

論文の内容の要旨

論文題目

ファイトケラチン合成酵素の機能解析

氏名 小川 進也

背景と目的

Cd などの重金属は生体に対する有害性が高く、土壌や食物の汚染が大きな問題となっている。重金属ストレスに対して生物が有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。高等植物は重金属に曝露されると、ファイトケラチン(PC)という Cys に富むペプチドを合成する。PC は一般式 $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Xaa}$ ($n=2\text{-}11$) で表わされる非タンパク質性のペプチドで、グルタチオン(GSH)を基質としてファイトケラチン合成酵素(PCS)によって合成される。PC および PCS は、高等植物のみならず、藻類、分裂酵母、線虫など、多種の生物に存在しているものの、PCS の完全な結晶は未だ得られておらず、その活性化機構や立体構造に関しては不明な点が多く残っている。先行研究では、Cd が直接 PCS に結合して活性化するのか、Cd と結合した GSH が基質となるために Cd 存在下でのみ活性を示すのか明確な結論は得られていなかった。また、PCS タンパク質中の Cys は金属結合モチーフを形成して活性化に寄与すると考えられてきたが、どの Cys が重要なのかは明確に分かっていなかった。シロイヌナズナ由来の PCS(*AtPCS1*)は不安定な酵素であるがゆえに結晶化が困難であると考えられるため、安定性を有しつつ PCS 活性を示す変異体、もしくは他生物由来の安定な PCS の探索が必要と考えられた。本研究では PCS の機能を多面的な手法を用いて解明することを目的とした。

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

蛍光試薬 Bathocuproine disulfonate(BCS)は、Cu(I)イオンと結合して消光するが、PC などのソフト金属に対して親和性の高いキレーターが存在すると、BCS は Cu と解離して蛍光を回復する。この反応を HPLC ポストカラム法に適用した PC の分析系に対して、種々の条件を最適化した(Fig. 1)。その結果、検出限界が PC_2 で約 0.1 pmol である測定条件を決定し、これにより PC の分析に汎用されているチオール基検出試薬である DTNB を用いた方法よりも 1000 倍以上の高感度化が達成できた¹⁾。本分析法を PCS の酵素活性測定系に適用し、従来よりも 10~100 倍少ない酵素量での活性測定を可能とした²⁾。また、HPLC の溶離液に CH_3CN と CH_3OH のどちらを用いるかで、GSH や各種 PC に対する検出感度が異なることを明らかにした³⁾。 CH_3CN を用いた場合は、GSH に対する感度が PC_2 に比べて低く抑えられたため、GSH を高濃度で含む *in vitro*

