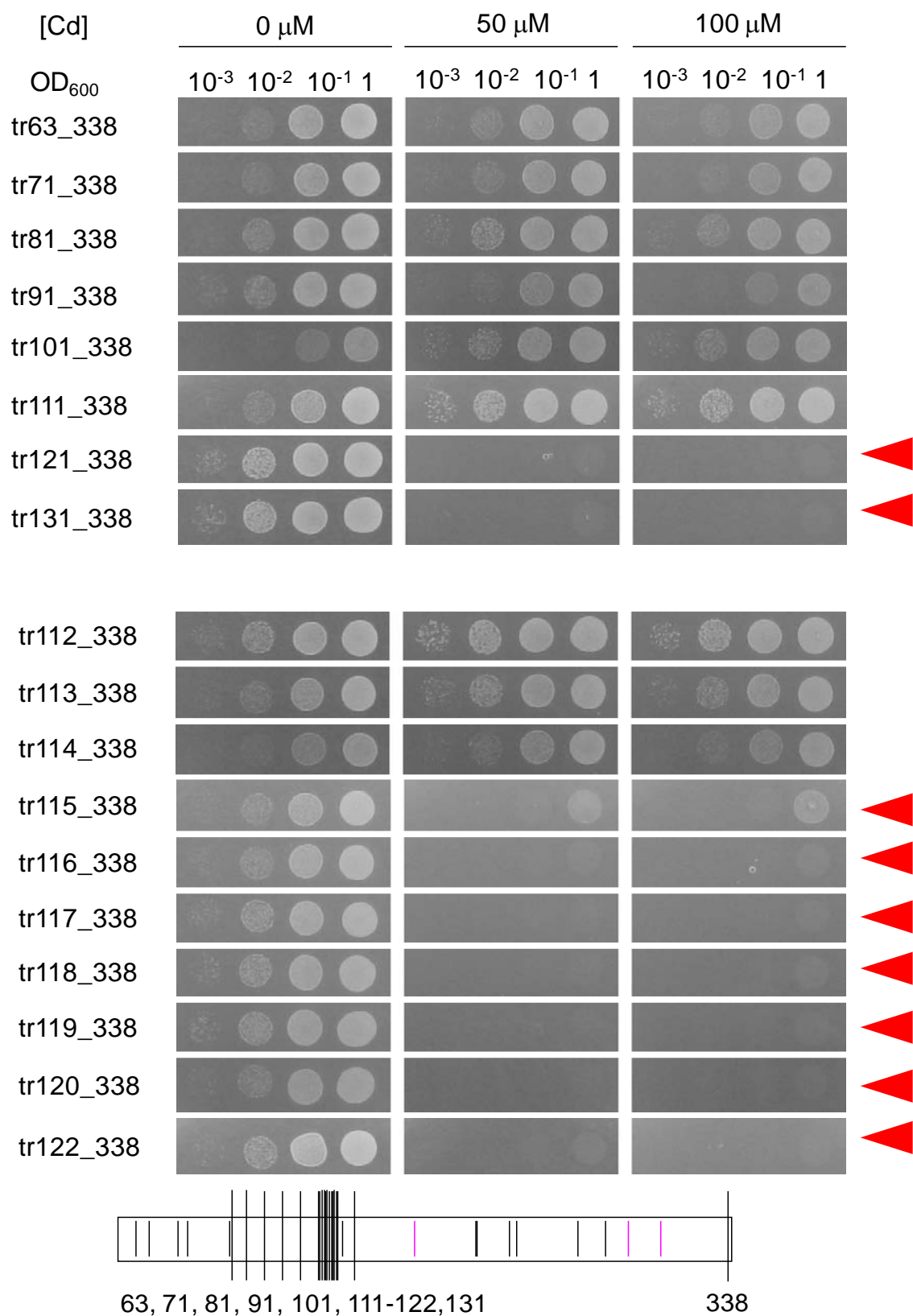


Fig. 5-4 tr_x_338 断片による形質転換酵母の生育

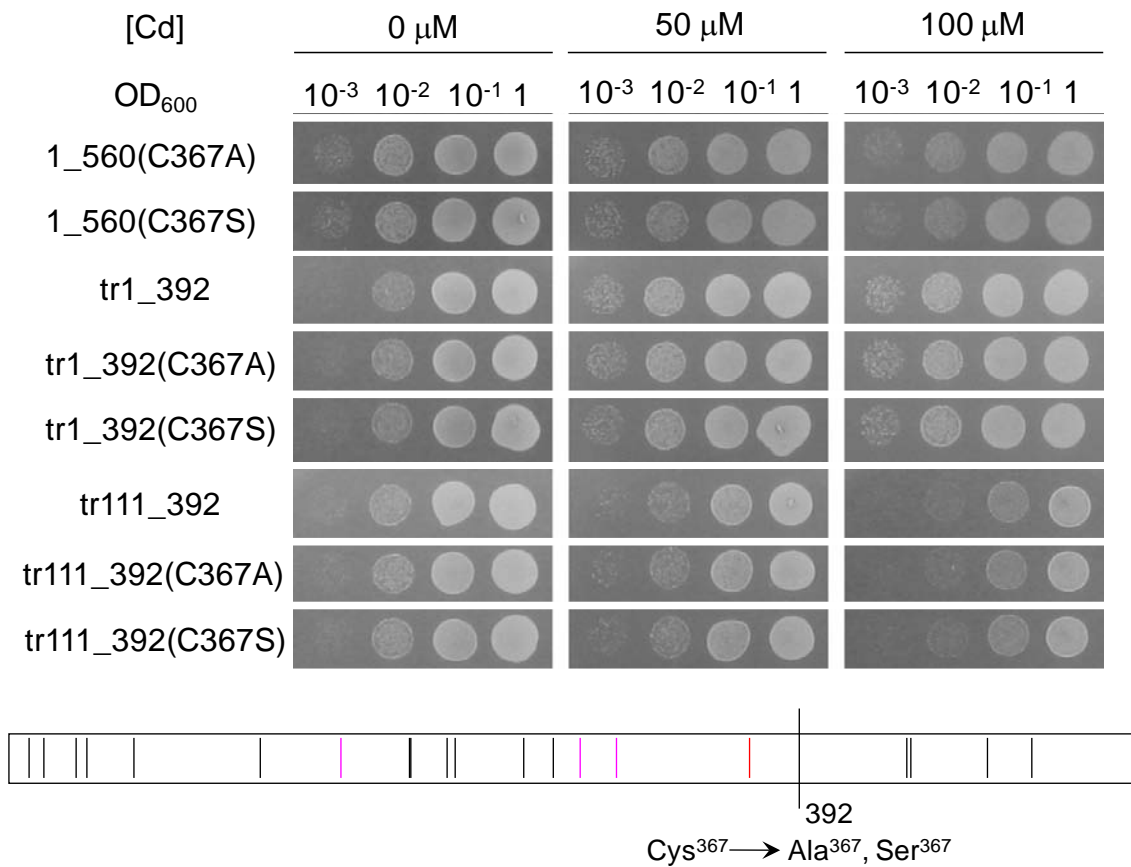
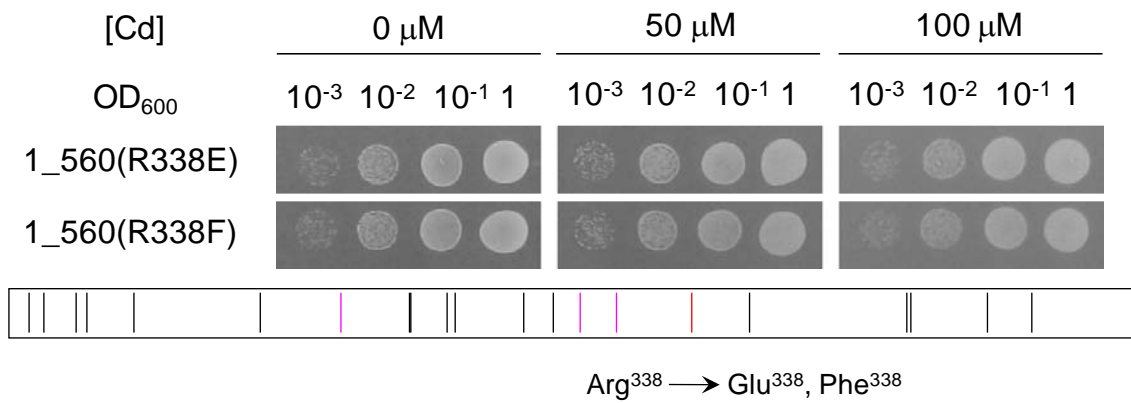


Fig. 5-5 Arg³³⁸, Cys³⁶⁷の変換と形質転換酵母の生育

5-3-2. BSO 添加と形質転換酵母の Cd 耐性能

Fig. 5-6 に、前述の実験で使用したいくつかの形質転換酵母の Cd, BSO 含有培地上での生育を示した。BSO は Fig. 5-7 に示した構造を持ち、GSH 合成の律速酵素である γ -glutamylcysteine synthetase(γ -ECS) を阻害する。その結果として、GSH を基質とする PC の合成もまた阻害される。この作用は、BSO が γ -ECS の基質である γ -glutamyl- α -aminobutyrate と構造が類似していることに由来すると考えられている(Griffith *et al.*, 1979)。BSO の添加により、Cd 耐性能を有していた形質転換酵母において耐性能の欠失または減弱がみられた。PCS は Cd 結合性のタンパク質であり、発現した PCS 自身が Cd と結合していることによって耐性能を付与している可能性も考えられたが、この結果は Cd 耐性能が PC 合成に由来することを示すものである。

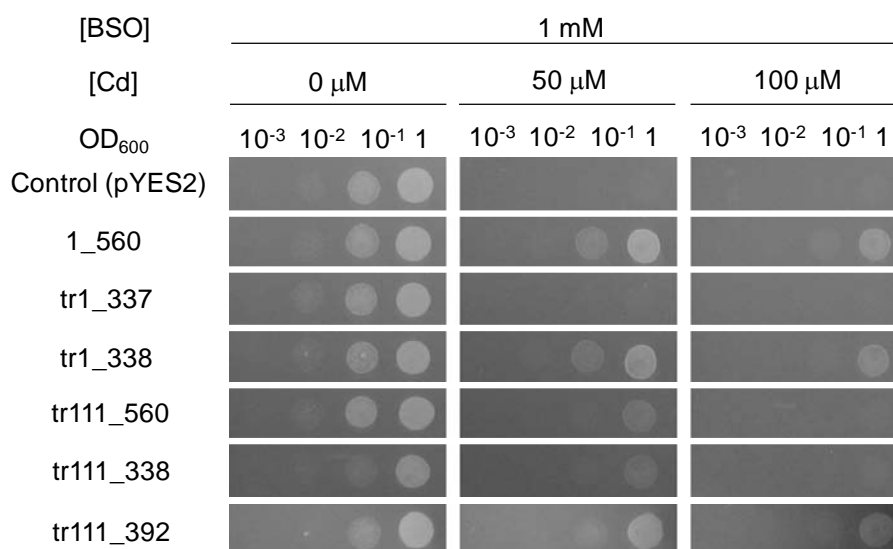


Fig. 5-6 BSO 添加培地による形質転換酵母の Cd 耐性能

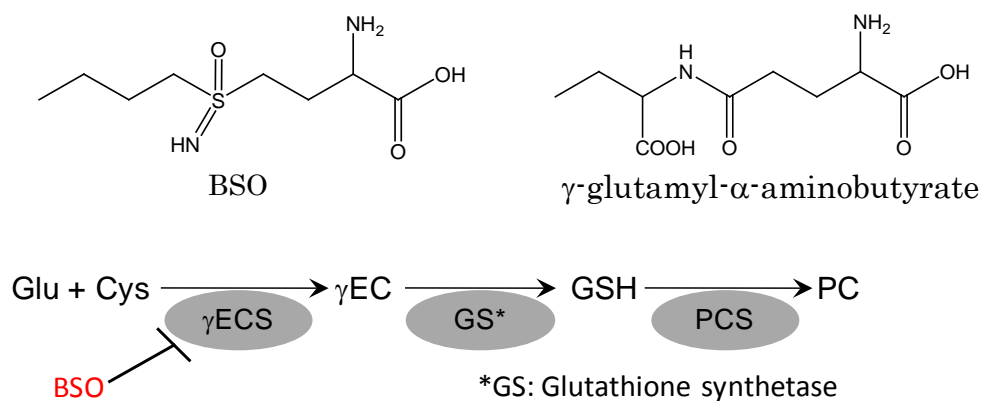


Fig. 5-7 BSO および γ -glutamyl- α -aminobutyrate の構造

5-3-3. 形質転換酵母の PC 合成量の測定

Cdを加えた液体培地で培養した形質転換酵母の PC 合成量を HPLC を用いて測定した。BSO を用いた実験から、PCS 活性を有する(変異)*CmPCS* 遺伝子の導入により、Cd 曝露時には PC が誘導合成されて Cd 耐性を獲得していることが示されたため、合成される PC 量を測定することで PCS 活性を評価することができる。Fig. 5-8 に、tr1_338(R338X) の PC 合成量を示す。Arg³³⁸を Asp³³⁸, Glu³³⁸, Pro³³⁸に変換したものでは菌体内での PC 合成量が減少していることが分かった。この結果は寒天培地上での Cd 耐性能と合致した(Fig. 5-2)。

Fig. 5-9 に、Flag-tag を付与して発現させたいいくつかの変異 *CmPCS* の PC 合成量を示す。前述の各 tr1_338(R338X) の場合は、C 末端の 1 アミノ酸の変異のみではタンパク質の発現量に大きな影響はないと考えられるが、X ドメインや C ドメインを 100 アミノ酸単位で削除した場合、酵母細胞内でのタンパク質の発現量が異なる可能性がある。Flag-tag によってタンパク質の発現量を定量することを試みたが、通常の Western blotting によって目的のシグナルを検出することはできなかった。酵母細胞内での *CmPCS* の発現量が検出限界以下であると考えられ、異なるドメインを削除した変異 PCS 間で PC 合成量を比較するには至らなかった。なお、Cys³⁶⁷の 1 アミノ酸を Ala, Ser に変換したものについて、タンパク質の発現量も同程度であると仮定して PC 合成量を比較したが、Cys³⁶⁷の変換による PC 合成量の変化はみられなかった(Fig. 5-9 (A))。

Fig. 5-10 に、*CmPCS* 全長(1_560), C ドメイン削除体(tr1_338), X ドメイン削除体(tr111_560)について、形質転換酵母の抽出液のクロマトグラムを示した。変異 *CmPCS* を導入したクロマトグラムにおいて、PC₂の後に未知ピークを与える物質(BPX₅₂₂と表記する、後述参照)が溶出されることが分かった((B)-(G))。これは *CmPCS* の反応副産物であると考えられた。PC₂に対するこの未知物質の割合(ピーク面積比)を Fig. 5-11 に示した。F-1_560 と F-tr1_338 では PBX₅₂₂/PC₂比は同程度であったが、F-tr1_392 では 3 倍程度大きくなっていった(Fig. 5-11 (A))。また、X ドメインを削除すると、3 つの場合すべてにおいて、PBX₅₂₂/PC₂が大きくなることが分かった(Fig. 5-11 (B))。特に tr1_392-F から X ドメインを削除して、tr111_392-F としたものでは、PBX₅₂₂/PC₂比が 5 倍以上大きくなった。

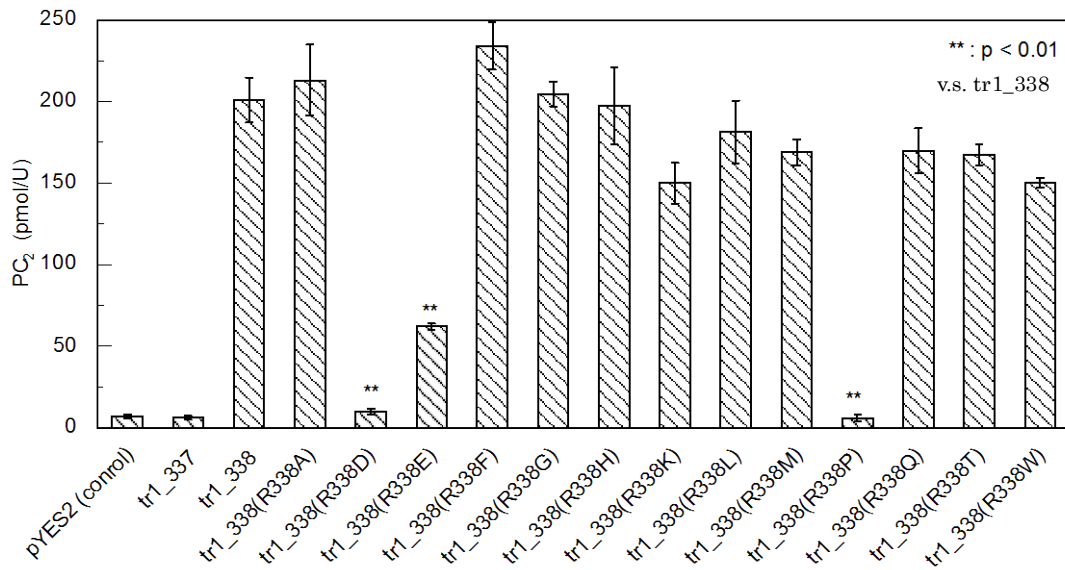


Fig. 5-8 tr1_338(R338X) 形質転換体の PC 合成量

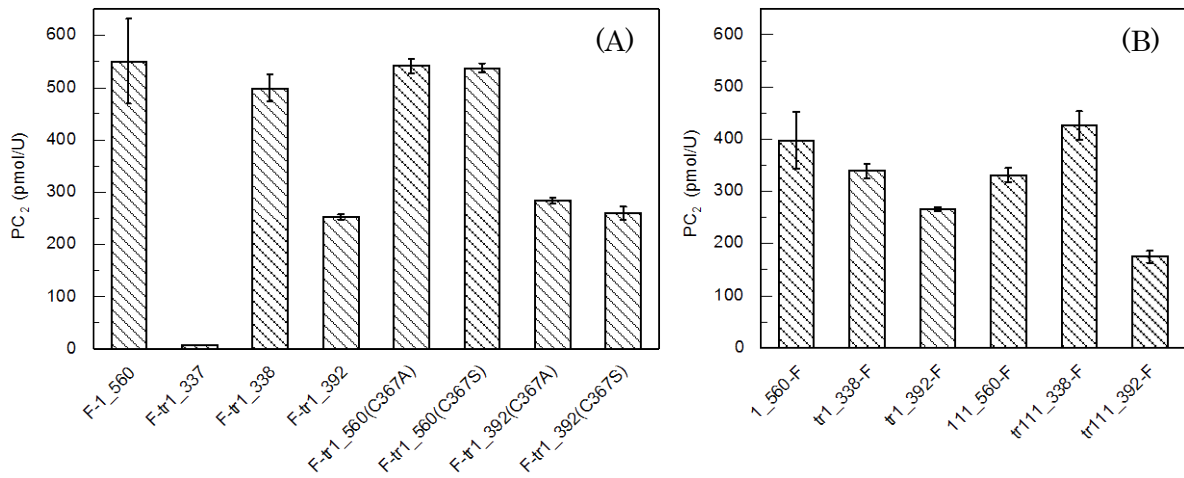


Fig. 5-9 FLAG-tag を付加した変異 CmPCS の酵母形質転換体の PC 合成量
 “F-”は N 末端に, “-F” は C 末端に Flag-tag が付加されていることを示す. Fig.
 5-10, 5-11 も同様.

