Osaka University Knowledge Archive

Title	光合成生物における重金属抱合ペプチドphytochelatin合成機構の解析およびその応用
Author(s)	堀, 泰久
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49673
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【19】

氏　　名	堀（ほり）　泰（やす）　久（ひさ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　２２８８８　号
学位授与年月日	平成21年３月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学　位　論　文　名	**光合成生物における重金属抱合ペプチドphytochelatin合成機構の解析およびその応用**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　平田　收正 （副査） 教　授　那須　正夫　　教　授　高木　達也　　教　授　堤　　康央

論　文　内　容　の　要　旨

光合成生物は様々な環境ストレスに対する適応戦略を発達させることにより、ラン藻を起源として緑藻、コケ植物を経て高等植物へと進化したといわれている。したがって光合成生物種間で環境ストレス応答機構を分子生物学的に比較解析することによって、光合成生物の機能進化プロセスを分子レベルで明らかにできるものと考えられる。本研究では、高等植物等に広く存在し、重金属ストレス応答を担うファイトケラチン（phytochelatin: PC）合成機構に着目し、光合成生物の機能進化プロセスの解明を試みた。PCは$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$-Glyを基本構造とする重金属抱合ペプチドであり、グルタチオン（GSH）を基質として重金属を活性化因子とするファイトケラチン合成酵素（phytochelatin synthase: PCS）によって二段階の反応で合成され、重金属を抱合・無毒化することが知られている。PCSはこれまでに真核生物においてのみ存在が確認されていたが、筆者らは原核生物である一部のラン藻（*Nostoc* sp. PCC 7120）中にPCS遺伝子と高い相同性を持つ遺伝子が存在することを初めて見出した。さらに、当該遺伝子がコードするPCS様タンパク質（NsPCS）がPC合成反応のうち一段階目の反応のみを重金属非依存的に触媒することを明らかにしている。このNsPCSの生体内における機能はいまだ明らかとされていないが、NsPCSと真核生物型PCSの分子構造的あるいは機能的な差異は光合成生物の機能進化プロセスを解析するための格好の材料となる。一方で、PC合成機構は非常に巧妙に構築されており、PCSは重金属を迅速に感知してPCを合成する。つまり、生物内に蓄積されるPC量を測定することによって、その生物が生育する環境の重金属汚染をモニタリングすることが可能であること、またPCSを素子とする重金属センサーを構築することが可能であると考えられる。さらにPCは、光合成生物だけではなく哺乳類においても共通の傷害を起こす重金属に対して優れたキレート能を有することから、重金属が成因と考えられる疾患の予防薬や治療薬としての応用も可能であると考えられる。そこで本論文の前半部ではPC合成機構の生理的役割や機能進化プロセスの解明を目的としてNsPCSの機能解析を行い、さらに後半部ではPC合成機構を利用した重金属汚染検出技術や医薬品の開発に向けた検討を行った。

前半部ではNsPCSの機能解析を行った。アノテーション解析によりNsPCSは低温時に発現誘導される遺伝子であると推定され、また低温処理におけるNsPCS遺伝子の発現変動の解析により、NsPCSが低温によって誘導される分子であることが確認された。さらにラン藻を用いた形質転換実験により、NsPCSが低温耐性強化能を有することが明らかとなった。以上の結果からNsPCSは低温時に発現誘導され、低温ストレス耐性を強化するタンパク質であることが示された。今後、NsPCSと真核生物型のPCSの分子の構造と機能の連関を明らかにすることができれば、PC合成機構の進化プロセス解明につながる。また、本研究で存在が明らかとなったNsPCSによる低温ストレス耐性強化機構を詳細に解析することにより、食糧増産、環境再生に貢献できるような低温ストレス耐性植物の作出が可能になるものと期待される。