酵素反応液を分析する点で有利であり、以後の反応速度論的解析において様々な条件で正確に酵素活性を定量することができた。

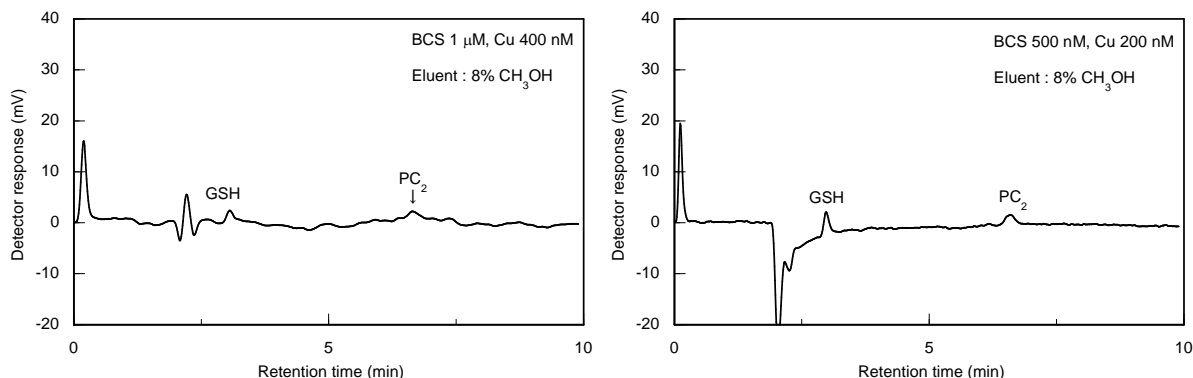


Fig. 1 条件の最適化によるベースラインノイズの低減と S/N の向上

Arabidopsis thaliana 由来の PCS を用いた PCS の Cd による活性化機構の解析

Arabidopsis thaliana 由来の PCS (*AtPCS1*)を大腸菌により大量発現させ、様々な GSH, Cd 濃度下で *in vitro* 酵素活性を測定した。その結果、一定の Cd 濃度に対して GSH 濃度を上昇させたとき、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を明らかにした(Fig. 2)。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 GSH 濃度が上昇することで、酵素に結合して活性化することのできる遊離 Cd 濃度が低下して、活性化型酵素である Cd-PCS 複合体の割合が低下するためであると考えられた。この仮説を検証するために、FluoZin-1 を用いて Cd と GSH の結合定数を独自に算出し⁴⁾、遊離 Cd 濃度を一定とした条件において酵素活性測定を行った(Fig. 3)。この結果を詳細に解析することで、*AtPCS1* は GSH と Cd-GSH₂ を基質としていることを確認した。遊離 Cd 濃度が一定かつ GSH 濃度 ≥ 25 mM の場合、活性曲線は Michaelis-Menten 型になることから、上記の仮説を説明した。

また、一定の GSH 濃度に対して Cd 濃度を变化させた条件では、酵素活性の極大値を与える Cd 濃度が存在することが分かった(Fig. 4)。すなわち、Cd の高濃度領域では、Cd は活性化サイトとは別の、活性抑制性サイトにも結合していると推定された。

以上の実験結果より、*AtPCS1* の反応速度は以下の式で表現できることを導き、実際の測定値に対してカーブフィッティングを行ったところ(Fig. 2, 4 の実線)、複数の異なる条件下で一定範囲内の V_{max} , K_{E1} , および K_{E2} のパラメーター値が得られ、考察した活性化モデルの妥当性が示された。このモデルでは、Fig. 4 の結果のみでなく Fig. 2 における GSH 低濃度領域でのシグモイド状の活性上昇をもうまく説明することができた⁵⁾。

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

また、*AtPCS1* の基質認識の特異性を検証し、 γEC は基質にならないが、 $\gamma\text{EC}-\gamma\text{EC}$ は基質になり $\gamma\text{EC}-\gamma\text{EC}-\gamma\text{EC}$ が合成されることを見出した。 γEC , GSH, $\gamma\text{EC}-\gamma\text{EC}$ の構造の比較から、酵素側の基質認識ポケットに、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部位が存在する可能性が考えられた。