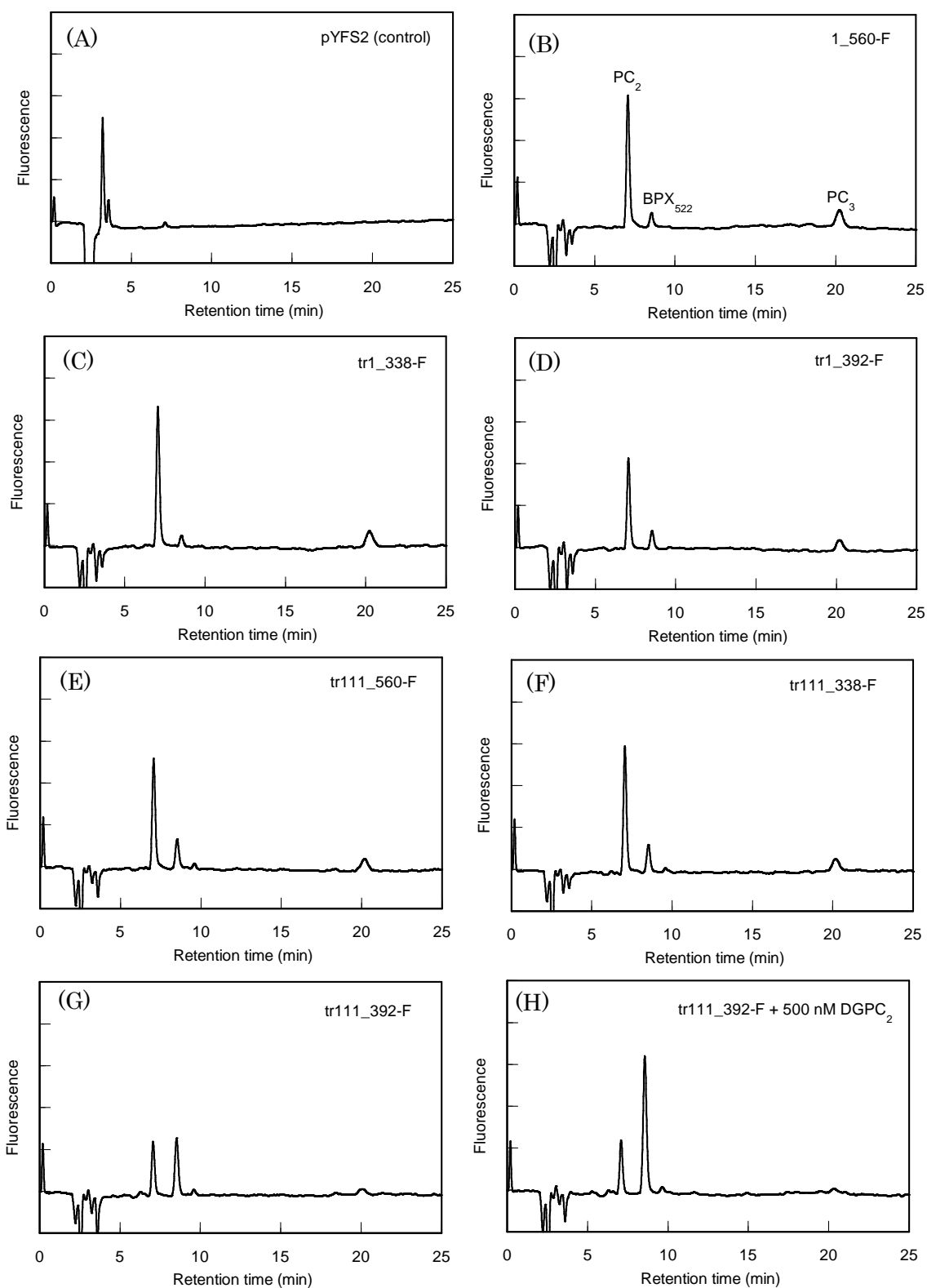


Fig. 5-10 酵母形質転換体の抽出液のクロマトグラム

PC₂, BPX₅₂₂ の Retention time はそれぞれ 7.06, 8.50 min. 変異 CmPCS を導入した(B)-(G)において BPX₅₂₂ が検出されている。

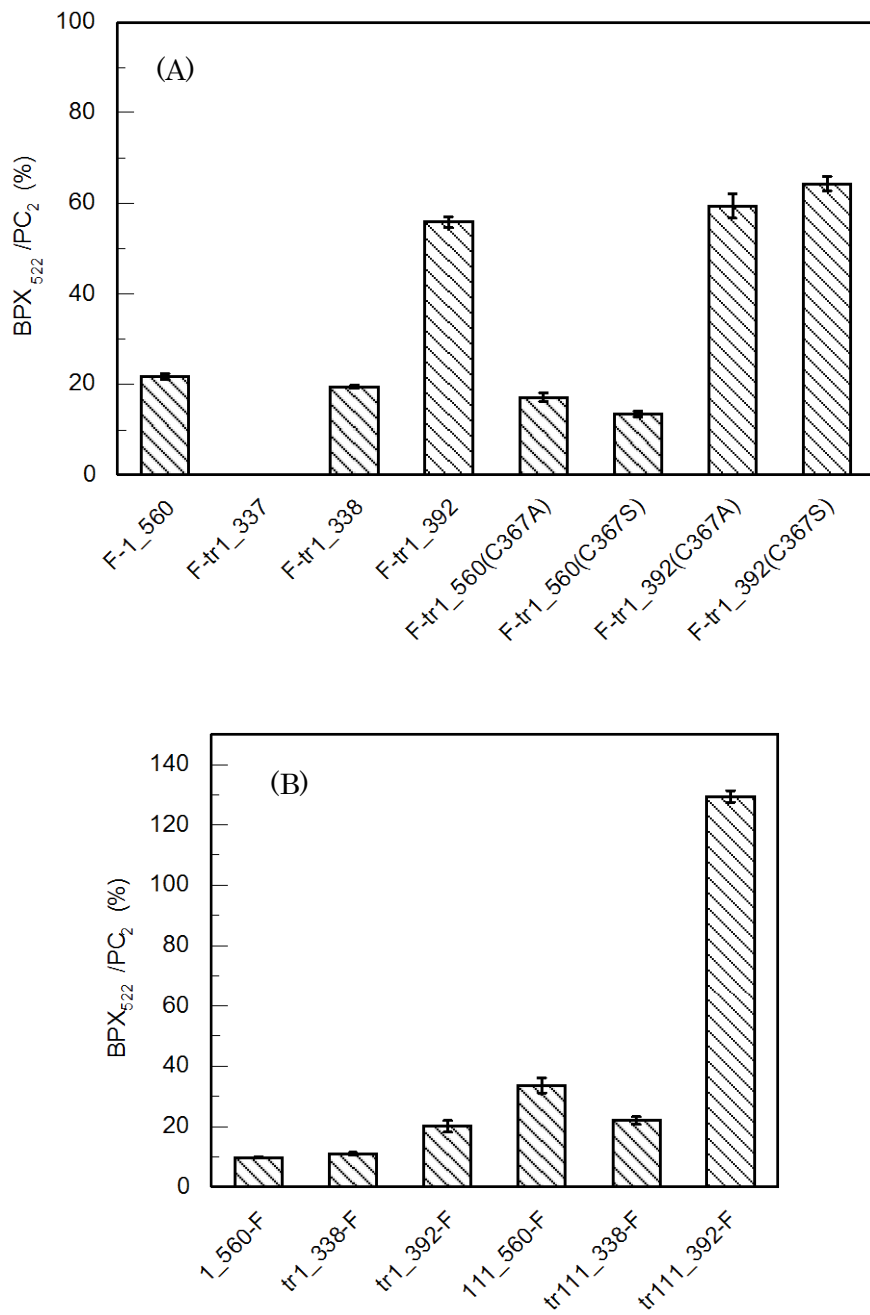


Fig. 5-11 PC₂に対する副産物の割合(ピーク面積比)

5-3-4. 未知ピークの分取精製と質量分析

形質転換酵母の抽出物に現れた未知物質は PC 類似物質であると考えられた。desglycyl PC₂(以下 DGPC₂と表記する)との共溶出を行ったところ、未知物質の示すピーク面積が上昇したことから、この物質は DGPC₂ではないかと推定された(Fig. 5-10 (H)).

この未知物質を分取クロマトグラフィーにより単離・精製を行って分析した結果を Fig. 5-12 に示す。2 L の酵母培養液から、DGPC₂と仮定した場合に 5 nmol 程度となる量の未知物質を精製することができた(Fig. 5-12 (E), (F)). LC-MS により質量分析を行ったところ、Fig. 5-13 に示す MS スペクトルが得られ、未知物質は DGPC₂と分子量が一致しなかった。この未知物質(Byproduct X₅₂₂; BPX₅₂₂)について、MS/MS などによって構造決定を行うことも考えられたが、収量が少なくサンプル量が足りなくなってしまった。また、Fig. 5-12 (C)と(E), (D)と(F)を比較すると(C)-(E)ではピーク面積は 10 倍程度になっているのに対し、(D)-(F)では 3 倍程度にしかならず、蛍光で検出できない物質が UV で検出されていることが示唆される。このように、BPX₅₂₂は酵母抽出液というクルードなサンプルを ODS カラム 1 段階で精製して取得した物質であるために、同一溶出時間の共雑物が混在している可能性等も考え、これ以上の解析は断念することとした。

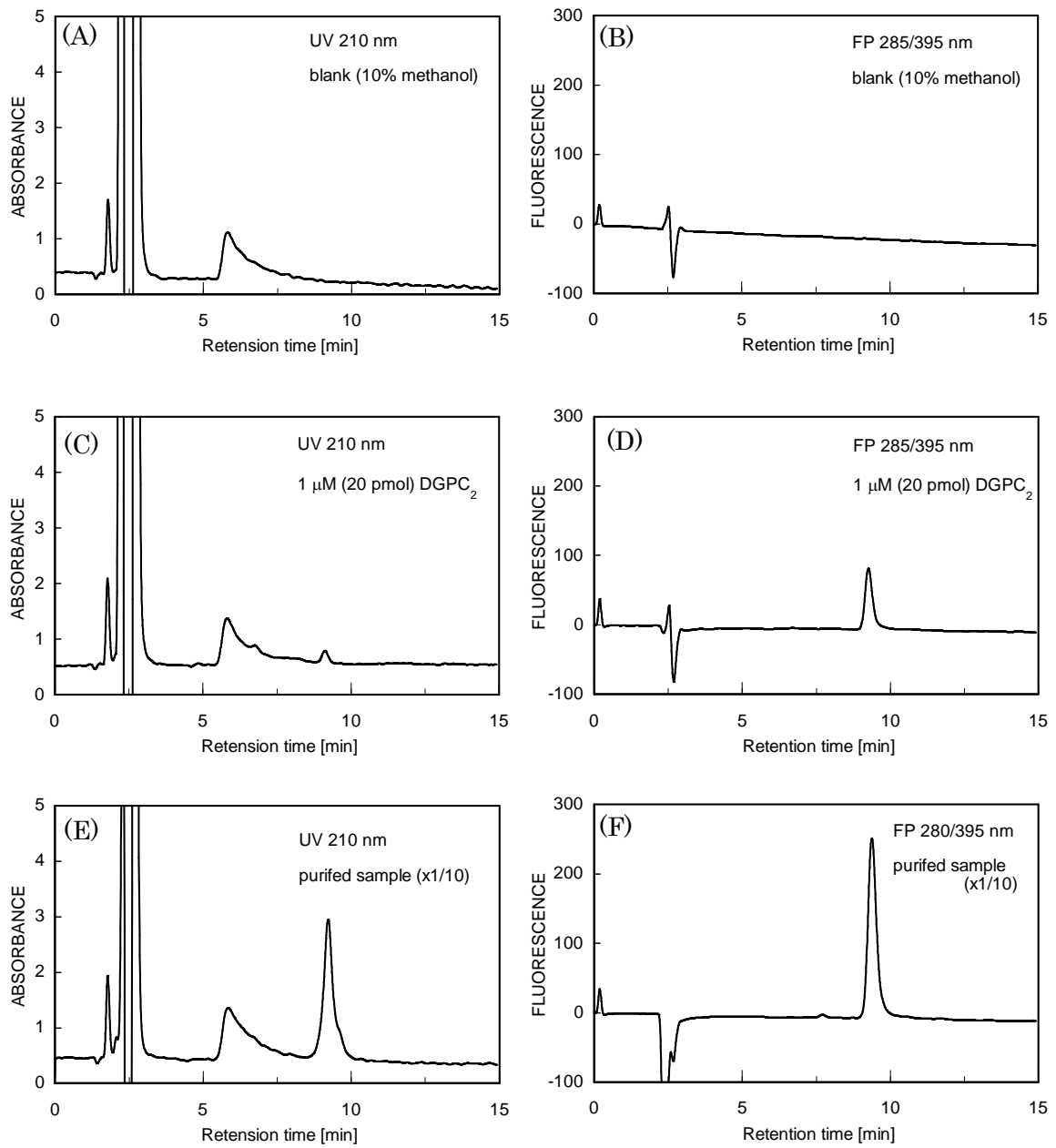


Fig. 5-12 未知ピークのを分取を行った精製サンプルのクロマトグラム

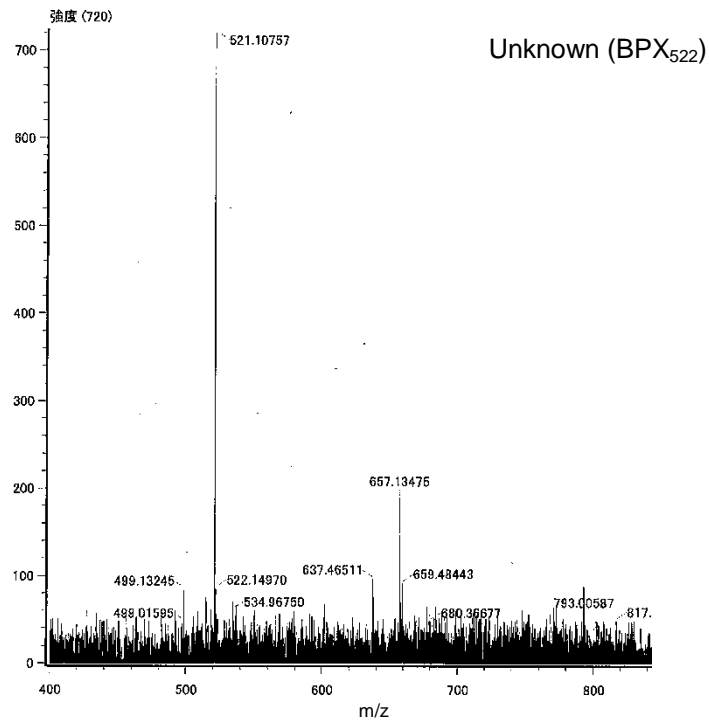
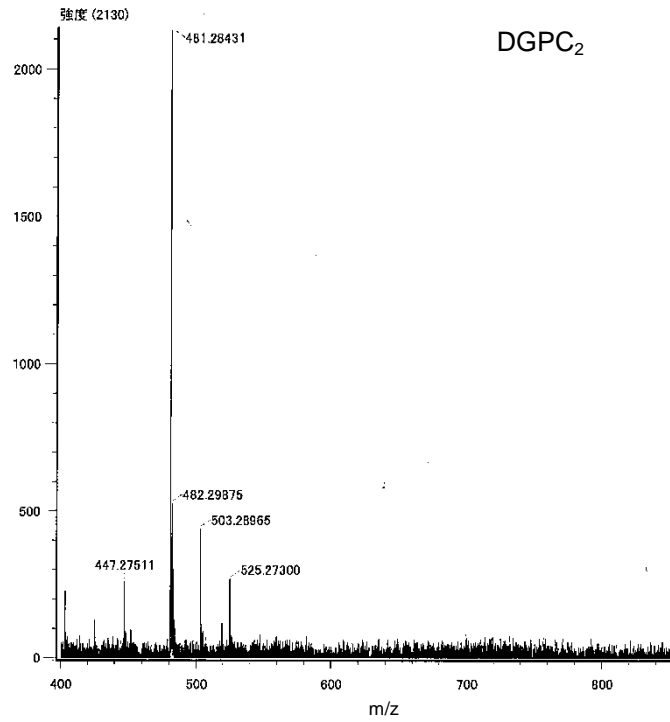


Fig 5-13. DGPC₂と未知物質のMSスペクトル
 ネガティブモードで測定. DGPC₂: [M]⁻= 482.56

5-3-5. tr111_338 の 3D モデル構造の作成

4-2-7 に示した方法と同様にして、活性を保持していた変異体 tr111_338 の 3D モデル構造の作成を試みた。2BTW を鋳型として、C 末端の Arg³³⁸ までのモデル構造を作成することができた(2BTW を鋳型としてモデリングできる限界が、ちょうど Arg³³⁸ までであった)。これは、PCS としての活性を示すタンパク質のモデル構造を提示した例としては初めてであると考えられる。C 末端部分は catalytic triad とは反対側に位置していたが、この部分はタンパク質全体の中心部を貫く位置にあることが分かった。

