

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小川 進也

生物が微量重金属の毒性にどのように対応しているかを調べることは、生物無機化学における生命現象の基礎的理解、また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・定量する分析系が必要である。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、以後の応用展開に繋がるものと考えられる。本研究は、毒性の高いソフト金属に対するキレート物質に特異的な分析系の高感度化を実現し、その分析系と種々の生物種由来の *phytochelatin synthase (PCS)* 遺伝子を用い、酵素反応速度論的および遺伝子工学的手法を駆使して 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。

第 1 章の序論では、生物の重金属ストレスへの応答機構について俯瞰し、重金属の解毒を担う物質である *phytochelatin (PC)* について概論を述べた。また、PC の合成を担う PCS が主に Cd などの重金属の存在下でのみ活性を示すこと、その反応機構は 2 段階に分けられること、Cd による活性化機構の説明は主に 2 つの仮説があることなどが述べられた。

第 2 章では、HPLC ポストカラム法を用いた PC 等のソフト金属キレターの分析手法の条件を最適化し、検出限界が PC₂ で約 0.1 pmol である測定条件が決定された。これは PC の分析に汎用されるチオール基検出試薬である DTNB を用いた方法よりも 1000 倍以上高感度であり、ソフト金属へのキレート力に依存した検出を行うことが出来るという点で特徴的な系である。この分析手法によって、Cd に暴露した *Cyanidioschyzon melorae* で誘導された PC の合成を定量し、生物試料の測定に有効であることを示した。加えて、溶離液の違いによる glutathione(GSH)や PC の検出限界の差異について詳細に解析が行われた。また、本手法を *Arabidopsis thaliana* 由来の PCS (*AtPCS1*) 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酵素活性測定を行った。詳細な検討を通じ、広い GSH, Cd 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、以後の第 3 章における PCS の活性化機構の解明に大きく貢献することとなった。

第 3 章では、様々な GSH, Cd 濃度条件下での酵素活性測定の結果から、*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が証明された。Zn の定量に使用される蛍光試薬である FluoZin-1 を用いて、GSH と Cd の結合定数を測定する方法を確立し、GSH 存在下での遊離 Cd 濃度の算出を行った。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き、速度論的視

点から遊離 Cd 濃度が活性化型酵素の割合を決定することを明らかにした。しかしながら、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 濃度を变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。以上を踏まえて反応速度の理論式を拡張し、実測値を満足に説明することのできる反応モデルを提示した。非線形最小 2 乗法を用いたカーブフィッティング解析によって PCS と Cd との結合定数を推定し、GSH の存在下で遊離 Cd 濃度が小さい場合においても、PCS と Cd が結合可能であることが説明された。また、*AtPCS1* の基質認識機構について検討し、基質認識には N 末端から 3 残基目のカルボキシル基が決定的な役割を示しているという仮説が導かれた。

第 4 章では、*AtPCS1* に存在する Cys 残基に注目し、約 20 種類に及ぶ変異体解析を通して各 Cys の活性への寄与が解析された。10 個の Cys を Ser に置換した *AtPCS1(B3)* 変異体は、WT の 40% 程度の比活性を保持していた。DTNB 法による SH 基のラベル化による解析から、*AtPCS1(B3)* では分子表面の Cys が選択的に Ser に置換されていることを示す結果が得られ、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ていることが示唆された。

第 5 章では、*C. melorae* 由来の PCS (*CmPCS*) の各ドメインやアミノ酸残基が PCS 活性に与える影響が、様々な *CmPCS* 変異体を酵母細胞で発現させることによって解析された。*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。tr111_338 の 3D モデル構造は、完全な活性を持つ PCS タンパク質のモデル構造としては前例がないものであり、Arg³³⁸ 残基の電荷的結合が分子構造の保持に寄与していることが説明された。

第 6 章では、*Cyanidium 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* の両方で実際に PCS 活性を有することが示された。大腸菌を用いた大量発現系の構築に成功し、精製酵素を用いた実験により、反応温度、反応 pH、種々の金属による活性化等の基礎データが取得された。また、PCS は非常に不安定な酵素であるが、*CcPCS* は *AtPCS1* と比較して保存安定性に優れていることが明らかにされた。

第 7 章で研究の総括と、今後の展望について議論を行った。

以上本研究は、ソフト金属キレーターに特異的な分析手法の高感度化を実現し、その手法を PCS の酵素学的解析に応用して Cd による酵素の活性化機構を解明したこと、および種々の生物種由来の PCS 遺伝子を用いた変異体解析によって PCS の活性化に関与するアミノ酸残基についての知見を得たこと、加えて今後 PCS タンパク質の結晶化に貢献すると考えられる、変異 PCS 遺伝子や好熱藻類由来の新規 PCS 遺伝子の単離を行ったものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の論文として価値あるものと認めた。