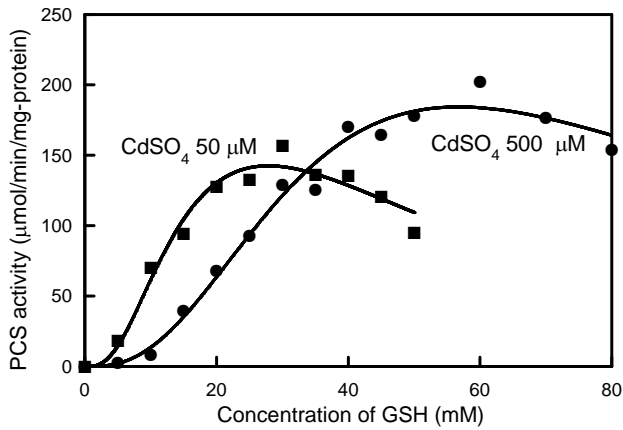


Fig. 2 CdSO₄ 濃度一定条件での酵素活性

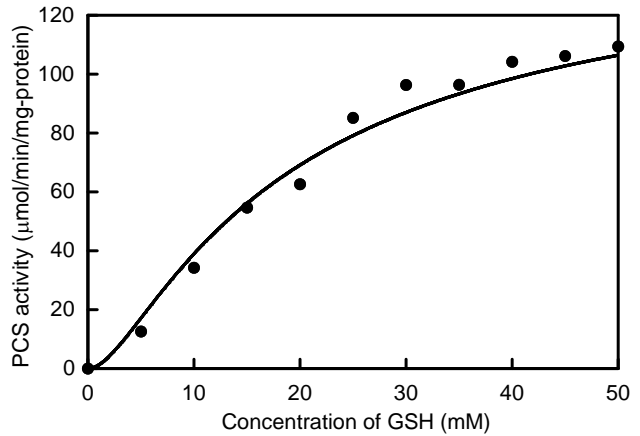


Fig. 3 遊離 Cd 濃度一定条件での酵素活性

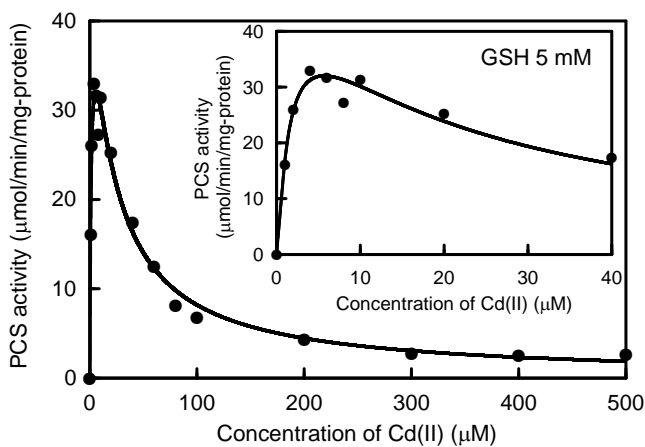


Fig. 4 GSH 濃度一定条件での酵素活性
右上は CdSO₄ 0-40 mM 部分の拡大図

*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

*At*PCS1 の N, C ドメイン中に存在する Cys 残基に着目し, Ser に置換した様々な変異体を作製して大腸菌粗抽出液を用いた活性評価を行った. その結果, 最も多くの Cys を改変しても活性を維持していた変異体として B3 変異体を選択した(Table 1). タンパク質を精製して酵素活性を比較したところ, B3 変異体は WT の約 40%の比活性を有していた. B3 変異体の安定性は WT と大差ないものであったが, DTNB 法を用いた SH 基の定量実験から, B3 変異体では分子表面の Cys を選択的に改変できていることが示唆された.

Table 1 *At*PCS1 への種々の変異導入と大腸菌粗抽出液が示した活性評価 (抜粋)

	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
A7	-	-	-	-	-	S	S	-	-	-	S	S	S	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	-	-

Cyanidioschyzon merolae 由来の PCS への変異導入と酵素活性

原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の PCS (*CmPCS*) の N 末端側には、別の生物種には見られない機能未知ドメインが存在する。このドメインを削除した変異 *CmPCS* を酵母内で発現させると、PCS 活性は保たれるものの、PC₂ に類似した副生成物が増加することが分かった。これは本来のアクセプター基質となる GSH の他にも、細胞内の他の分子が基質となり、 γ EC 基が転移された結果と考えられ、機能未知ドメインは酵素の反応特異性を保つ働きがあると推定された。

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

好熱性の原始紅藻 *Cyanidium caldarium* の cDNA Library から、Degenerate PCR 法により PCS と相同性の高い配列を単離した (*CcPCS*)。大腸菌を用いた大量発現系を構築し、目的タンパク質の大部分を可溶性画分に発現させ、アフィニティークロマトグラフィーにより精製し取得することができた。*CcPCS* は *in vitro* PCS 活性を有しており、*AtPCS1* と比較して 4°C および室温での保存性に優れていた。また、PCS に Cd または GSH を共存させることで保存性が向上することが分かった。

総括および総合考察

本研究は、ソフト金属キレーターの高感度な分析法を提示し、Cd は PCS に直接結合することで PCS の活性化に寄与することを明らかにした。また、*AtPCS1* の Cys 変異体の活性評価から、タンパク質表面に存在すると考えられる 10 個の Cys を Ser に置換した *AtPCS1*(B3) を作製した。さらに、タンパク質としての安定性が比較的高く、かつ可溶性に優れた新規 PCS 遺伝子 *CcPCS* を単離し、活性を確認した。今後はこれらのタンパク質の結晶化を試み、PCS の構造解析を行うことを考えている。構造解析によって、活性化に必要な Cd 結合部位や、Cd 以外の様々な金属に対する認識応答機構の解明に繋がると考えられる。PCS について更なる知見が得られることで、将来的に有害金属に強い植物の育種や、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。

原著論文

- 1) Ogawa, S. *et al.*; *Anal. Chem.* (2009), **81**(21), 9199-9200
- 2) Ogawa, S. *et al.*; *J. Inorg. Biochem.* (2010), **104**(4), 442-445
- 3) Ogawa, S. *et al.*; *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* (2012), **909**, 34-36
- 4) Ogawa, S. *et al.*; *Anal. Biochem.* (2010), **402**(2), 200-202
- 5) Ogawa, S. *et al.*; *J. Inorg. Biochem.* (2011), **105**(1), 111-117