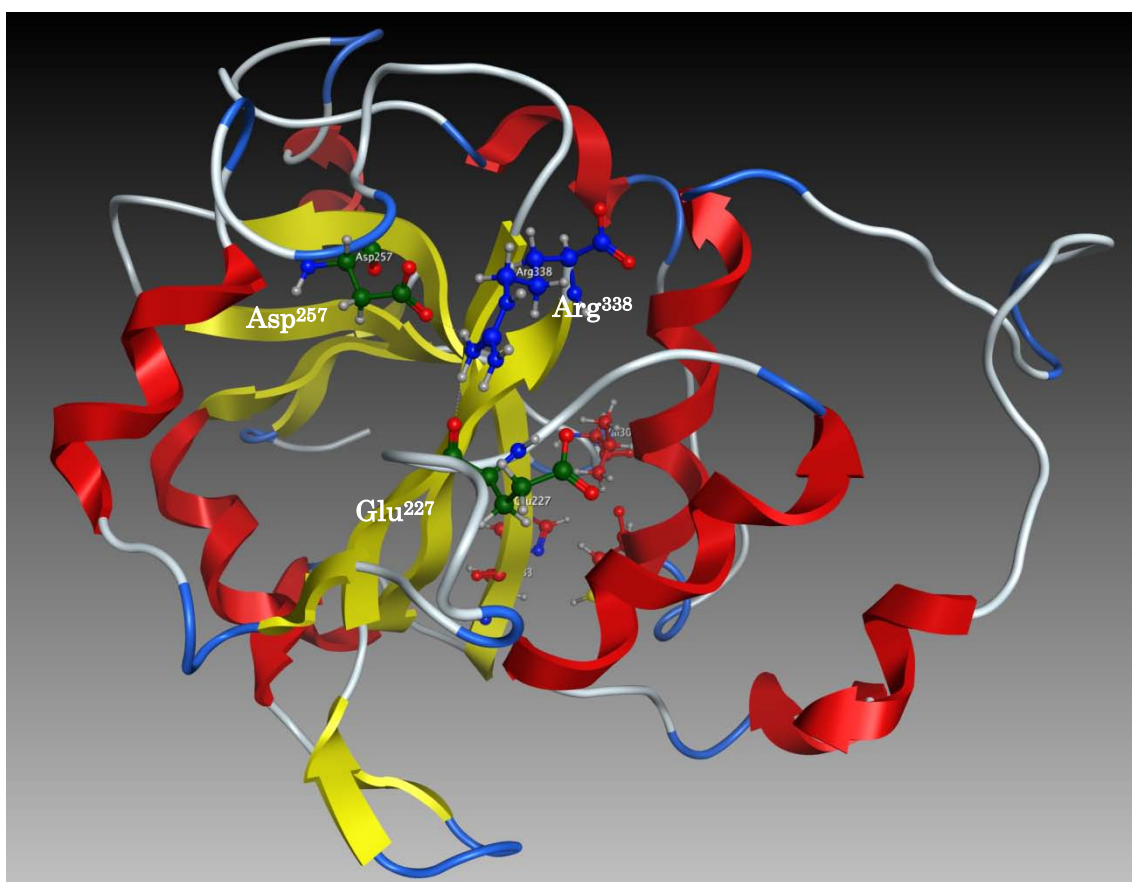


Fig. 5-14 tr111_338 の 3D モデル構造

catalytic triad を赤色(向かって反対側), Arg³³⁸を青色, Glu²²⁷, Asp²⁵⁷を緑色の側鎖で示した。

Arg³³⁸が3Dモデル構造上で相互作用している残基を調べた結果を Fig. 5-15 に示した。グアニジル基の正電荷の部分が、Glu²²⁷、Asp²⁵⁷と電荷的相互作用を形成していることが分かった。またペプチド結合の末端のカルボキシル基の部分で Arg²⁵⁸ との相互作用も観察された。

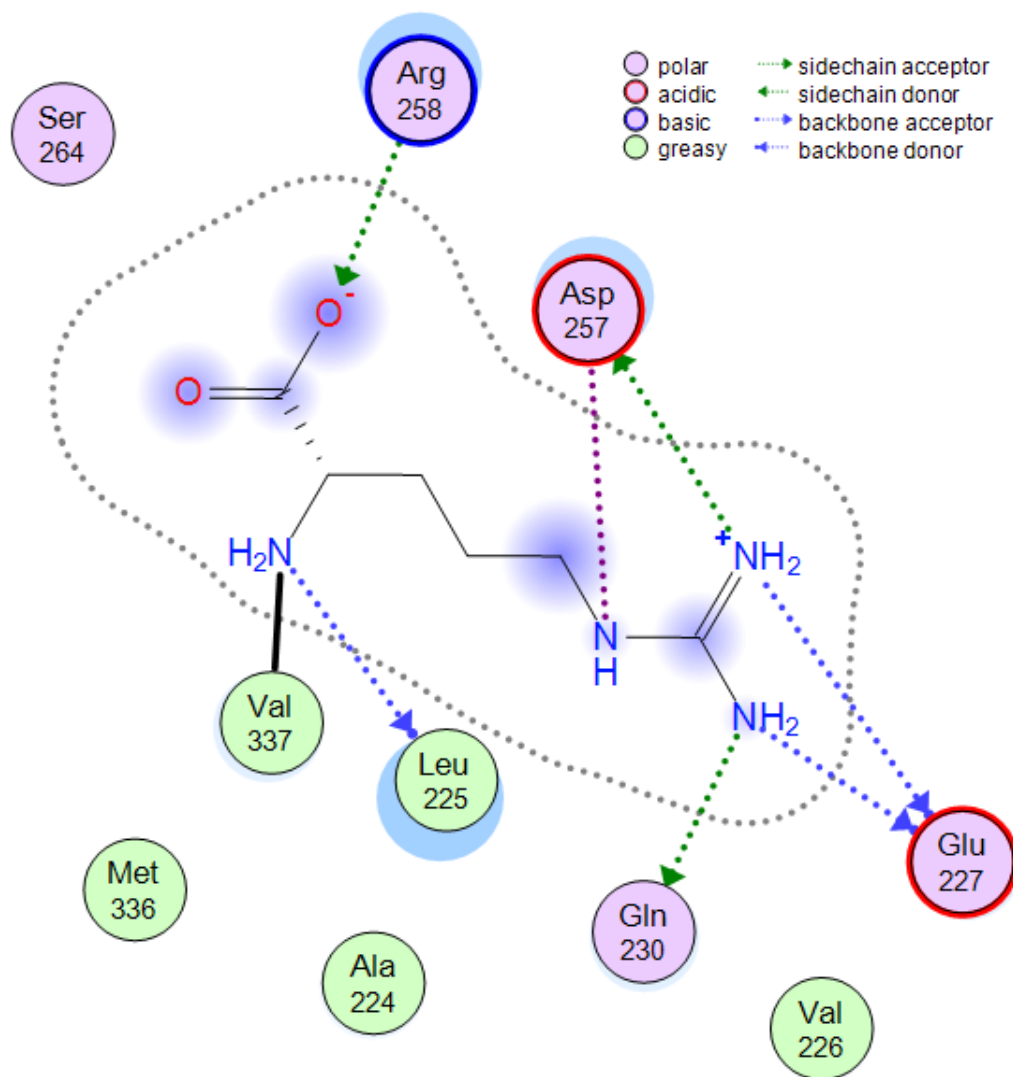


Fig. 5-15 3D モデル構造上の Arg³³⁸ 周辺の残基と相互作用部位

5-3-6. *CmPCS* の大腸菌での発現

CmPCS を 3 種類のベクターを用いて大腸菌内で発現させた SDS-PAGE の結果を Fig. 5-16 に示す. 各ベクターとも発現量が多いものの, そのほとんどが不溶性画分に存在していることが分かった.

可溶性の向上を期待して, N 末端に SUMO1-tag を付加して発現させた結果を Fig. 5-17 に示す. pET28b, pGEX6p1 においては発現が確認できるが, 可溶性画分に発現させることはできなかった.

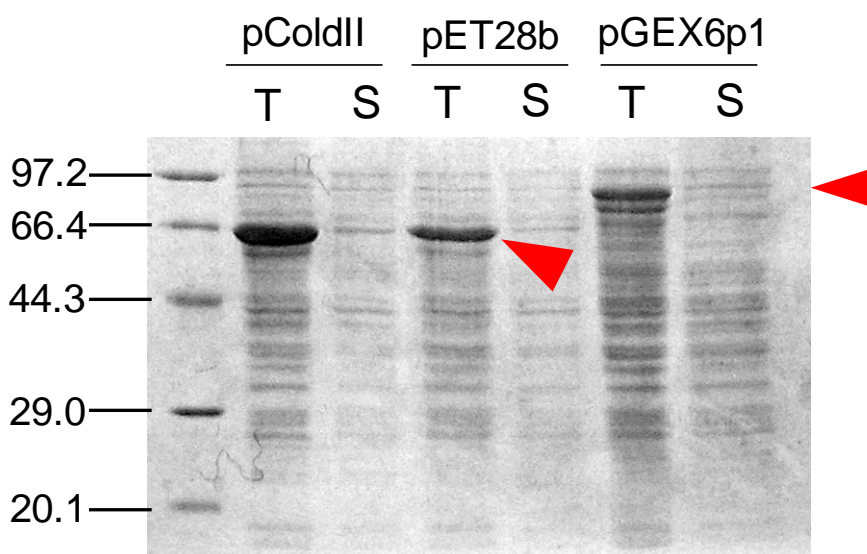


Fig. 5-16 *CmPCS* 全長(1_560)の大腸菌による発現

T: total, S: Sup. 予想される分子量は 63.0 kDa(pColdII), 63.7 kDa(pET28b), 88.7 kDa(pGEX6p1). 赤色の矢印は発現した目的タンパク質を示す.

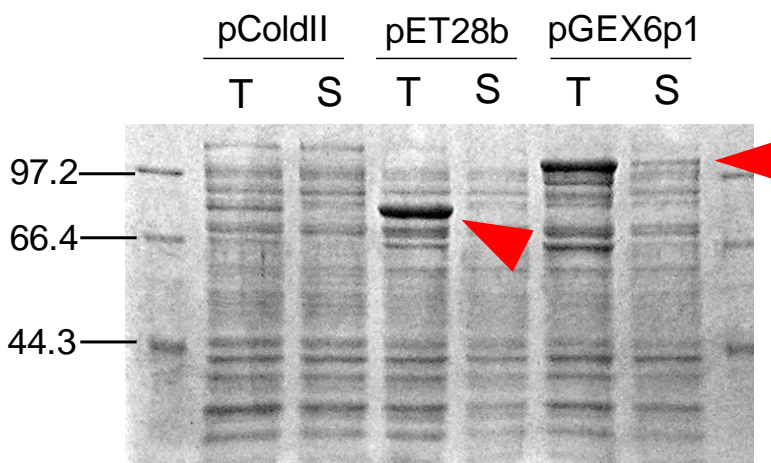


Fig. 5-17 SUMO1-*CmPCS*(1_560)の大腸菌による発現

T: total, S: Sup. 予想される分子量は 75.0 kDa(pColdII), 75.7 kDa(pET28b), 100.7 kDa(pGEX6p1).

CmPCS 全長(1_560)から X ドメインを削除した, *tr111_560* の発現の様子を Fig. 5-18 に示す. *pColdII*, *pET28b* においては *CmPCS* 全長と比べて発現量は少なかったものの, 半分量程度を可溶性画分に発現させることができた. *pGEX6p1* においても半分量程度を可溶性画分に回収することができた.

tr111_338 の発現の様子を Fig. 5-19 に示す. *pColdII*, *pET28b* においては発現を確認することができなかった. *pGEX6p1* では, 一部を可溶性画分に発現させることができたものの, *tr111_560* に比べて可溶性画分に発現したタンパク質の割合は小さかった.

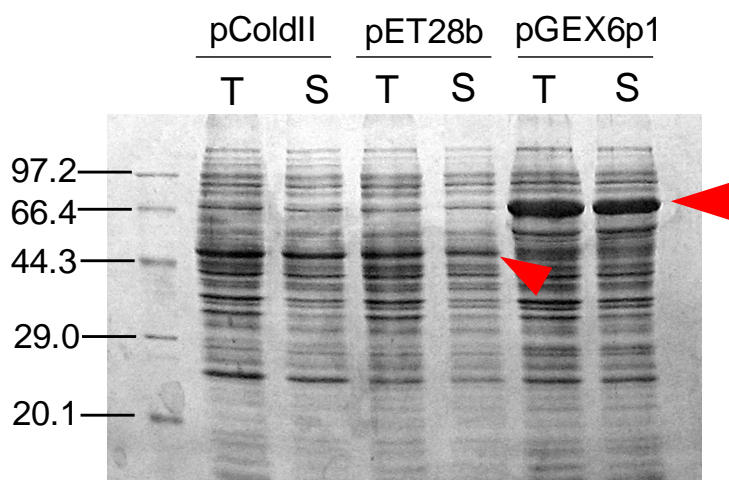


Fig. 5-18 *tr111_560* の大腸菌による発現

T : total, S : Sup. 予想される分子量は 50.9 kDa(*pColdII*), 51.6kDa(*pET28b*), 76.6 kDa(*pGEX6p1*).

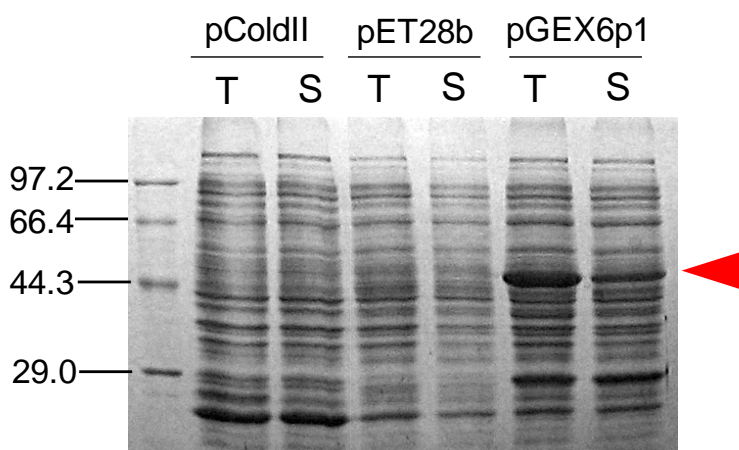


Fig. 5-19 *tr111_338* の大腸菌による発現

T : total, S : Sup. 予想される分子量は 26.7 kDa(*pColdII*), 27.4 kDa(*pET28b*), 52.4 kDa(*pGEX6p1*).

5-4. 考察

酵母形質転換体を用いた変異 *CmPCS* の解析により, *CmPCS* の各ドメインやアミノ酸残基が酵素活性に与える影響について, いくつかの知見を得ることができた.

CmPCS は他の生物種には見られない機能未知の X ドメイン(1_110), 活性中心が存在する N ドメイン(111_338), 金属探知に関与すると考えられる C ドメイン(339_560)から構成されている. *CmPCS* 全長(1_560)から X, C ドメインを削除した *tr111_338* は, 形質転換酵母に Cd 耐性を付与し, かつ PC 合成が認められた. よって *tr111_338* は実際に機能する PCS であることが分かった. *tr111_338* は 228 アミノ酸のタンパク質であり, *CmPCS* 全長と比較して半分以下の分子量である. 一般に真核生物の PCS では, N ドメインは活性中心を含み, C ドメインが金属による活性化に寄与していると言われている. *CmPCS* は N ドメインに相当するこの部分のみで, どのように活性化しているのか, 今後調べていく必要があると考えられる. *tr111_338* は GST-fusion のタンパク質として可溶化発現が可能であり, 精製などの条件検討を行った後, *in vitro* での機能解析も可能となるであろう. X ドメインを削除した *tr111_560* についても, PCS 活性を有しており可溶化発現が可能であるので, *tr111_338* と比較して解析することで, C ドメインに関する知見が得られることが期待される.

C ドメインを削除した *tr1_338* においては, Arg³³⁸ が重要な役割を果たしていると考えられた. 他種の PCS と比較すると, Arg³³⁸ 周辺には正電荷を有する Lys や His などのアミノ酸が種間で保存されていることが分かる(Fig. 5-20). これより, Arg の正電荷が活性に関与しているのではないかと考えられ, *tr1_338* において Arg³³⁸ を他のアミノ酸に変換したところ, 負電荷をもつ酸性アミノ酸である Asp, Glu へ変換したものでは, 形質転換体の Cd 耐性能が減少し(Fig. 5-2), PC 合成量が減少するという結果が得られた. *AtPCS1* では Thr⁴⁹ がリン酸化され, そこに Arg¹⁸³ が相互作用するという報告があるが(Wang *et al.*, 2009), この Thr は *CmPCS* においても保存されており(*CmPCS* において Thr¹⁵⁷), *AtPCS* の Arg¹⁸³ は *CmPCS* の Arg³⁰⁴ に対応する. C ドメイン欠失の *CmPCS* において, Arg³³⁸ の正電荷が活性に寄与していることは, Arg³³⁸ が負電荷を有するアミノ酸残基やリン酸化部位などと相互作用しているためではないかと考えられた.