後半部ではPC合成機構を利用した技術開発を行った。まず重金属汚染検出技術の開発に取り組んだ。PCによるPC合成量は活性化因子として共存する重金属の濃度に比例することから、合成されたPC量を簡便かつ迅速に定量できれば、重金属汚染地域に生息する生物内に蓄積されるPC量を指標としたバイオモニタリング法や、PCSを素子としたバイオセンサーなど重金属汚染検出技術の開発が可能になると考えられる。今回、筆者らが独自に開発した、PCをピレン化合物であるN- (1-pyrenyl) maleimide（NPM）で誘導体化することにより生じるエキシマー蛍光を利用する、簡便かつ迅速なPC検出・定量法を用いた重金属汚染検出技術の開発を試みた。まず、生物内に蓄積されるPCを利用した重金属バイオモニタリング法について検討を行った。重金属処理した緑藻*Dunaliella tertiolecta*の抽出液にNPMを加えたところ、エキシマー蛍光が生じることが確認され、本法により生物内に蓄積されるPCを検出できることが示された。したがって、本法は実用的な重金属汚染バイオモニタリング法として期待できる。続いて、PCSを素子とする重金属センサーについて検討を行った。本センサーの原理は以下の通りである。重金属を含む試料に精製PCSおよびGSHを加えることで、試料に含まれる重金属濃度依存的にPCが合成され、その反応液にNPMを加え合成されたPCを誘導体化し、発せられるエキシマー蛍光を指標に重金属を検出する。本センサーにより重金属濃度依存的なエキシマー蛍光強度の増加、またカドミウム濃度とエキシマー蛍光強度の関係に比較的高い線形性が確認されたことから、本センサーは、従来の方法では実現しえなかった、重金属の簡便かつ迅速な検出・定量を可能とした。以上の結果は、PC合成機構を利用した新規の重金属汚染モニタリング技術開発の可能性を示すものである。

次にPCの医薬品への応用を目指して、亜鉛、銅によって誘導され、疾患の発症に関与するとされるタンパク質凝集に対するPCの作用について評価した。本研究では白内障の発症に関与する、水晶体中の主な構成タンパク質であるα-crystallin（αC）を用いて評価した。その結果、銅によって誘導される凝集においてほとんど作用を示さなかったが、亜鉛による凝集においてPCが抑制作用を発揮した。この作用はすでに白内障の治療薬として認可されているGSHよりも有意に優れていた。以上の結果から、PCがGSHとは異なる作用点を持った抗白内障薬になり得る可能性を示す重要な知見であると考えられる。

本研究は光合成生物の機能進化プロセス解析に有用な知見を与え、また環境・医療分野での新たな技術開発の可能性を示した。今後、本研究を基盤としたさらなる解析が進められることにより、生物学の進展と様々な社会

問題の解決に大きく貢献できるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

博士論文「光合成生物における重金属抱合ペプチドphytochelatin合成機構の解析およびその応用」では、有害金属の無毒化を担うphytochelatin（PC）の合成酵素（PCS）について、光合成生物の進化にともなう機能進化プロセスに関する解析研究と、その機能を利用した新規有害重金属センサーの開発研究、さらに、PCのタンパク質凝集抑制作用を利用した白内障予防・治療薬開発に向けた基礎研究が行われた。

高等植物のPCS（AtPCS1）と原核生物であるラン藻由来のPCS様タンパク質であるNsPCSの機能に関する比較解析から、高等植物では重金属に応答してPCを合成してその毒性を緩和するのに対し、ラン藻では低温ストレス応答性タンパク質としてその耐性強化を担うことを明らかにした。

また、PCS を素子とし、エキシマー蛍光の発生の有無によるPCとグルタチオンの分別検出を導入した新規の簡便、迅速かつ安価なセンサー開発にすることに成功し、重金属等の有害重金属の検出に有効であることを示した。さらに、PCが白内障の原因の一つと考えられる水晶体タンパク質クリスタリンの凝集を有意に抑制することを確認し、その予防・治療薬の候補物質として有用であることを示した。

これらの研究成果は、学術的にも高いレベルにあり、さらに得られた成果は今後環境浄化や食料増産、さらには医療への応用・貢献が期待できる有用な知見と言える。また、本成果の一部は、原著論文としてすでに英文学術雑誌から受理されている。

以上、論文審査により、本論文は学術的な観点および今後広範な応用が期待できる実用的な応用研究という観点から、非常に優れた研究であることを確認し、大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程の博士論文に値するものと判断するに至った。