

Title	Biosynthetic Mechanisms of Phytochelatins, Heavy-Metal-Binding Peptides FUNCTIONAL ANALYSIS OF PHYTOCHELATIN SYNTHASE IN PHOTOSYNTHETIC ORGANISMS AND ITS APPLICATION
Author(s)	辻, 直城
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45686
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	辻 直 城
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 19432 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学 位 論 文 名	Biosynthetic Mechanisms of Phytochelatins, Heavy-Metal-Binding Peptides FUNCTIONAL ANALYSIS OF PHYTOCHELATIN SYNTHASE IN PHOTOSYNTHETIC ORGANISMS AND ITS APPLICATION (重金属抱合ペプチド phytochelatin の生合成メカニズム—光合成生物における phytochelatin 合成酵素の機能解析とその応用—)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 宮本 和久 (副査) 教 授 田中 慶一 教 授 那須 正夫 教 授 西原 力

論 文 内 容 の 要 旨

乾燥、塩、強光、重金属などの環境ストレスは、生物の成長に多大な影響を与える。生物は、これらの環境ストレスに対して応答・適応することにより種の存続に成功してきた。これらの環境ストレス応答・適応機構は、進化の過程で洗練され、非常に巧妙かつ効率的な機能を獲得してきたと考えられる。したがって、これらの機構を理解し利用することによって、様々な分野において新しい科学技術の開発を行うことができると考えられる。本研究ではその一端として、重金属ストレスに対する光合成生物の応答・適応機構についての基礎研究を行い、これによって得た情報、材料を基にして、環境ならびに医療分野への応用研究を行った。

Phytochelatin (PC) は、高等植物、酵母、緑藻などの真核生物において存在が確認されている重金属抱合ペプチドであり、 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ で表される構造を有し、重金属と結合することによってこれを無毒化する機能を持つ。PC の合成は、重金属存在下において PC 合成酵素によって触媒され、glutathione (GSH) を基質として以下の 2 段階の反応によって行われていることが知られている。1 段階目の反応においてドナー分子である GSH から Gly 残基を切り離すことによって中間体 $\gamma\text{-glutamylcysteine}$ ($\gamma\text{-EC}$) を生成し、2 段階目の反応で生成した $\gamma\text{-EC}$ ユニットを GSH もしくは PC_n などのアクセプター分子へ転移する。1999 年に、三つの研究グループによって同時に PC 合成酵素をコードする遺伝子が、高等植物、酵母、線虫から単離、同定された。これらのアミノ酸配列のアライメントより、N 末端領域は保存され、一方 C 末端領域は可変であることが確認されている。これ以降、組換え蛋白を用いた PC 合成酵素についての研究が盛んに行われるようになり、PC 合成反応機構に関するいくつかのモデルが提唱されているが、分子レベルでの解明は未だ行われていない。

本研究の前半部では、PC 合成酵素の触媒機構に関する基礎研究を行った。まず、大腸菌において発現した高等植物 *Arabidopsis thaliana* 由来の PC 合成酵素 (AtPCS1) を精製し、我々が確立した ion-pair HPLC 法を用いて、PC 合成反応における速度論的解析、基質利用性、重金属要求性について検討を行った。また、分光学的な手法を用いて重金属による AtPCS1 の構造変化とこれに伴う活性変化について調べた。これらの結果より、真核生物における PC 合成反応機構について以下に示す新たなモデルを提唱した。細胞内に侵入してきた重金属は、PC 合成酵素の活性化

構造を安定化する。活性化された PC 合成酵素は、PC 合成反応の第一段階として GSH もしくは PCn から γ -EC ユニットを切り出す。切りだされた γ -EC は直ちに酵素上で GSH もしくは PCn などのアクセプター分子と結合し、より鎖の長い PC が合成される。この反応において、一段階目の反応が律速であると考えられる。

これまで PC および PC 合成酵素は、原核生物には存在しないと考えられてきた。しかしながら、原核生物のゲノムプロジェクトの進展に伴い、多数の原核生物において PC 合成酵素遺伝子と相同性の高い遺伝子配列が確認されるようになった。これらの遺伝子がコードする蛋白は、真核生物由来の PC 合成酵素の N 末端領域と相同性が高く、C 末端領域が欠けているという特徴が認められる。そこで、次に我々は原核生物であるシアノバクテリア *Nostoc sp. PCC 7120* において、PC 合成酵素様蛋白をコードする遺伝子 (*alr0975*) および、本遺伝子がコードする蛋白 (NsPCS) の機能解析を行った。その結果、本株において重金属による PC 合成ならびに *alr0975* 遺伝子の発現変動は確認されなかったが、NsPCS は *in vitro* において 2 段階目の反応の触媒活性が弱いものの、PC 合成反応を触媒する機能を持つことが確認された。以上のことから、PC 合成酵素としての機能は未成熟であるものの、この蛋白をコードする原核生物由来の遺伝子は、シアノバクテリアから高等植物へ至る光合成生物の進化過程において、PC 合成酵素の起源となったのではないかと考えている。