AtPCS1	199	AMDSIDQSTGKRRGFMLISRPH-REPGLLYTLSCCKDESWI
TaPCS	199	AMNTTDEATGLLRGFMLVSRRS-SAPSLLYTVSCGHGSWK
CmPCS	320	AMSVLDPATGMPRGLAMVRRRP-VVEASGTSNRTPVPSD
NsPCS	220	AMNTVDSVSQKTRGFVFSKTQ-D-----
CePCS	202	ALCSVDVTTKLPRGLVELELKKGTRPLIMYGLKAYVNIND
SpPCS	234	SMFPIDKASGQPRGYVLLLEPMHIPLGVLTVGLNKYSWRNV

Fig. 5-20 Arg³³⁸周辺の正電荷を有するアミノ酸

そこで、PCS 活性を有することが分かった tr111_338 を用いて 3D モデル構造を作成したところ、tr111_338 の C 末端部分がタンパク質全体の中心部を貫く位置に存在していることが分かった。Arg³³⁸はその末端部分に位置しており、338 番目のアミノ酸残基がなくなることによって、タンパク質の立体構造を活性のある状態に保てなくなると考えられた。Arg³³⁸を Ala, Leu, Met, Gln, Thr などに置換しても活性が保たれ、Pro に置換すると活性が消失した要因は、前者では C 末端のカルボキシル基を介して Arg²⁵⁸との相互作用を保つことができたが、Pro ではカルボキシル基の位置が通常のアミノ酸とは異なったために Arg²⁵⁸との相互作用を形成できないためではないかと考えられた。また、Arg³³⁸は Glu²²⁷, Asp²⁵⁷と電荷的な相互作用を形成しており、Arg³³⁸を Asp, Glu に置換した場合に活性が低下した原因は、電荷的な反発により活性型の構造が保てなくなったためではないかと考えられた。

また、CmPCS の X ドメイン、C ドメインを切断することで、PC 合成の副産物とみられる物質の割合が変化することが明らかとなった。X ドメインは、CmPCS に固有であり、他種の PCS には見られないものであるが、このドメインを削除したものでは、C ドメインの形状に関わらず副産物の割合が増加した。このことから、X ドメインは *in vivo* の PC 合成反応の基質認識に寄与しているものと考えられた。

CmPCS の大量発現系の構築という観点では、全長体を様々なベクター、タグで発現させたが十分量を可溶性画分に回収することはできなかった。C ドメイン削除体の tr1_338 もほぼ同様で、GST タグ付きのものが一部可溶性画分に回収できたのみであった。X ドメイン削除体の tr111_560 に関しては、pColdII, pET28b では可溶性画分への回収率は半分程度だったがその発現量は少なかった。GST タグ付きのもの可溶性画分への回収率も同様に半分程度であったが、発現量は前者の 2 つと比較的に多かった。今回は大量精製条件の検討にまでは至らなかったが、GST-tr111_560 タンパク質に *in vitro* 活性があるとすれば、活性をもつ PCS タンパク質として結晶化等に耐えうる量を精製することも可能であると考えられる。

第6章 *Cyanidium caldarium* からの PCS 遺伝子の

単離および機能解析

6-1. 序

6-1-1. *C. caldarium* について

C. caldarium はイデユコゴメの通称をもつ高温・高酸性環境を好む単細胞紅藻で、日本各地の火山や温泉地帯に広く分布し、噴気孔付近の岩石表面や、酸性温泉の源泉付近の小石や岩の表面に付着して生育している。草津温泉のものが有名であり、源泉付近の水温は 70°C、pH は 2.2 である。*C. caldarium* は *C. merolae* と同様に最も原始的な真核藻類の一種とされており、原核生物から高等植物への進化の過程を解明する手掛かりを得るための研究が進められている (Seckback, 1994; Jensen, 1994)。また、*C. caldarium* の重金属耐性については重金属に汚染された水の浄化 (バイオレメディエーション) の観点から研究がなされている (Wolfgang, 1988) が、これまでに PCS 遺伝子の存在についての報告はない。また、*C. melorae* とは異なり、ゲノムの全解読も行われていない。

6-1-2. 目的

C. caldarium に PCS 遺伝子が存在するならば、好熱性藻類由来であるためにタンパク質の安定性が高い可能性があり、構造解析への道が開けることが期待される。本章では、*C. caldarium* の PCS 遺伝子の存在について明らかにし、その遺伝子を単離することを目的とした。さらに、大量発現系の構築、タンパク質の精製、*in vivo* および *in vitro* での機能解析を試みた。

6-2. 実験手法

6-2-1. *C. caldarium* の培養

C. caldarium 株は国立環境研究所より分与されたものを使用した (NIES-2137)。*C. merolae* と同じく M-Allen 培地を用い、37°C、光量 32 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 、100 rpm で振盪培養し、生育は OD₇₅₀ を指標とした。

6-2-2. PC 合成能の検出

OD₇₅₀ = 1.0 の *C. caldarium* 培養液に対して、CdSO₄ を終濃度 0, 0.1, 0.5, 1

mM となるように添加し, Cd に 2 h 曝露した. その後細胞を遠心分離(1,500×*g*, 15 min, 4°C)により回収し, 細胞 10 U(*)あたり 380 μL の 0.1% TFA に懸濁し, 100 μL の Glass beads を加えて時々氷冷しながら 10 分間激しくボルテックスを行った. 遠心分離(22,000×*g*, 5 min, 4°C)により Glass beads と細胞残渣を分離した上清に, 1 M HClO₄ を終濃度 0.05 M となるように加え(1/19 vol.), ポアサイズ 0.22 μm のフィルター(Millipore)を通して除タンパク質を行った. 得られた溶液 20 μL を HPLC によって分析した.
(*OD₇₅₀ = 1.0 の培養液 1 mL から得られる細胞量を 1 U とする.)

6-2-3. Degenerate PCR

C. caldarium の cDNA Library は東洋大学生命科学部, 長坂征治博士よりご供与いただいた. これは *Adh1* プロモーターおよびターミネーターを持つ *S. cerevisiae* 用発現ベクター pHY27 (6.5kb) によって構成されたものである. pHY27 は, pVT-L ベクター(Vernet *et al.*, 1987)を改変して作成されたものである. Degenerate PCR は Table 6-1 に用いたプライマーと Ex taq® (Takara) を使用した. プライマー作製に用いた領域は Fig. 6-3 に示した. Degeneracy(縮重度)が高いと各プライマーのモル濃度が低下し, PCR の増幅効率が悪くなると言われているため, 3' 末端のミスマッチをなくし, それ以外の部分を *C. merolae* の塩基配列を採用した Degeneracy の低いプライマーも同時に作製した. 増幅された配列は pGEM®-T Easy Vector (Promega) に TA クローニングを行い, DNA シークエンサーにより塩基配列を解析した. その後, 遺伝子全長の配列の 5' 側, 3' 側を増幅するためのプライマーも Table 6-1 に示した.

6-2-4. *C. caldarium* からの total RNA 抽出, 逆転写, variant の解析

Total RNA 抽出には Sepasol®-RNA I Super (ナカライテスク) を使用し, 使用方法は添付のプロトコールに準じた. ここでは, 湿容量 1 mL の *C. caldarium* 細胞に対して 5 mL の Sepasol を加えた後, 2 mL の Glass beads を加えてボルテックスを行い細胞壁を破碎した. DNaseI (Takara) により混入したゲノム DNA を消化し, First-strand cDNA Synthesis Kit (Life Sciences, Inc.) を使用して逆転写を行った. 逆転写には 10 μg の total RNA を供し, poly(dT)をプライマーとして用いた. variant の解析には, Table 6-2 に示したプライマーと Ex taq® を使用した.

6-2-5. *C. caldarium* からのゲノム DNA 抽出

湿容量 1 mL の *C. caldarium* 細胞に対して, Lysis buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 5 M NaCl) 5 mL と 2 mL の Glass beads を

加え、ボルテックスによる破碎と液体窒素による凍結を 3 回繰り返した。その後、0.5 mg/mL となるように Proteinase K を加え、65°C で一晩インキュベートすることによりタンパク質を分解した。フェノール・クロロホルム抽出を数回繰り返した後、エタノール沈殿を行った。RNaseA 処理後、再びフェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、ゲノム DNA を精製した。

6-2-6. Southern hybridization

ゲノム DNA を制限酵素で消化し、アガロースゲル (Seakem® GTG® Agarose) 電気泳動によって分離後、Hybond-N+メンブレン (Amersham) にアルカリトランスファーを行った。プローブのラベリング、ハイブリダイゼーション、検出は、DIG High Prime DNA Labeling and Detection Kit (Roche Applied Science) を使用した。ハイブリダイゼーション時のプローブ濃度は 20 ng/mL、温度は 50°C、Wash は 0.2×high stringency を用いて 68°C で行った。プローブのテンプレート DNA は、pGEM®-T Easy Vector にクローニングされた CcPCS 配列全長を、NcoI で制限酵素処理して得られた断片をアガロースゲルにより分離し精製したものをを用いた。転写後のプローブは、Sepadex® G-50 (Pharmacia) を用いた簡易ゲル濾過により未反応 DIG などを除いて精製した。

6-2-7. 酵母を用いた PCS 遺伝子の活性評価

方法は 5-2-1~5-2-3 に記述したものに準じた。プライマーは Table 6-2 に示したものをを使用した。

6-2-8. 大腸菌を用いた大量発現系の構築

CcPCS 遺伝子は 6-2-4 で合成した 1st strand cDNA をテンプレートに用い、Table 6-3 に示したプライマーと PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Takara) を用いて PCR により塩基配列を増幅した。得られた DNA 断片を pET28b (Novagen) ベクターにサブクローニングし、目的の遺伝子が正しく挿入されていることを DNA シークエンサーにより確認した。作製したプラスミドで *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Novagen) を形質転換した。

この大腸菌を前培養し、200 mL の LB 培地に OD₆₀₀ = 0.1 となるように加えて 25°C で 2 h 培養した後、IPTG を終濃度 40 μM (CcPCSa), 400 μM (CcPCSB) となるように加えてさらに 6 h 培養した。培養終了後、菌体のタンパク質抽出は 3-2-1 に示した方法に準じた。

6-2-9. アフィニティークロマトグラフィー精製

方法は、3-2-2 に示した方法に準じた。目的のタンパク質は、imidazole 濃度

が 150 mM 付近の画分に溶出した。200 mL の培養液から、*CcPCSa*, *CcPCSB* はそれぞれ 3 mg, 1 mg 程度得られた。

Table 6-1 Degenerate PCR 等に用いたプライマー

Primer (Degeneracy)	Sequence (5'→3')
<i>CcPCS</i> -deg-fwd1 (2048)	GAR CCN GCN TWY TGY GGN YT
<i>CcPCS</i> -deg-fwd1 (16)	ACG CAAAGC GAG CCG GCC TTT TGY GGN YT
<i>CcPCS</i> -deg-fwd2 (1024)	TGG AAR GSN YCN TGG MGN TGG T
<i>CcPCS</i> -deg-fwd2 (8)	GGA CGT CCG TGG AAA GGC CCC TGG MGN TGG T
<i>CcPCS</i> -deg-rev1 (1536)	AA RTG ICC NKH NCC NGT YTG
<i>CcPCS</i> -deg-rev1 (8)	C AAT CGG GGA AAA ATG CCC GGT GCC NGT YTG
<i>CcPCS</i> -deg-rev2 (1024)	G RTA YTT RAA NCK NGC NAC RTC
<i>CcPCS</i> -deg-rev2 (8)	GTG TGG TGG GTA CTT GAA GCG CGC NAC RTC
<i>CcPCS</i> -mid-fwd	TTCCTGGTGCTCTGTTATTC
<i>CcPCS</i> -mid-rev	GTTGCACTGACCTAGACACC
<i>Adh1</i> -pro	TTCTGCACAATATTTCAAGC
<i>Adh1</i> -trm	CGACAACCTTGATTGGAGAC

W : A+T R : A+G M : A+C K : T+G Y : C+T S : C+G

D : A+T+G H : A+T+C B : T+C+G V : A+C+G N : A+C+G+T

Table 6-2 variant の解析およびクローニング(酵母発現用)に用いたプライマー

Primer	Sequence (5'→3')	制限酵素部位
<i>CcPCSa</i> -fwd	CCGGTACCAAGCTTACCATGGGAGACGCTAGCCAACAAG	<i>Hind</i> III
<i>CcPCSB</i> -fwd	CCGGTACCAAGCTTACCATGGCGATCTCGTTTTATCGCC	<i>Hind</i> III
<i>CcPCS</i> -rev	GAGAATTCCTAGATAGTCGGTCGCTGTGC	<i>Eco</i> RI

Table 6-3 クローニング(大腸菌発現用)に用いたプライマー

Primer	Sequence (5'→3')	制限酵素部位
<i>CcPCSa</i> -fwd	GAGAATTCATATGGGAGACGCTAGCCAACAAG	<i>Nde</i> I
<i>CcPCSB</i> -fwd	GAGAATTCATATGGCGATCTCGTTTTATCGCC	<i>Nde</i> I
<i>CcPCS</i> -rev	GAGAATTCCTAGATAGTCGGTCGCTGTGC	<i>Eco</i> RI

6-2-10. *CcPCS* の酵素反応における最適 pH, 最適温度の検討

酵素活性は PC₂ の合成量によって評価した。基本的な反応条件は, 100 μ L の酵素反応液(200 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 10 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM GSH, 50 μ M CdSO₄, 100 ng/mL BSA)に *CcPCSa*, *CcPCSb* をそれぞれ 10, 50 ng 加えた(酵素の終濃度は 100, 500 ng/mL)ものを, 35°C, 15 min インキュベートした後, 25 μ L の 10% TFA を加えて迅速に混和し, 氷上で冷却することにより反応を停止させた。反応終了液を適当な PC₂ 濃度になるように 0.1% TFA で希釈して HPLC によって分析した。

反応液の pH による影響を調べるために, 反応液中の緩衝液の pH は, 4.0~9.5 の範囲で変化させた。用いた緩衝液は, Citrate-NaOH (4.0, 4.5, 5.0, 5.5), MES-NaOH (5.5, 6.0, 6.5), HEPES-NaOH (6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5), CHES-NaOH (8.5, 9.0, 9.5) である。また, 反応温度による影響を調べるために, 反応温度を 15~65°C で変化させた。

6-2-11. *CcPCS* の熱安定性, 保存性, 様々な金属による活性化度合いの検討

酵素溶液 A(200 mM HEPES-NaOH(pH 7.5), 10 mM 2-mercaptoethanol, 10 ng/ μ L BSA, 10 ng/ μ L PCS), B(A に 10 μ M CdSO₄ を加えたもの), C(A に 1 mM GSH を加えたもの)を作製し, 氷上に 10 min 静置した後, 50~65°C で 10 min 加熱した後, 酵素反応溶液に添加することで熱安定性の有無を検討した。また, A~C の溶液を 4°C および 25°C に置き, 2, 4, 6 日目に酵素活性の測定を行い, 保存性を検討した。なお比較のために, 以上の実験は *CcPCSa*, *CcPCSb* に加え *AtPCS1*, *CmPCS* でも同様に行った。

また, 種々の陽イオンによる活性化の様子を比較するために, 6-2-10 で示した反応液中の CdSO₄ を, Table 6-5 に示した同濃度の他の金属等に置換したもので酵素活性測定を行った。

Table 6-5 反応液中に添加した金属等

Ag(I)	AgNO ₃	Hg(II)	HgCl ₂
As(III)	NaAsO ₂	In(III)	In ₂ (SO ₄) ₃ ·nH ₂ O
As(V)	Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O	Ni(II)	NiSO ₄ ·6H ₂ O
Ca(II)	CaCl ₂ ·2H ₂ O	Mg(II)	MgCl ₂ ·6H ₂ O
Cd(II)	CdSO ₄	Mn(II)	MnCl ₂ ·4H ₂ O
Co(II)	CoSO ₄ ·7H ₂ O	Pb(II)	Pb(CH ₃ COO) ₂
Cu(II)	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Sb(III)	SbCl ₃
Fe(II)	FeSO ₄ ·7H ₂ O	Zn(II)	ZnSO ₄ ·7H ₂ O

6-3. 結果

6-3-1. *C. caldarium* の Cd 存在下での生育

OD₇₅₀ = 0.1 の *C. caldarium* の培養液に, Cd を終濃度 0~1 mM となるように加えて 1 週間培養した後の OD₇₅₀ を Fig. 6-1 に示した. *C. caldarium* の生育は Cd の濃度依存的に阻害を受けており, *C. caldarium* は Cd に対して感受性を有することが確認された.

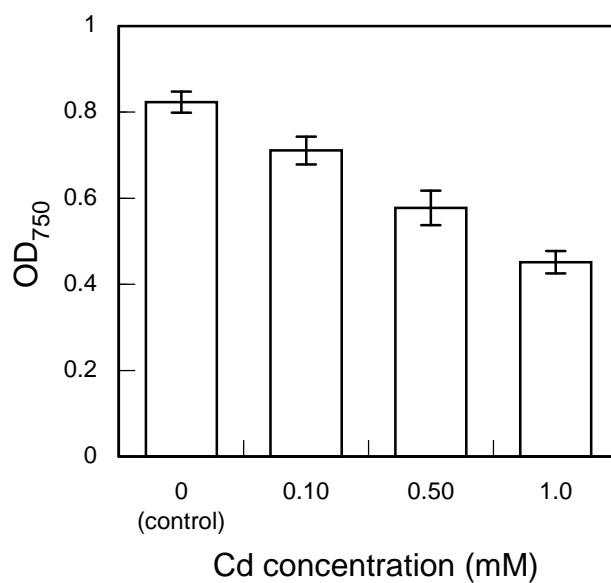


Fig. 6-1 Cd 含有培地での *C. caldarium* の生育阻害

6-3-2. *C. caldarium* の Cd 存在下での PC 合成

C. caldarium 培養液に Cd を終濃度 0, 0.1, 0.5, 1 mM となるように加えて 2 h 培養し, 菌体抽出液を HPLC によって分析した結果を Fig. 6-2 に示した. *C. caldarium* は Cd 添加によって誘導的に PC₂ を合成し, またその合成量は Cd 濃度依存的に増加していることが明らかとなった. この結果より, *C. caldarium* には PCS 遺伝子が存在する可能性が高いと考えられた.

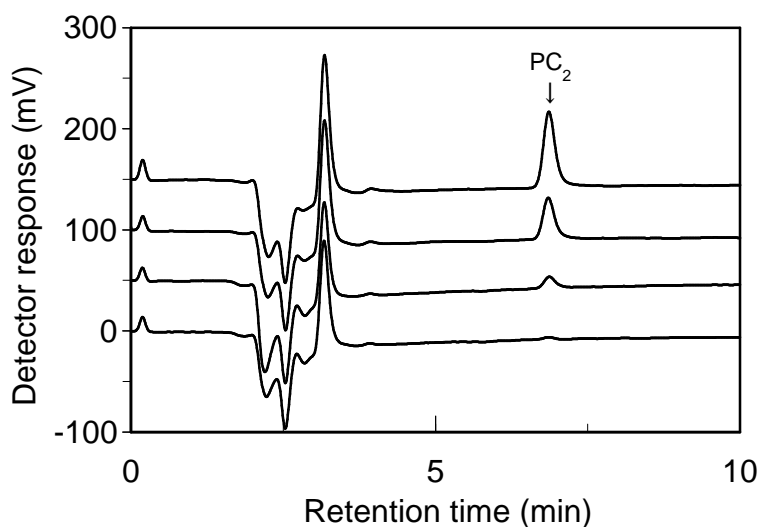


Fig. 6-2 *C. caldarium* の PC 合成

培地に加えた CdSO₄ は, (a) 0 mM, (b) 0.10 mM, (c) 0.50 mM, (d) 1.0 mM. R_t = 6.85 のピークが PC₂ である. 測定には 0.5 U/injection の細胞量を使用した. 検出された PC₂ の量は, (a) 0.64, (b) 5.14, (c) 14.0, (d) 25.0 pmol/U.

6-3-4. PCS 遺伝子の配列および variant の解析

Degenerate PCR によって得られた増幅産物の配列を確認し，活性中心と考えられる部分の配列情報を取得した．さらに，cDNA Library のベクター由来のプライマーを用いて，この遺伝子断片の 5' 側，3' 側の配列を取得することができた．これにより，遺伝子の全長の配列を取得し，クローニングすることが可能となった．これ以降のクローニングのテンプレートには，国立環境研究所から分与された *C. caldarium* を用いて，新規に作製した cDNA を用いた．

C. caldarium の cDNA を用いた RT-PCR の結果を Fig. 6-5 に示す．これより，*CcPCS* 遺伝子は恒常的に発現していることが明らかとなった．

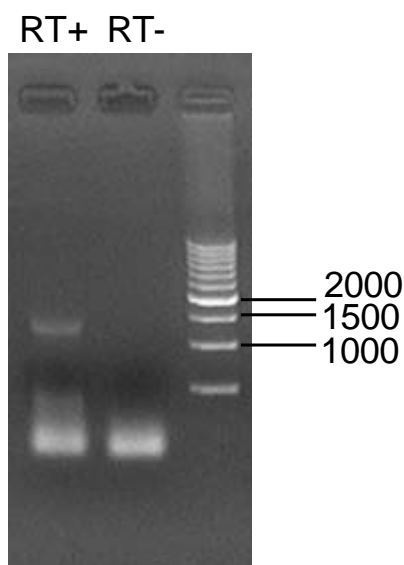


Fig. 6-5 RT-PCR の結果

RT+ はテンプレート作製時に逆転写酵素を入れたもの，RT- は逆転写酵素なしのネガティブコントロール． mRNA 中に *CcPCS* 転写産物が存在することが分かる．

この増幅産物の配列を確認し、*CcPCS* 全長の配列を取得したところ、単一の塩基配列とはならず、複数のもの(variant)が確認された。これらの開始コドンから終止コドンまでの長さは同じ(1,449 bp)で、コドンの3塩基目に対応するものが変化している場合が多く、アミノ酸配列はほぼ一致した。一例を Fig. 6-6 に示す。この原因としては、(1)複数コピーの遺伝子が存在する、(2)分与された *C. caldarium* は単一クローンではなく、ある程度の遺伝的多様性が存在する、ことが考えられた。しかしながら、活性中心付近の塩基配列、アミノ酸配列は100%同一であり、アミノ酸配列の差異もその他の部分で数アミノ酸程度であったので、以後の機能解析には最も頻繁に現れた配列を採用した。

CcPCS および他の生物種の PCS 遺伝子のアミノ酸配列のアラインメントを Fig. 6-7 に示した。また、Fig. 6-8 には *CcPCS* と *CmPCS* のタンパク質の模式図において、活性中心となる残基(Cys, His, Asp)および Cys の位置を示した。*CcPCS* のアミノ酸配列は N ドメインで他種の PCS との相同性が高いことが分かる。また、C ドメインは *CmPCS* との相同性が高く、Cys の位置もよく保存されている。しかしながら、*CmPCS* に見られる N 末端側の X ドメインは、*CcPCS* には見られなかった。

CcPCS には、開始コドンであると考えられる ATG は2箇所存在した。Fig. 6-7 を見ると、2番目の Met である Met⁴³以降の種間での保存性が高いため、こちらが開始 Met であると考えられた。しかしながら、いくつかの variant では、Met⁴³ではなく Val⁴³となっているものも存在した。真核生物の翻訳開始点付近の配列の保存性などを検討しても、*CcPCS*の翻訳開始点を決定するには至らなかった。以後のクローニング、タンパク質の発現では、両方の可能性を考慮して、1番目の ATG からの翻訳産物(1_482)を *CcPCSa*、2番目の ATG からの翻訳産物(43_482)を、*CcPCSb* とした。

```

Query1 241 PHWVHLNALYRAMCAIDPATGSPRGLAIVRRHKRSEQPAEALAPLHDP IETMSRPCAWRP 300
Query2 241 PHWVHLNALYRAMCAIDPATGSPRGLAIVRRHKRSEQPAEALAPLHDP IETMSRPCAWRP 300
Query3 241 PHWVHLNALYRAMCAIDPATGSPRGLAIVRRHKRSEQPAEALAPLHDP IETMSRPCAWRP 300
Query4 241 PHWVHLNALYRAMCAIDPATGSPRGLAVRRHKRSEGPTALAPLHDP IETMGRPCAWRP 300
Query5 241 PHWVHLNALYRAMCAIDPATGSPRGLAVRRHKRSEGPTALAPLHDP IETMGRPCAWRP 300
Query6 241 PHWVHLNALYRAMCAIDPATGSPRGLAIVRRHKRSEQPAEALAPLHDP IETMSRPCAWRP 300
Query7 241 PHWVHLNALYRAMCAIDPATGSPRGLAIVRRHKRSEQPAEALAPLHDP IETMSRPCAWRP 300
Query8 241 PHWVHLNALYRAMCAIDPATGSPRGLAVRRHKRSEGPTALAPLHDP IETMGRPCAWRP 300
*****:***** *:*****

```

Fig. 6-6 variant の例

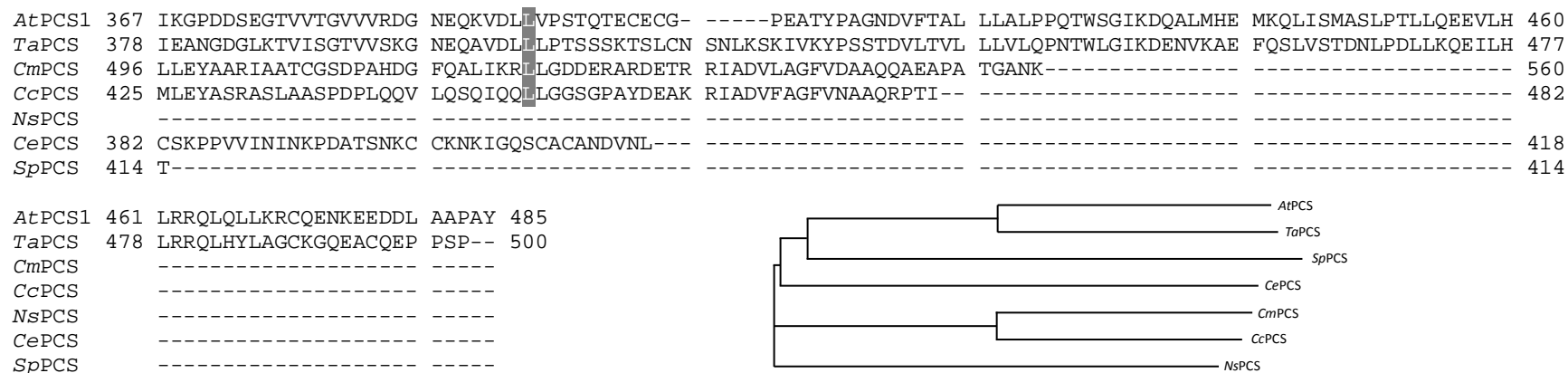


Fig. 6-7 *CcPCS* と種々の生物種の PCS とのアミノ酸配列アラインメント

* は全ての生物種間で保存されているアミノ酸残基. 赤字は catalytic triad を形成する 3つのアミノ酸(Cys, His, Asp)を示す. アラインメントには ClustalW2 を使用した. 右下は系統樹.

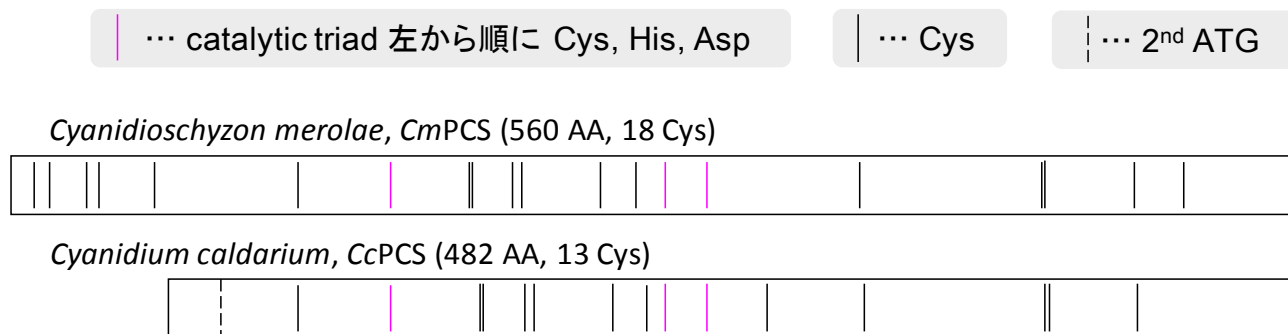


Fig. 6-8 *CmPCS* と *CcPCS* のタンパク質の模式図

6-3-5. Southern hybridization によるコピー数の確認

CcPCS 遺伝子のゲノム上でのコピー数を調べるために、Southern hybridization を行った結果を Fig. 6-9 に示す。 *ApaI*, *EcoRI*, *NdeI*, *NheI*, *SphI*, *XbaI* に関しては 2 本のバンドが観察されるが、 *BglII*, *HindIII*, *SaI* では 1 本のみ観察された。 かししながら、バンドの濃さや、高分子側ほどメンブレンへの転写効率が落ちることを考慮に入れると、これらの 3 つの酵素処理のレーンでは 2 本分のバンドが重なっている可能性が高い。 この結果より、 *CcPCS* 遺伝子はゲノム上に 2 コピー存在すると推定された。

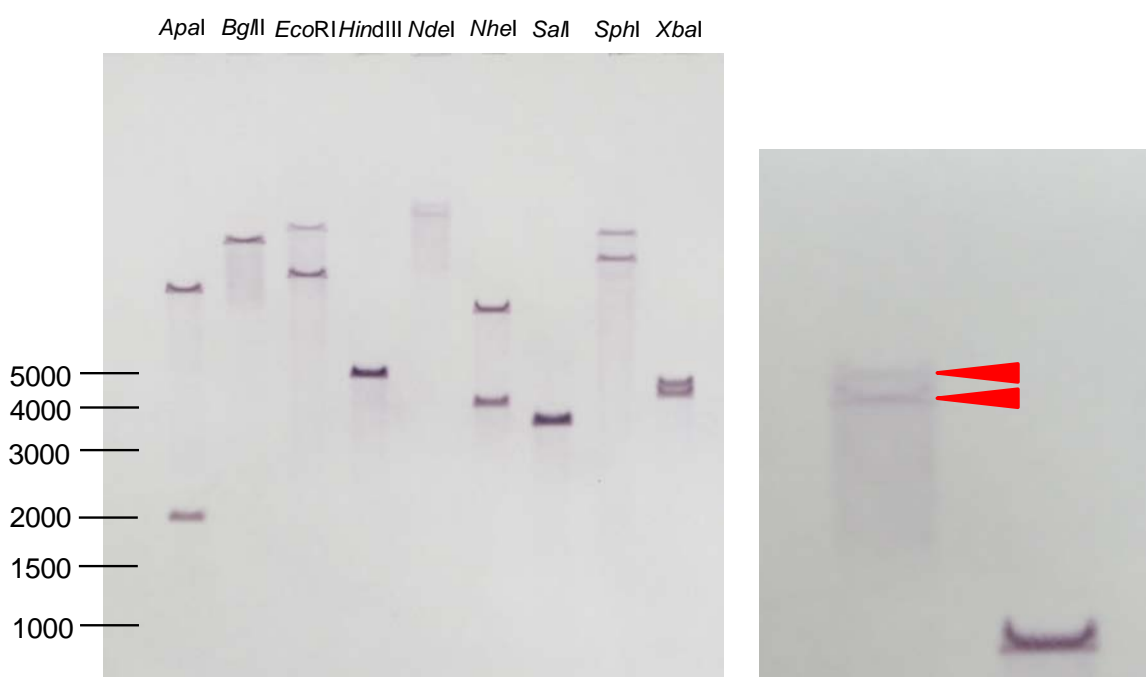


Fig. 6-9 Southern hybridization によるゲノム上の *CcPCS* の検出
右は *NdeI* のレーンを拡大したもの. 赤色の矢印で示した部分にバンドが確認できる. 検出は NBT/BCIP による発色で行った.

6-3-6. 酵母を用いた *in vivo* PCS 活性の確認

Fig. 6-10 に、CcPCS を形質転換した酵母の Cd 含有寒天培地上での生育を示した。CcPCS を形質転換することによって酵母は Cd 耐性能を付与されていることが分かった。また、PC 合成の阻害剤となる BSO(buthionine sulfoximine) を添加すると、この耐性能は失われた。以上の結果より、CcPCS は *in vivo* PCS 活性を有することが示された。

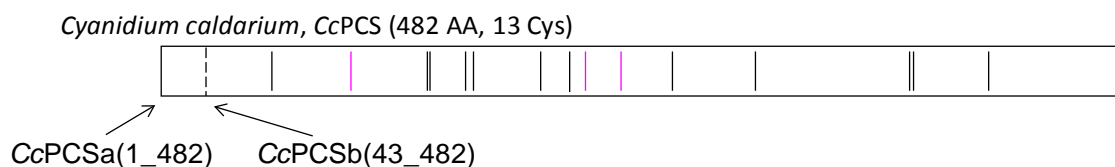
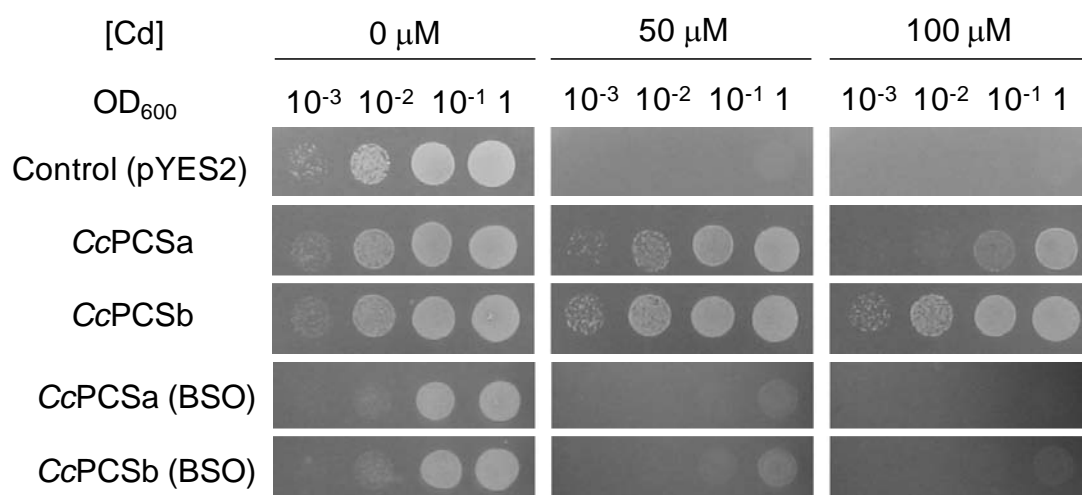


Fig. 6-10 CcPCS 形質転換酵母の Cd 耐性能

6-3-7. 大量発現系の構築およびタンパク質の精製

CcPCS を発現させた大腸菌抽出液の全画分、可溶性画分、アフィニティークロマトグラフィーによる精製サンプルを SDS-PAGE によって分析したものを Fig. 6-11 に示した. *CcPCSa*, *CcPCSB* はそのほとんどが可溶性画分に回収されており、またアフィニティークロマトグラフィーにより十分な純度が得られることが分かった.

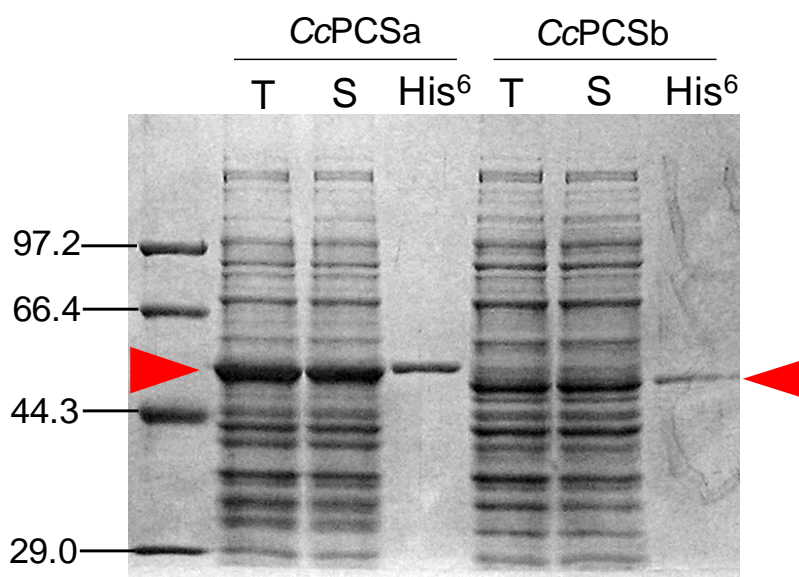


Fig. 6-11 *CcPCSa*, *CcPCSB* の大腸菌による発現

T: total, S: Sup, His⁶: 精製サンプル. 予想される分子量は 55.2 kDa (*CcPCSa*), 50.6 kDa (*CcPCS2*). 発現誘導に加えた IPTG 量は, *CcPCSa*, *CcPCSB* でそれぞれ 40 μ M, 400 μ M. 発現したタンパク質を赤色の矢印で示す.

6-3-8. CcPCS の酵素活性

CcPCS は *in vitro* PCS 活性を有することが確認された。酵素反応液の pH が活性に与える影響を Fig. 6-12 に示した。CcPCSa, b ともに pH 7.5 付近で最大の活性になっていることが分かった。以後の実験において、CcPCS の酵素活性測定は、pH 7.5 で行うことに決定した。

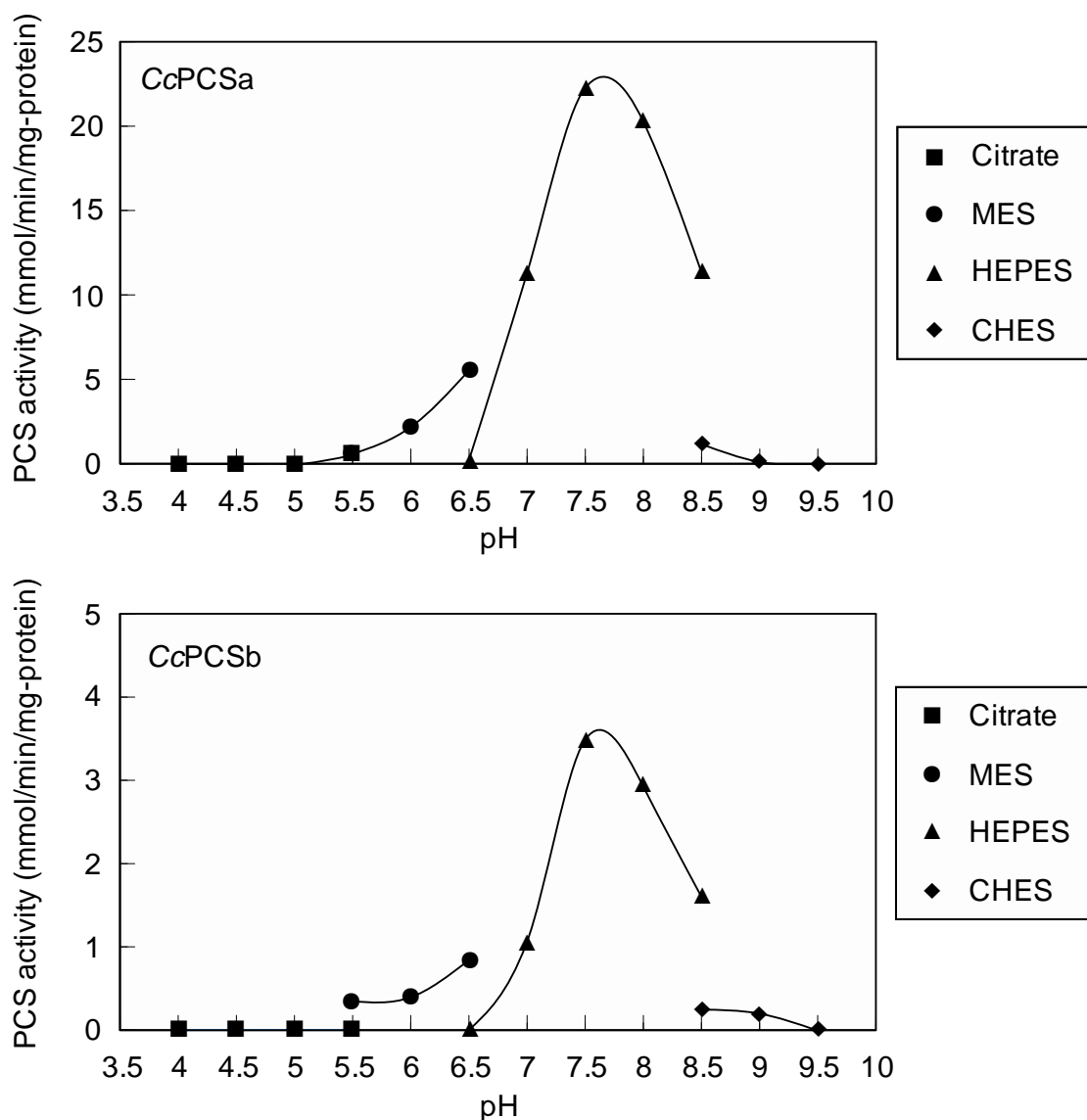


Fig. 6-12 酵素反応液の pH と CcPCSa, CcPCSb の酵素活性

CcPCS の酵素反応時の温度が活性に与える影響を Fig. 6-13 に示した. CcPCSa, b ともに 35-40°C 付近で最大の活性をもつことが分かった. 以後の実験において, CcPCS の酵素反応温度は 35°C とすることに決定した.