先の研究より、原核生物由来の PC 合成酵素が真核生物由来の PC 合成酵素とは、構造的および機能的に異なる特徴を示したことから、真核生物における PC 合成の機能部位を特定する目的で、NsPCS と AtPCS1 のアミノ酸配列の比較より得た情報をもとに、多数の PC 合成酵素変異体を作製し、機能解析を行った。その結果、PC 合成酵素は、相同性の高い N 末端領域が触媒部位であり、この領域における Cys 残基のうち 56 番目の Cys は、一段階目の反応に大きく関与していることが示唆された。また、82-94、108-114、134-142 番目の三つの領域が重金属との相互作用もしくは、二段階目の反応に関与している可能性が示唆された。

後半部では、PC 分子および PC 合成酵素の機能に着目し、環境分野、医療分野への応用研究を行った。PC 合成酵素は重金属によって活性化され、生物種によってその特異性が異なることが知られている。したがって、重金属特異性を利用し、簡便にこれらの酵素の活性を測定することができれば、環境試料中の重金属を簡便かつ特異的に検出する方法を開発できると考えられる。そこでまず、PC 合成酵素の重金属特異性および感受性について、AtPCS1 および酵母由来 PC 合成酵素 (SpPCS) について評価を行い、さらにこれらの酵素活性について、分子内エキシマーを利用した蛍光誘導体化法の検討を行った。その結果、これらの酵素は、Cd、Zn、Cu において、排水基準に相当する重金属濃度で有意に活性化されることが確認され、これらの活性はエキシマー蛍光を用いて簡便かつ高感度に測定することができた。

次に、重金属抱合能および高い抗酸化活性を有する PC 分子の重金属によって引き起こされる蛋白凝集に対する溶解効果について検討を行った。蛋白凝集については、近年、繊維化、凝集などの異常なコンフォーメーションをとることによって、疾患が引き起こされていることが多数報告されている。まず、Alzheimer's disease (AD) の原因として知られている amyloid β ($A\beta$) をモデルとして、生理的な条件における重金属による凝集を確認した。次に、PC の重金属によって引き起こされる蛋白凝集に対する溶解効果について、phase II の臨床試験で AD の進行を遅らせる効果を持つことが報告されている clioquinol (CQ) と比較した。その結果、PC は CQ に比べて効果を示す濃度は高いものの、CQ 以上の溶解率を示した。

論文審査の結果の要旨

Phytochelatin (PC) は、高等植物、酵母、緑藻などの真核生物において存在が確認されているペプチドであり、重金属を抱合することによってこれを無毒化する。本研究の前半部では、高等植物 *Arabidopsis thaliana* 由来の PC 合成酵素 (AtPCS1) における速度論的解析、基質利用性、重金属要求性について検討を行い、真核生物における PC 合成反応機構について新たなモデルを提唱している。ついで、原核生物 (*Nostoc sp. PCC 7120*) において、PC 合成酵素様遺伝子 (*alr0975*) を確認し、これにコードされる蛋白 (NsPCS) が、PC 合成反応を触媒することを確認した。さらに、原核生物由来 PC 合成酵素と真核生物由来 PC 合成酵素の比較解析を行うことにより、PC 合成酵素の機

能部位を特定した。

後半部では、PC 分子および PC 合成酵素の機能に着目し、環境分野、医療分野への応用研究を行った。まず、PC 合成酵素の重金属特異性を利用した重金属バイオセンサーの開発を目的とし、蛍光物質を用いることにより、簡便かつ高感度な酵素活性の測定法を開発した。また、Alzheimer's disease の原因として知られている Amyloid β ($A\beta$) をモデルとして、重金属によって凝集した $A\beta$ を、PC が効果的に溶解することを確認した。

以上のように、本研究は、重金属ストレスに対する光合成生物の応答・適応機構について基礎的な検討を加え、得られた情報、材料をもとにして、環境ならびに医療分野への応用へと発展させている。よって本研究は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認められる。