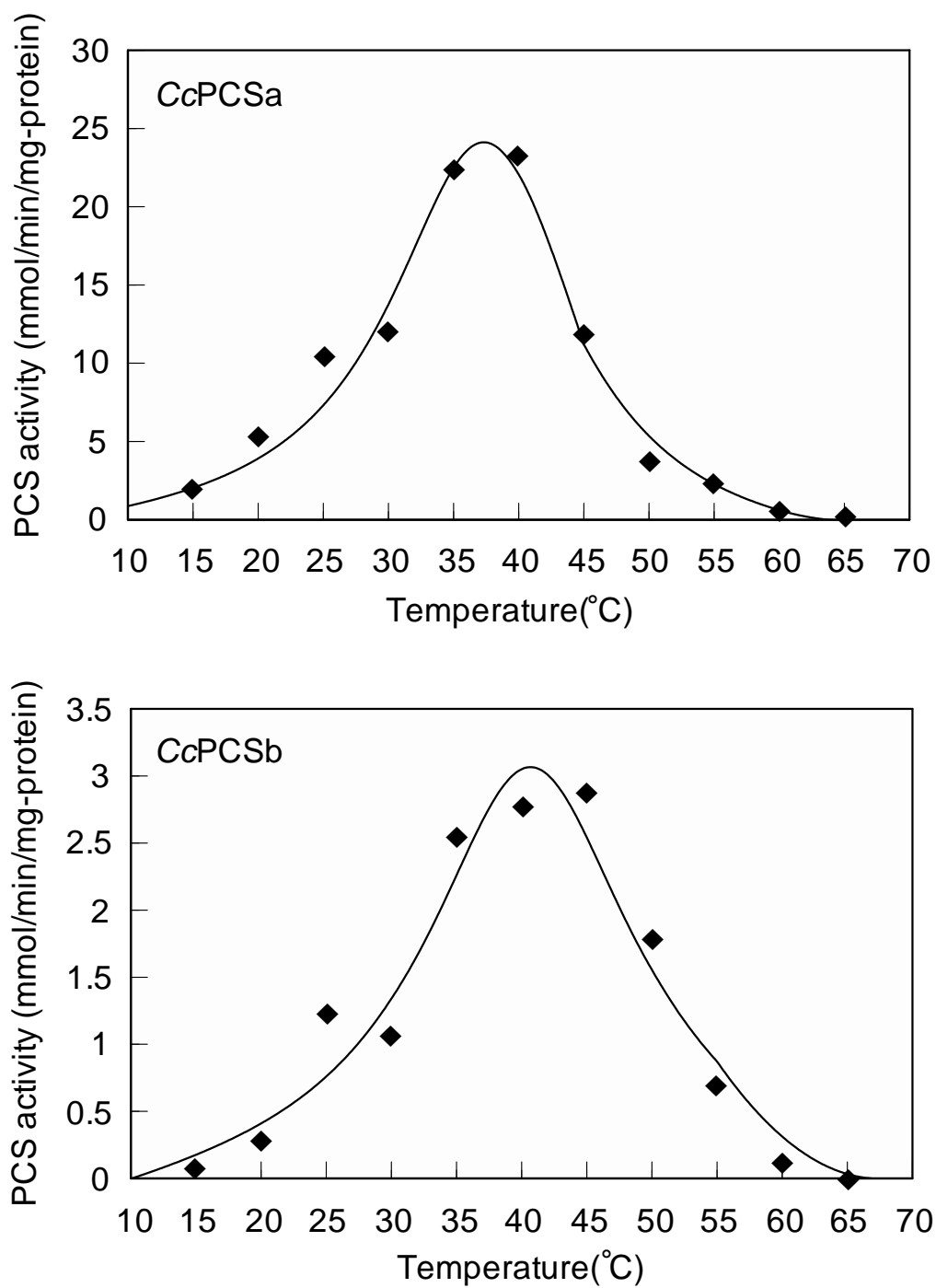


Fig. 6-13 CcPCS の反応温度と酵素活性

CcPCS の基質濃度を変化させた場合の酵素活性を調べた結果を Fig. 6-14 に示した. 活性曲線は, 第 3 章で詳細に議論した *AtPCS1* と同様の挙動を示した.

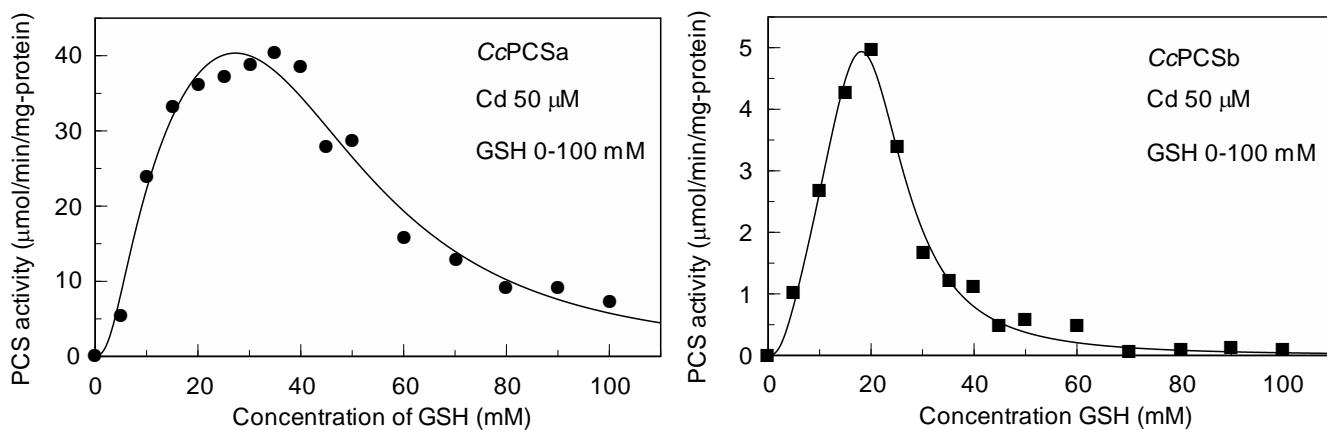


Fig. 6-14 *CcPCS* の各 GSH 濃度に対する酵素活性

種々の金属による *CcPCS* の活性を Fig. 6-15 に示した. *CcPCSa, b* ともに Cd が最も強い activator となり, 次に Pb, Cu, In と続くことが分かった.

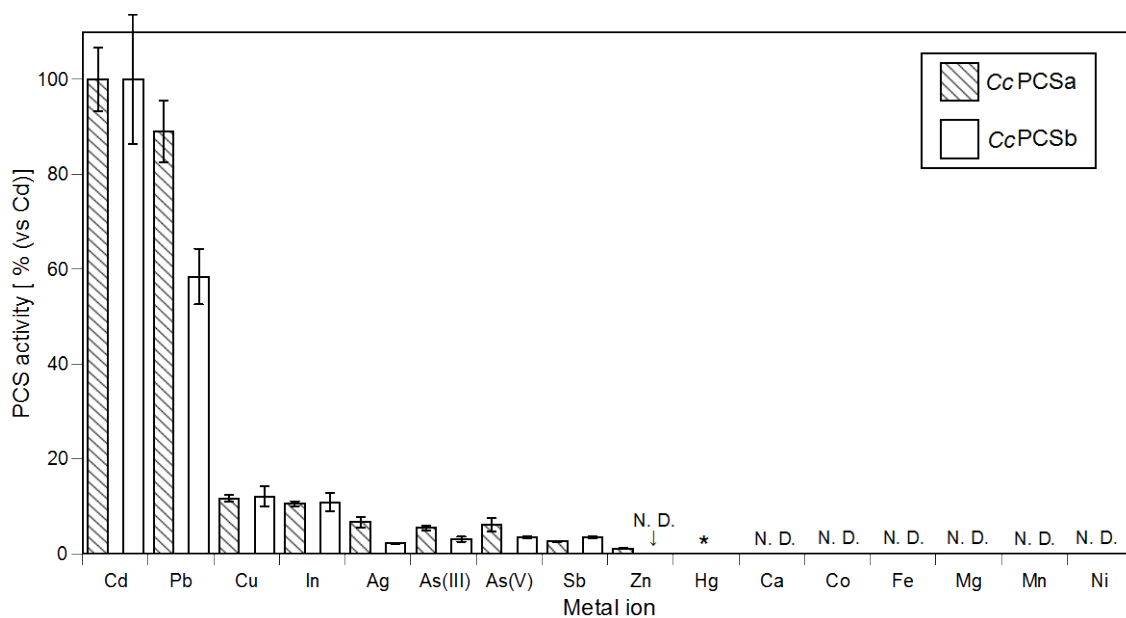


Fig. 6-15 種々の金属イオンによる *CcPCS* の相対活性

相対活性は Cd に対する割合で示した. 相対活性 100% は, *CcPCSa, CcPCsb* でそれぞれ 17.0 ± 1.14 , 4.31 ± 0.584 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg-protein}$.

N. D. : Not detected * : 測定不能

6-3-9. CcPCS の熱安定性

CcPCS を加熱処理したときの残存活性を Fig. 6-16 に示した。CcPCSa, b ともに、50°Cの熱処理での残存活性は20%前後、55°Cでは5%前後であった。60°C以上に加熱すると完全に失活した。CcPCS と Cd, または GSH を共存させることによつての、熱安定性の向上はみられなかった。

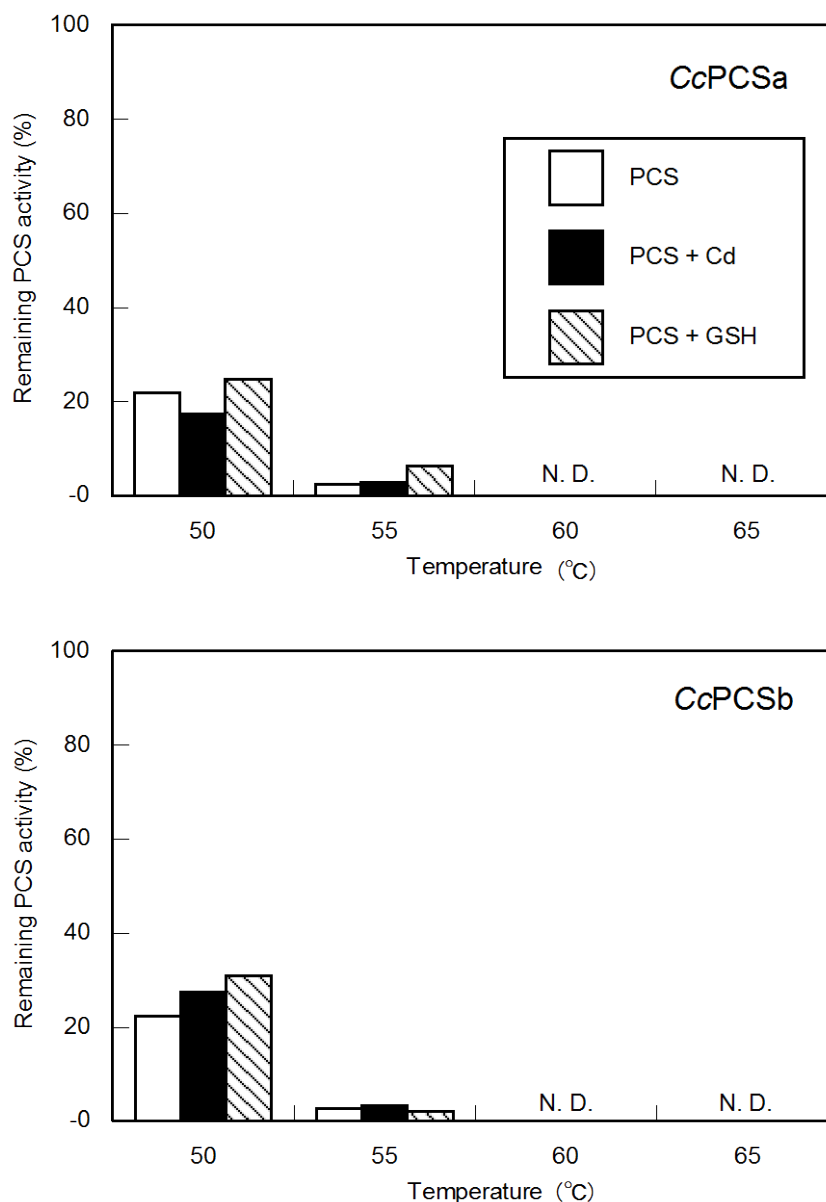


Fig. 6-16 CcPCSa, CcPCSb の加熱処理時の残存活性

N. D. : Not detected. 残存活性 100%は, CcPCSa, CcPCSb でそれぞれ 17.9, 2.18 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}\text{-protein}$.

比較のため, *AtPCS1*, *CmPCS* の熱安定性を Fig. 6-17 に示した. *AtPCS1* は, 50°C以上の熱処理によりほぼ失活した. *CmPCS* は 65°Cまで加熱しても 5% 前後の残存活性が見られた. また, 熱処理時に *CmPCS* と Cd を共存させておくことによって, *CmPCS* のみで熱処理した場合と比べて残存活性は大きくなった.

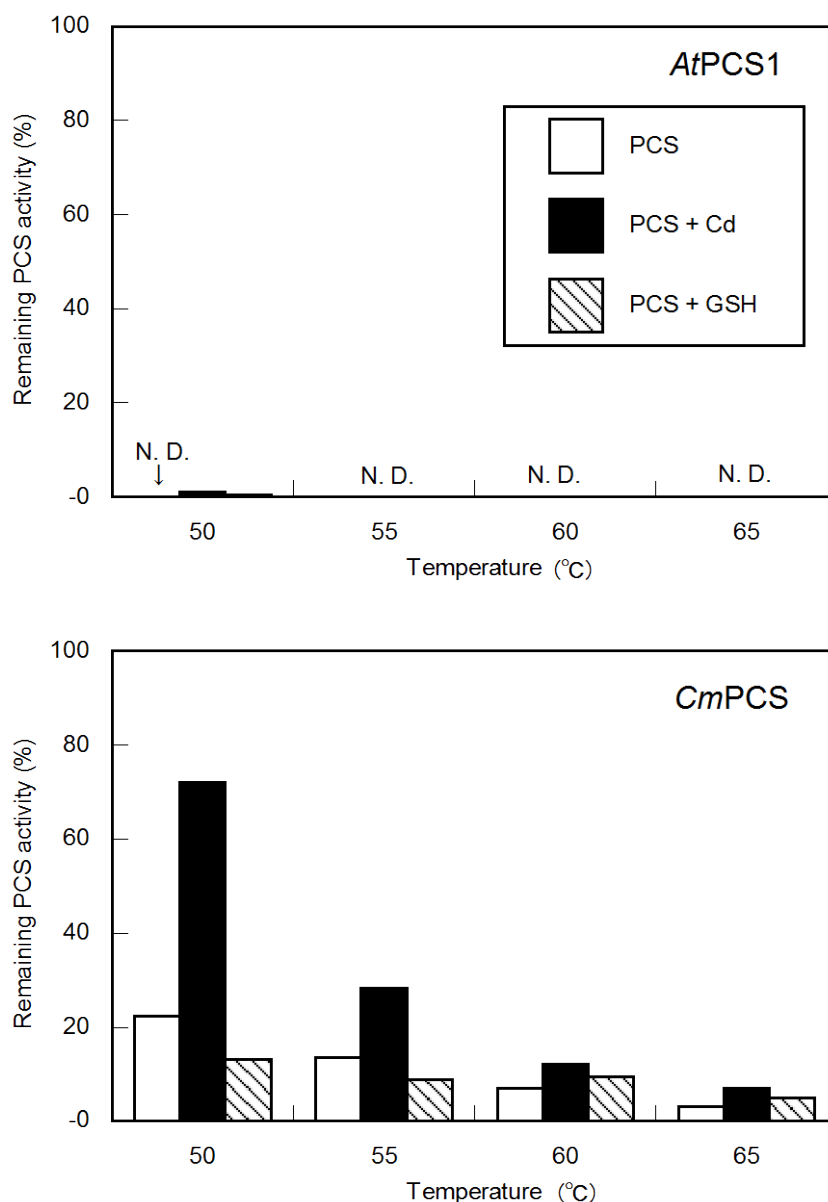


Fig. 6-17 *AtPCS1*, *CmPCS* の加熱処理時の残存活性

N. D. : Not detected. 残存活性 100%は, *AtPCS1*, *CmPCS* でそれぞれ 36.3, 1.86 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}\cdot\text{protein}$.

反応液中に加えた酵素の量は, *AtPCS1*, *CmPCS* でそれぞれ 10, 50 ng.

6-3-10. *Cc*PCS の保存性

Fig. 6-18 に *Cc*PCSa, *Cc*PCsb, *At*PCS1, *Cm*PCS の様々な保存条件による残存活性を示した. すべての PCS において, 保存液中に PCS と Cd を共存した場合が最も残存活性が高く, 次いで PCS と GSH を共存した場合, PCS のみの場合となった. すべての PCS において, PCS と Cd を共存して保存すると, 4°C においては 6 日間失活することなく保存されることが分かる. Cd を共存しない状態では, *At*PCS1 は 4 つの PCS の中で最も保存性が悪く (E, F), PCS のみで保存した場合, 4°C において 2 日後の残存活性は 10% 以下となった (F).

また, 4°C において *Cc*PCsb は, Cd を共存することで活性が初期値の 4~5 倍まで上昇し, その活性値で保持されていた (C). PCS のみの場合には, 6 日後で活性の 80% 程度が保持されていた.

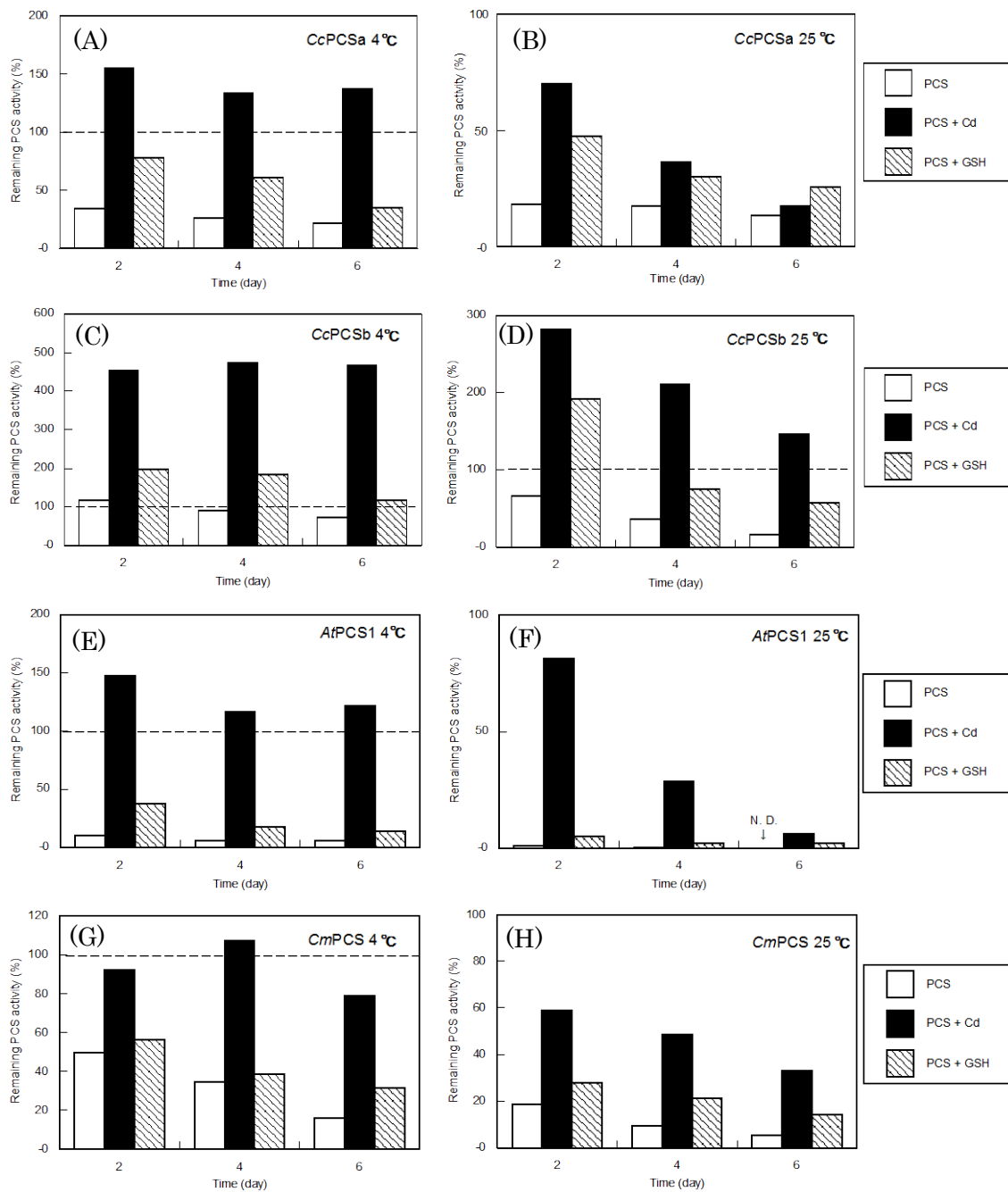


Fig.6-18 各 PCS の様々な保存条件による残存活性

N. D. : Not detected. 残存活性 100%は, *CcPCSa*, *CcPC Sb*, *AtPCS1*, *CmPCS* でそれぞれ 18.6, 2.36, 40.4, 2.19 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}\text{-protein}$.

反応液中に加えた酵素の量は, *CcPCSa*, *CcPC Sb*, *AtPCS1*, *CmPCS* でそれぞれ 10, 50, 10, 50 ng.

6-4. 考察

*C. caldarium*には PCS 遺伝子が存在しており, Cd によって PC を誘導合成することが明らかとなった. この PCS 遺伝子を単離することに成功し, 482 アミノ酸からなる配列を得ることができた. しかしながら単一の配列ではなく, 10 数種類にわたる variant が取得された. 一方, サザンブロットィングの結果から, *CcPCS* はゲノム上に 2 コピー存在すると推定される. これより, 分与された *C. caldarium* 株が単一クローンでなく, ゲノムにある程度の多様性が存在していた可能性が高いと考えられる. なお, *A. thaliana* には PCS 遺伝子は 2 つ存在する(*AtPCS1*, *AtPCS2*, *Cazale et al.*, 2001)が, その補完性などについては分かっていない. *C. caldarium* において, この 2 つの PCS が機能的な差異をもつのかどうかは現在のところ不明である.

CcPCS のアミノ酸配列は *CmPCS* と非常によく似ていたが, *CmPCS* に存在する X ドメインにあたる部分は有していなかった. 開始コドンの候補は 2 つ存在したが, 周囲の塩基配列などから一方に決定することはできなかつたので, それぞれの開始コドンから翻訳されるタンパク質を *CcPCSa*, *CcPCSb* として解析を行った. *CcPCS* は *in vivo* および *in vitro* で PCS として機能することが確認され, 大腸菌を用いた大量発現系において可溶性画分に発現させることができた.

大腸菌では *CcPCSa* の方が発現量は多く, 精製後の比活性も *CcPCSa* の方が大きな値を示した. *CmPCS* は pH 8.5~9.5 付近で極大の活性値をもつが(*Osaki et al.*, 2009), *CcPCS* はこのアルカリ寄りの pH 範囲では活性値は低く, より中性に近い, pH 7.5 付近で活性値は極大となった. 反応温度については, *CmPCS* は 50°C で極大の活性値をもつが, *CcPCS* は 35-40°C 付近で極大となることが分かった. 2 つの PCS のアミノ酸配列の相同性は高いものの, 酵素の特性は以上のような差異がみられた. *CmPCS* は N 末端に 100 アミノ酸程度の X ドメインを有するが, *CcPCS* には見られず, このドメインが酵素反応の特性に変化を与えている可能性が考えられる.

CcPCS においては Cd が最も強い activator となり, 次いで Pb, Cu, In の順であった. *CmPCS* と比較すると Cd の次が Pb であることは共通していた(*Osaki, et.al.*, 2009). しかし As(V), As(III) の場合, *CmPCS* では Cd の 40-50% 程度の活性を与えるのに対して, *CcPCS* では 5% 程度の活性であった. *CmPCS* と *CcPCS* で As に対する感受性が異なっていることが分かった. *CcPCS* の金属感知機構は *CmPCS* と同一ではなく, これは C ドメインのアミノ酸配列の違いに由来するものではないかと考えられる.

CcPCS は *AtPCS1* よりも熱安定性保存性に優れており, これは *CcPCS* が好

熱藻類由来であるためと考えられる。また、PCS と Cd または GSH を共存することで、保存性が向上することが分かった(Fig. 6-18)。GSH は PCS の活性中心の Cys 残基に、Cd の有無に関わらずアシル化することが分かっている(Vatamaniuk *et al.*, 2004)。Cys がアシルされた状態で存在することで、溶液中の溶存酸素による酸化から保護され、活性低下が抑制されている可能性が考えられる。Cd を共存させた場合にも、タンパク質中の Cys が Cd に配位することで安定性が向上したのではないかと考えられる。

CcPCSb では Cd を共存して保存することによって活性が 400-500% 上昇した(Fig. 6-17, C)。CcPCSa, CcPCSb の分子量は 5 kDa ほどの差であるのに対し、比活性はそれぞれ、17.0, 4.31 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg-protein}$ であった。この結果をふまえると、本来は CcPCSa, b とともに同程度の比活性を有しているものの、CcPCSb ではタンパク質の精製過程で活性が低下し、これが Cd を加えることで本来の水準まで回復した可能性が考えられる。Cd が CcPCSb タンパク質に結合することによって、タンパク質の構造を変化させることが示唆された。

第7章 総括および総合考察

生物が微量無機金属をどのように利用し、またその毒性にどのように対応しているかを調べることは、生命現象の理解という基礎的な側面だけではなく、毒性金属への対処という応用面で重要であると考えられる。そのためには、生物が重金属ストレスに応答して合成する物質を高感度に検出・定量する測定系が必要である。また、そのような物質の合成を担う遺伝子について理解を深めることが、今後の応用展開につながるものと考えられる。本研究は、高感度なソフト金属キレーターの分析系を確立し、その分析系を有効に用いながら、種々の生物種由来の PCS 遺伝子を用いて様々な面から PCS の機能解析を試み、生物の有害金属応答に関する理解を深めたものであると言える。

第2章では、HPLC を用いて PC 等のソフト金属のキレーターの検出・定量を行う簡便かつ高感度な分析方法を確立した。この分析方法によって、Cd に暴露した *C. melorae* で誘導された PC 合成を高感度で検出・定量することができた。また、Cd に暴露した *C. caldarium* サンプルを分析することで、ゲノム解析がなされていない同生物においても PCS 遺伝子が存在する可能性を見出し、第6章においてその遺伝子の単離を行う足がかりとなった。また、この分析方法を生物試料の分析だけでなく PCS の酵素活性測定に適用し、従来よりも 10～100 倍少ない酵素量で定量的な測定が行えることを示した。使用する溶離液の種類を検討したところ、CH₃CN を用いた場合には GSH に対する検出感度が PC に対する検出感度と比較して 1/10 以上低くなった。このことが第3章での詳細な酵素活性測定に功を奏した。また、酵素量を減らすことでチューブ壁面への吸着が起こっていることを明らかとし、最低限必要な酵素量を吟味した上、BSA 添加によるブロッキングが有効であることを示した。詳細な検討を通じ、広い GSH 濃度域において、正確な酵素活性を測定できるようになったことが、第3章における酵素の活性化機構の解明に大きく貢献した。

第3章では、AtPCS1 の Cd による活性化機構の詳細な解析を行い、Cd が PCS と直接結合して酵素を活性化していることを証明した。FluoZin-1 を用いた GSH と Cd の結合定数の測定方法を確立し、GSH 存在下での遊離 Cd 濃度の算出を行った。遊離 Cd 濃度を一定とした条件で酵素活性測定を行い、AtPCS1 が GSH, Cd-(GSH)₂ を基質としていることを確認した。そして、GSH 濃度に依存した遊離 Cd 濃度の変化を考慮した反応速度の理論式を導いた。活性化サイトへの Cd 結合のモデルのみでは実測値を満足に説明できないことから、GSH 濃度一定条件下で Cd 濃度を変化させた場合の酵素活性測定を行い、AtPCS1 には Cd 結合による活性抑制サイトが存在することを示した。これらを踏まえて反応

速度の理論式を修正し、実測値を満足に説明することのできる酵素反応モデルを提示した。この過程を通し、PCS と Cd との結合定数を推定することによって、遊離 Cd 濃度が小さい条件においても PCS と Cd は十分結合し得ることを説明した。また、*AtPCS1* の基質認識機構について検討し、 γ EC は基質にならないが、 γ EC- γ EC は基質になることを示した。基質の構造の比較により、N 末端から 3 残基目のカルボキシル基が基質認識に決定的な役割を示しているという仮説を導いた。このカルボキシル基の負電荷が、基質認識ポケット上に存在する正電荷を有するアミノ酸と相互作用している可能性が考えられる。

第 4 章では、*AtPCS1* に存在する Cys 残基に注目し、変異体解析を通して各 Cys の活性への寄与の解析、およびより安定な *AtPCS1* 変異体の取得を試みた。結果として、10 個の Cys を Ser に置換した *AtPCS1(B3)* が *AtPCS1(WT)* の 40% 程度の活性を保持していることを示した。しかしながら、*AtPCS1(B3)* の保存安定性に改善は見られなかった。SH 基のラベル化による解析から、*AtPCS1(B3)* では分子表面の Cys を選択的に Ser に置換されていることが示唆された。すなわち、Cd のセンシングと酵素の活性化に重要な Cys は、分子内の比較的内側に存在し、酵素の活性化に伴いタンパク質自体の構造変化を誘導していることが示唆された。

第 5 章では、*CmPCS* の各ドメインやアミノ酸残基が PCS 活性に与える影響を、様々な変異 *CmPCS* を酵母細胞を用いて発現させることによって解析した。*CmPCS* の N 末端側の機能未知ドメインは、PC 合成時の基質選択性に寄与していることを見出し、また、*CmPCS* は主に N ドメインのみ(tr111_338)でも酵素活性を有することを示した。

第 6 章では、*C. caldarium* から新規 PCS 遺伝子(*CcPCS*)を単離し、この PCS 遺伝子が *in vivo*, *in vitro* において PCS 活性を有することを示した。大腸菌を用いた大量発現系の構築を行い、大部分のタンパク質を可溶性画分に回収することを可能とした。さらに、様々な酵素反応条件や保存条件が *CcPCS* の酵素活性に与える影響を調べ、*CcPCS* は *AtPCS1* と比較して保存性に優れていることを明らかにした。しかしながら、*C. caldarium* の生育環境から期待していたほどの熱安定性、保存安定性を有してはいなかった。

AtPCS1 は Cd と結合して活性化することが示されたが、PCS 遺伝子の相同性を考えると、これは種々の生物の PCS で共通の活性化機構であると考えられる。PCS と Cd を共存させて保存すると、*AtPCS1*, *CmPCS*, *CcPCS* の全てにおいて活性低下が抑制されることから、PCS と Cd との結合様式の普遍性を認識できる。また、*AtPCS1* は Cd の結合サイトが複数存在し、活性化サイトとは別の活性抑制サイトがあると考えられた。この活性阻害サイトへの結合定数

は、活性化サイトへの結合定数と比較すると小さいと考えられるものの、*AtPCS1* の挙動から推定して、第 6 章で行った PCS と Cd を共存させて保存する条件下では、大部分の PCS は活性抑制サイトにも Cd が結合して不活性型となった状態であると考えられる。この状態での保存性が向上することから、活性化に必要となる Cys の SH 基が Cd に結合することで溶存酸素による影響から保護されることや、不活性型となった PCS では立体構造が変化しており、活性化に関与するアミノ酸残基がタンパク質の内側に入り込んで溶液環境の様々な影響から保護されることなどが考えられる。

AtPCS1 の様々な Cys 変異体を解析することで、いくつかの変異体で活性が大きく低下、または消失したものが見られた。第 3 章の反応速度論的解析では、Cd と結合している部位が Cys であると断定できたわけではないが、変異体解析では Cys を構造的に近い Ser に置換していることを考えると、変異導入によって立体構造が大きく変化するとは考えにくいので、PCS の活性化における Cys の影響はいずれにせよ大きなものであると考えられる。

実験結果をふまえて様々な生物種由来の PCS のアミノ酸配列を比較することにより、いくつかの知見を得ることができた。*AtPCS1(B3)* で残した 7 つの Cys のうち、Cys⁵⁶, Cys⁹⁰, Cys⁹¹, Cys¹⁰⁹, Cys¹¹³ は生物種を越えて保存されていたが、Cys²³¹ および Cys⁴⁷¹ は *AtPCS1* に特有に存在するものであった。すなわち N ドメインに存在する前者の 5 つの Cys は、PCS 活性において様々な種で共通の機構を保持することに重要であるために保存されているものと考えられた。対して、後者の 2 つの Cys は、C ドメイン中に存在する他の Cys と補完的・協奏的にはたらき、*AtPCS1* の活性を増強させるものであると考えられた。また *CmPCS* において、X, C ドメイン削除体の活性評価を行って最小活性保持領域を決定したことで、PCS 活性を有する変異タンパク質の 3D モデル構造を初めて作成することができた。このタンパク質では、Arg³³⁸ が Glu²²⁷ および Asp²⁵⁷ と相互作用することでタンパク質の立体構造を保っていると考えられた。配列アラインメント(Fig. 6-7)によると、Glu²²⁷ および Asp²⁵⁷ は *CmPCS* および *CcPCS* でのみ保存されており、このアミノ酸を含むループ構造は他の生物種には存在しないことが分かった。このような種間の構造の差異が、好熱藻類の PCS に特有な性質に寄与している可能性が考えられる。

本研究において、PCS タンパク質が Cd と直接結合することが示されたことは、タンパク質工学への応用面でも意義深いと考えられる。予測された解離定数は 5.4×10^{-11} M であり、これは数～数十 ppt オーダーの濃度の Cd を結合、センシングできることを示している。将来的にタンパク質の立体構造が解明され、結合様式を模したペプチド等をデザインすることができるようになった場

合、産業上の有用性は大きなものであると考えられる。

PCS は Cd に限らず Hg, Pb をはじめとした様々な重金属、また As, Sb などの半金属により活性化することが分かっており、PCS とこれらの因子の結合様式に興味を持たれる。このような解析を行うためにはタンパク質の X 線結晶構造解析が有効な手段であるが、PCS はその不安定さゆえにこれまで結晶化が困難であったものと考えられる。今回作製した *At*PCS1(B3) は、保存安定性こそ改善しなかったものの、結晶化においてフリーの Cys が少ないことは有利な条件であると考えられる。また、今回新たに単離した *Cc*PCS は、大腸菌を用いた発現系において *At*PCS1 と同程度の可溶性を有し、かつ保存性は *Cm*PCS に匹敵するものであった。構造解析に十分量であり、かつ比較的安定なタンパク質を取得することが可能となったために、結晶化というアプローチでの今後の展開が期待される。PCS の機能がさらに詳細に解明されることで、将来的には有害金属に強い植物の育種や、有用金属の集積、ファイトレメディエーションなどへの応用が可能になると考えられる。

参考文献

- Ahner B. A., Price N. M., Morel F. M. (1994) Phytochelatin production by marine phytoplankton at low free metal ion concentrations: laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8433-8436
- Ahlf W. (1988) Recovery of metals from acid waste water by *Cyanidium caldarium*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **28**, 512-513
- Aoki Y., Sunaga H., Suzuki K. T. (1988) A cadmium-binding protein in rat liver identified as ornithine carbamoyltransferase. *Biochem. J.* **250**, 735-742
- Beck A., Lenzian K., Oven M., Christmann A., Grill E. (2002) Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates. *Phytochemistry* **62**, 423-431
- Bonaly J., Brochiero E. (1994) Cell-surface changes in cadmium-resistant *Euglena*: Studies using lectin-binding techniques and flow cytometry. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **52**, 54-60
- Burzynski M., Migocka M., Klobus G. (2005) Cu and Cd transport in cucumber (*Cucumis sativus* L.) root plasma membranes. *Plant Sci.* **168**, 1609-1614
- Cazalé AC, Clemens S. (2001) Arabidopsis thaliana expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Lett.* **507**, 215-219
- Chekmeneva E., Prohens R., Diaz-Cruz J., Arino C., Esteban M. (2008) Thermodynamics of Cd²⁺ and Zn²⁺ binding by the phytochelatin(γ -Glu-Cys)₄-Gly and its precursor glutathione. *Anal. Biochem.* **375**, 82-89

Chia JC, Yang CC, Sui YT, Lin SY, Juang RH (2013) Tentative identification of the second substrate binding site in Arabidopsis phytochelatin synthase. *PLoS One*. **8**, e82675

Clemens S., Kim E. J., Neumann D., Schroeder J. I. (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J*. **18**, 3325-3333

Clemens S., Schroeder J. I., Degenkolb T. (2001) *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3640-3643

Clemens S. (2006) Evolution and function of phytochelatin synthases. *J. Plant Physiol.* **163**, 319-332

Cobbett C. S. (1999) A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species. *Trends Plant Sci.* **4**, 335-337

Cobbett C. and Goldsbrough P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 159-182

Chen J. J., Zhou J. M., Goldsbrough P. B. (1997) Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiol. Plant.* **101**, 165-172

Cynthia T.M., John A.T. (2003) Cancer, cadmium and genome integrity. *Nature Genetics* **34**, 239-241

Davies D.R., A. Plaskitt (1971) Genetical and structural analyses of cell-wall formation in *Chlamydomonas reinhardi*. *Genet. Res.* **17**, 33-43

Gekeler W., Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H. (1988) Algae sequester heavy-metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.* **150**, 197-202

Griffith OW., Meister A. (1979) Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J. Biol. Chem.* **254**, 7558-7560

Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H. (1985) Phytochelatins : the principal heavy-metal complexing peptides of higher-plants. *Science* **230**, 674-676

Grill E., Löffler S., Winnacker E. L. and Zenk M. H. (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6838-6842

H. Bisswanger (2008) Enzyme Kinetics, Second, Revised and Updated Edition. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany

Ha S. B., Smith A. P., Howden R., Dietrich W. M., Bugg S., O'Connell M. J., Goldsbrough P. B., Cobbett C. S. (1999) Phytochelatin synthase genes from arabidopsis and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant cell* **11**, 1153-1163

Hamer D. (1986) Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 913-951

Hall J. L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* **53**, 1-11

Harada E., von Roepenack-Lahaye E., Clemens S. (2004) A cyanobacterial protein with similarity to phytochelatin synthases catalyzes the conversion of glutathione to γ -glutamylcysteine and lacks phytochelatin synthase activity. *Phytochemistry* **65**, 3179-3185

Heiss S., Wachter A., Bogs J., Cobbett C., Rausch T. (2003) Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. *J. Exp. Bot.* **54**, 1833-1839

Himeno S., Yanagiya T., Enomoto S., Kondo Y., Imura N. (2002) Cellular cadmium uptake mediated by the transport system for manganese. *Tohoku J. Exp. Med.* **196**, 43-50

Hirata K., Tsujimoto Y., Namba T., Ohta T., Hirayanagi N., Miyasaka H., Zenk M. H., Miyamoto K. (2001) Strong induction of phytochelatin synthesis by zinc in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 24-29

Howden R., Goldsbrough P. B., Andersen C. R., Cobbett C.S. (1995a) Cadmium-sensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol.* **107**, 1059-1066

Howden R., Goldsbrough P. B., Andersen C. R., Cobbett C.S. (1995b) A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **107**, 1067-1073

Jensen TE (1994) Alternative pathway (cyanobacteria to Eukaryota), in J.Seckbach (ed.), Evolutionary Pathways and Enigmatic Algae: Cyanidium caldarium (Rhodophyta) and Related Cells. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, 53-66

Klapheck S., Schlunz S., Bergmann L. (1995) Synthesis of phytochelatin and homo-phytochelatin in *Pisum sativum* L. *Plant. Physiol.* **107**, 515-521

Kondo N., Imai K., Isobe M., Goto T., Murasugi A., Wadanakagawa C., Hayashi Y. (1984) Cadystin-A and cadystin-B, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast - separation, revision of structures and synthesis. *Tetrahed. Lett.* **25**, 3869-3872

Lane W. T., Morel M. M. F. (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4627-4631

Leverrier P., Montigny C., Garrigos M., Champeil P. (2007) Metal binding to ligands: cadmium complexes with glutathione revisited. *Anal. Biochem.* **371**, 215-228

López M. G., Moro M. A., Castillo C. F., Artalejo C. R., García A. G. (1989) Variable, voltage-dependent, blocking effects of nitrendipine, verapamil, diltiazem, cinnarizine and cadmium on adrenomedullary secretion. *Br. J. Pharmacol.* **96**, 725-731

Maier T., Yu C., Kullertz G., Clemens S. (2003) Localization and functional characterization of metal binding sites in phytochelatin synthases. *Planta* **218**, 300-308

Malakhov M. P., Mattern M. R., Malakhova O. A., Drinker M., Weeks S. D., Butt T. R. (2004) SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J. Struct. Funct. Genomics* **5**, 75-86

Matsuzaki M., Misumi O., Shin-I T., Maruyama S., Takahara M., Miyagishima S. Y., Mori T., Nishida K., Yagisawa F., Nishida K., Yoshida Y., Nishimura Y., Nakao S., Kobayashi T., Momoyama Y., Higashiyama T., Minoda A., Sano M., Nomoto H., Oishi K., Hayashi H., Ohta F., Nishizaka S., Haga S., Miura S., Morishita T., Kabeya Y., Terasawa K., Suzuki Y., Ishii Y., Asakawa S., Takano H., Ohta N., Kuroiwa H., Tanaka K., Shimizu N., Sugano S., Sato N., Nozaki H., Ogasawara N., Kohara Y., Kuroiwa T. (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* **428**, 653-657

Mendoza-Cozatl D., Loza-Tavera H., Hernandez-Navarro A., Moreno-Sanchez R. (2005) Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 653-671

Misumi O., Matsuzaki M., Nozaki H., Miyagishima S., Morz T., Nishida K., Yagisawa F., Yoshida Y., Kuroiwa H., Kuroiwa T. (2005) *Cyanidioschyzon merolae* genome. A tool for facilitating comparable studies on organelle biogenesis in photosynthetic eukaryotes. *Plant Physiol.* **137**, 567-585

Muños N., González C., Molina A., Zirulnik F., Luna C.M. (2008) Cadmium-induced early changes in O₂⁻, H₂O₂ and antioxidative enzymes in soybean (*Glycine max* L.) leaves. *Plant Growth Regul.* **56**, 159-166

Mun'delanji V., Sachiko M., Shingo N., Kentaro S., Kazumasa H., Masahiro T. (2008) Chelation of Cadmium Ions by Phytochelatin Synthase: Role of the Cystein-rich C-Terminal. *Anal. Sci.* **28**, 277-281

Nakazawa R., Kato H., Kameda Y., Takenaga H. (2002) Optimum assay condition of the activity of phytochelatin synthase from tobacco cells. *Biol. Plant.* **45**, 311-313

Newton G. L., Dorian R., Fahey R.C. (1981) Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **114**, 383-387

N. P. Rath, E. M. Holt, Tanimura K. (1985) Fluorescent copper(I) complexes: structural and spectroscopic characterization of bis(p-toluidine)bis(acetonitrile)tetraiodotetracopper and bis[(p-chloroaniline)(acetonitrile)diiododicopper] tetrameric complexes of mixed-ligand character. *Inorg. Chem.* **24**, 3934-3938

Ogawa S., Ichiki R., Abo M., and Yoshimura E. (2009) Revision of analytical conditions for determining ligand molecules specific to soft metal ions using dequenching of copper(I)-bathocuproine disulfonate as a detection system. *Anal. Chem.* **81**, 9199-9200

Ogawa S., Yoshidomi T., Shirabe T., Yoshimura E. (2010) HPLC method for the determination of phytochelatin synthase activity specific for soft metal ion chelators. *J. Inorg. Biochem.* **104**, 442-445

Ogawa S., Yoshimura E. (2010) Determination of thermodynamic parameters of cadmium(II) association to glutathione using the fluorescent reagent FluoZin-1. *Anal. Biochem.* **402**, 200-202

Ogawa S., Yoshidomi T., Yoshimura E. (2011) Cadmium(II)-stimulated enzyme activation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase 1. *J. Inorg. Biochem.* **105**, 111-117

Ogawa S., Yoshimura E. (2012) Comparison of methanol and acetonitrile eluents for the quantitation of chelators specific to soft-metal ions by HPLC. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **909**, 34-36

Ortiz D. F., Kreppel L., Speiser D. M., Scheel G., McDonald G., Ow D. W. (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO J.* **11**, 3491-3499

Ortiz D. F., Ruscitti T., McCue K. F., Ow D. W. (1995) Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 4721-4728

Osaki Y., Shirabe T., Tamura S., Yoshimura E. (2008) A functional putative phytochelatin synthase from the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 3306-3309

Osaki Y., Shirabe T., Nakanishi H., Wakagi T., Yoshimura E. (2009) Characterization of phytochelatin synthase produced by the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Metallomics.* **1**, 353-358

Oven M., Page J. E., Zenk M. H., Kutchan T. M. (2002) Molecular characterization of the homo-phytochelatin synthase of soybean *Glycine max* - Relation to phytochelatin synthase. *J. Biol. Chem.* **277**, 4747-4754

Pace CN, Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Prot. Sci.* **4**, 2411-2423

Perales-Vela H. V., Pena-Castro J. M., Canizares-Villanueva R. O. (2006) Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* **64**, 1-10

Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., De Tata V., Casini A. F. (2003) The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1499-1503

- Rausser W. E. (1995) Phytochelatins and related peptides - structure, biosynthesis, and function. *Plant. Physiol.* **109**, 1141-1149
- Rea P. A., Vatamaniuk O. K., Rigden D. J. (2004) Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatin synthase. *Plant Physiol.* **136**, 2463-2474
- Rea P. A. (2006) Phytochelatin synthase, papain's cousin, in stereo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 507-508
- Reisinger S., Schiavon M., Terry N., Pilon-Smits EA. (2008) Heavy metal tolerance and accumulation in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) expressing bacterial gamma-glutamylcysteine synthetase or glutathione synthetase. *Int. J. Phytoremediation.* **10**, 440-454
- Riener C. K., Kada G., Gruber H. J. (2002) Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 266-276
- Romanyuk N. D., Rigden D. J., Vatamaniuk O. K., Lang A., Cahoon R. E., Jez J. M., Rea P. A. (2006) Mutagenic definition of a papain-like catalytic triad, sufficiency of the N-terminal domain for single-site core catalytic enzyme acylation, and C-terminal domain for augmentative metal activation of a eukaryotic phytochelatin synthase. *Plant Physiol.* **141**, 858-869
- Ruotolo R., Peracchi A., Bolchi A., Infusini G., Amoresano A., Ottonello S. (2004) Domain organization of phytochelatin synthase - Functional properties of truncated enzyme species identified by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 14686-14693
- Salt D. E., Rausser W. E. (1995) MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol.* **107**, 1293-1301
- Salt D. E., Smith R. D., Raskin I. (1998) Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 643-668

Sasaki Y., Minakawa T., Miyazaki A., Kusano T. (2002) Heavy metal transporter – towards establishing a bio-system for recovering heavy metal from polluted sites. *J. Environ. Biotechnol.* **2**, 83-92

Schmoger M. E. V., Oven M., Grill E. (2000) Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiol.* **122**, 793-801

Seckbach J. (1994) The natural history of *Cyanidium* (Geitler 1933): Past and present perspectives, in J. Seckbach (ed.), Evolutionary Pathways and Enigmatic Algae, *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, 99-112

Shirabe T., Ito K., Yoshimura E. (2008) Dequenching of Cu(I)-bathocuproine disulfonate complexes for high-performance liquid chromatographic determination of phytochelatins, heavy-metal-binding peptides produced by the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Anal Chem.* **80**, 9360-9362

Sneller F. E. C., van Heerwaarden L. M., Koevoets P. L. M., Vooijs R., Schat H. and Verkleij J. A. C. (2000) Derivatization of phytochelatins from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: Comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane. *J. Agri. Food Chem.* **48**, 4014-4019

Strasdeit H., Duhme A. K., Kneer R., Zenk M. H., Hermes C. Nolting H. F. (1991) Evidence for discrete Cd(SCys)₄ units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectroscopy. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **16**, 1129-1130

Susanne L., Andreas H., Erwin G., Ernst-L Winnacker., Zenk M. H. (1989) Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. *FEBS Lett.* **258**, 42-46

Thomas M., Chao Yu., Gehard K., Stephan C. (2003) Localization and functional characterization of metal-binding sites in phytochelatin synthases. *Planta* **218**, 300-308

Tsien R. W., Hess P., McCleskey E. W., Rosenberg R. L. (1987) Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **16**, 265-290

Tsuji N., Nishikori S., Iwabe O., Shiraki K., Miyasaki H., Takagi M., Hirata K., Miyamoto K. (2004) Characterization of phytochelatin synthase-like protein encoded by *alr0975* from a prokaryote, *Nostoc sp* PCC 7120. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 751-755

Tsuji N., Nishikori S., Iwabe O., Matsumoto S., Shiraki K., Miyasaka H., Takagi M., Miyamoto K., Hirata K. (2005) Comparative analysis of the two-step reaction catalyzed by prokaryotic and eukaryotic phytochelatin synthase by an ion-pair liquid chromatography assay. *Planta* **222**, 181-191

Vatamaniuk O. K., Mari S., Lu Y. P., Rea P. A. (1999) *AtPCS1*, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: Isolation and in vitro reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7110-7115

Vatamaniuk O. K., Mari S., Lu Y.P., Rea P. A. (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase - Blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J. Biol. Chem.* **275**, 31451-31459

Vatamaniuk O. K., Bucher E. A., Ward J. T., Rea P. A. (2001) A new pathway for heavy metal detoxification in animals - Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **276**, 20817-20820

Vatamaniuk O. K., Mari S., Lang A., Chalasani S., Demkiv L. O., Rea P. A. (2004) Phytochelatin synthase, a dipeptidyl transferase that undergoes multisite acylation with γ -glutamylcysteine during catalysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 22449-22460

Vernet T., Dignard D., Thomas DY. (1987) A family of yeast expression vectors containing the phage f1 intergenic region. *Gene* **52**, 225-233

Vestergaard M., Matsumoto S., Nishikori S., Shiraki K., Hirata K., Takagi M. (2008) Chelation of cadmium ions by phytochelatin synthase: role of the cysteine-rich C-terminal. *Anal. Sci.* **24**, 277-281

Vivares D., Arnoux P., Pignol D. (2005) A papain-like enzyme at work: Native and acyl-enzyme intermediate structures in phytochelatin synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 18848-18853

Watanabe M., Suzuki T. (2001) Cadmium-induced abnormality in strains of *Euglena gracilis*: morphological alteration and its prevention by zinc and cyanocobalamin. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. & Pharmacol.* **130**, 29-39

Wang H. C., Wu J. S., Chia J. C., Yang C. C., Wu Y. J., Juang R. H. (2009) Phytochelatin synthase is regulated by protein phosphorylation at a threonine residue near its catalytic site. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 7348-7355

Yoshimura E., Kabuyama Y., Yamazaki S., Toda S. (1990) Activity of poly(γ -glutamylcysteinyl)-glycine synthesis in crude extract of fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 3025-3026

Zenk, M. H. (1996) Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene* **179**, 21-30

浅見 輝男 (2005) カドミウムと土とコメ

大崎 裕子 (2008) 東京大学修士論文

調 知朗 (2009) 東京大学修士論文

吉富 雄洋 (2009) 東京大学修士論文

小川 進也 (2010) 東京大学修士論文

堀内 志保 (2015) 東京大学修士論文

謝辞

修士課程の2年間、また卒業後に社会人研究生として3年間分析化学研究室でお世話になり、多くの方々のおかげで本研究を行うことができました。私の研究進捗を見守り、ご指導いただきました方々に、この場を借りて感謝の意を表したいと思います。

吉村悦郎教授には研究テーマの設定から、一つひとつの実験の方向性まで、あらゆる面で手厚いご指導をいただきましたことを心より感謝いたします。安保充博士、佐藤記一博士、鈴木道生博士には、研究を円滑に進める環境づくりにご配慮いただき、豊富な知識と経験に基づいて様々な点でアドバイスをいただきましたことを心より感謝いたします。

分析化学研究室の先輩である大崎裕子さん、調知朗さん、吉富雄洋さんには、本研究の基礎を築いていただいたことを感謝いたします。同期の井村祐己さんとは、互いに励ましあい、切磋琢磨しながら院生生活を送ることができたことを喜ばしく思います。その後、当研究室の助教となられてからは、学生の指導などお忙しい中、研究生として籍を置いていた私のサポートもしていただき、感謝しております。後輩の大村麻理子さん、一木理奈さんには、一部の実験を手伝っていただいたことを深く感謝いたします。堀内志保さんは、私の考えた難解な実験に何度も挑戦していただき、本当にありがとうございました。

日本分光(株)の北川宏子様、北山誠一様には、HPLC機器のメンテナンスから測定ノウハウまで、様々な相談に乗っていただき、ありがとうございました。

東洋大学生命科学部、長坂征治博士には、研究材料を提供していただくとともに、実験に行き詰ったときには丁寧なアドバイスをいただきましたことを厚く感謝いたします。

会社の仕事の傍らの博士号取得にご配慮いただいた、協和発酵キリン(株)東京リサーチパークの上司の方々、研究チームメンバーの皆様に感謝いたします。また、精神的に支えていただいた家族と友人に心より感謝いたします。

これまでの研究活動で学んだことを糧として、今後とも探究心と誠実さを忘れず、良き研究者として成長していけるように努力していく所存です。

平成28年3月 小川 進也