

Title	ファイトケラチン合成酵素の活性制御と重金属結合特性の解析
Author(s)	松本, 幸子
Citation	
Issue Date	2006-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/2189
Rights	
Description	Supervisor:高木 昌宏, 材料科学研究科, 博士

Studies on catalytic regulation and metal binding property of phytochelatin synthase

(ファイトケラチン合成酵素の活性制御と重金属結合特性の解析)

高木研究室 340033 松本 幸子

【背景および目的】

グルタチオン(γ Glu-Cys-Gly; GSH)はあらゆる細胞に存在し、ラジカルの除去や過酸化物の還元、重金属の捕捉、酸化還元電位の調節に関わる重要な抗酸化物質である¹⁾。植物は、カドミウムなどの重金属にさらされると、このGSHを基質としてファイトケラチン(phytochelatin; PC)と呼ばれるペプチドを合成する(Fig.1)²⁾。PCの基本構造は、 $(\gamma$ Glu-Cys)_n-Gly (n=2-11)であり、このCysのSH基が重金属を捕捉し、無毒化する。このPCを合成する酵素が、ファイトケラチン合成酵素(phytochelatin synthase; PC合成酵素)であり、主に植物や酵母、藻類に存在する³⁾。精製や結晶化が難しく、立体構造はまだわかっていない。PC合成酵素のN末端領域は相同性が高く、触媒領域として解析が進んでおり、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)由来PC合成酵素ではCys-56、His-162、Asp-180がGlyを切断すると考えられている。一方、C末端領域は保存性が低く、その役割はまだ明らかになっていない。しかし、C末端領域に存在するCysのほとんどが隣接しているという特徴的な配列をもつなど、C末端領域はPC合成の制御機能を担っている可能性が高い。

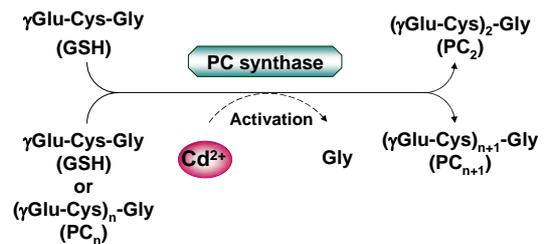


Figure 1. PC synthase catalyses the synthesis of PCs, $(\gamma$ Glu-Cys)_n-X polymers, by the net transfer of a γ Glu-Cys unit from one thiol peptide (usually GSH) to another, or to a previously synthesized PC molecule.

PC合成酵素の機能メカニズムを明らかにすることで、ストレス耐性植物の創生や植物による環境浄化システムの技巧のみならず、重金属や酸化ストレスを問題とする機能性食品や化粧品など幅広い分野での応用が期待できる。将来的には、重金属非存在下においてPCを合成できる酵素の創製を目指す。そこで、本研究は、*A. thaliana*由来のPC合成酵素を用い、PC合成酵素のPC合成活性機構を明らかにすることを目的とした。

【実験および考察】

PC合成酵素の活性化条件について調べた。まず、PC合成酵素遺伝子を*Escherichia coli*と*Saccharomyces cerevisiae*に導入し、それぞれCd²⁺を暴露させたところ、Cd²⁺耐性の向上と生体内でのPC合成が観察された。よって、植物由来PC合成酵素は異種生物においてもPCを合成し、導入によってCd²⁺耐性を付与できることが明らかとなった。

PC合成酵素は植物由来のCysに富む酵素であり、非常に不安定であることから、これまでにPC合成酵素単独での精製はされていなかった。よって、PC合成酵素で*E.coli*(BL21(DE3))を形質

転換し、PC合成酵素を高発現させ、イオン交換クロマトグラフィーによる精製法を確立した。精製したPC合成酵素を用い、GSH濃度、 Cd^{2+} 濃度、反応時間、保存条件を変え、PC合成酵素のPC合成量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で定量した。その結果、PC合成量と鎖長は Cd^{2+} 濃度に依存し、 Cd^{2+} または酸素が存在する保存条件で活性が高く保たれることがわかった。そこで、その結果とPC合成酵素C末端領域の特異的アミノ酸配列を基に、C末端領域Cysの活性制御についての仮説を立案した(Fig.2)。

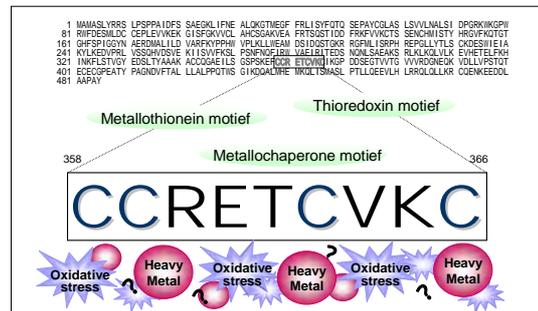


Figure 2. Amino acid sequence of the PC synthase and hypothetical model for PC synthase regulation

PC合成酵素のN末端領域は触媒領域として解析が進んでいるが、C末端領域は特徴的なCys配列が存在し、その役割はまだわかっていない。C末端領域の358から366番目に見られる-Cys-Cys-、-Cys- X_n -Cys-($n=1\sim 4$, XはCys以外のアミノ酸)という配列は、チオレドキシニン(酸化還元調節ペプチド)⁴⁾、メタロチオネイン(重金属結合タンパク)³⁾、メタロシャペロン(金属輸送ペプチド)⁵⁾等の活性中心の配列と類似しており、それらの機能を制御することでC末端領域がPC合成を制御している可能性が考えられた。C末端領域を欠損させた場合、*in vivo*では低効率ながらPCを合成するが、*in vitro*ではPCを合成しない。加えて、原核生物であるシアノバクテリアには、高等植物におけるPC合成酵素のN末端領域に相当するPC合成酵素様配列が存在するがPCを合成できないことから、C末端領域は進化の過程で発達し、酵素の機能制御をはじめとする種々の機能を有すると考えられる。そこで、立案した仮説に基づき、PC合成酵素C末端領域の358から366番目に存在する4つのCysをAlaに置換した変異型酵素を作製し、機能や構造の変化を解析した。

大腸菌形質転換体の Cd^{2+} 耐性と酸化ストレス(メチルビオロゲン、過酸化水素)耐性は、野生型に比べ変異型遺伝子導入大腸菌で減少していた(Fig.3)。 Cd^{2+} 暴露ではPCを合成していたことから、Cysの置換によりPC合成酵素の重金属捕捉能が低下、またはPC合成能が低下したと考えられた。一方、酸化ストレス暴露ではPCを合成していなかったことから、PC合成酵素が抗酸化能をもち、Cysの置換によりPC合成酵素の抗酸化力が低下したと考えられた。

精製した野生型と変異型酵素のPC合成量を測定したところ、変異型酵素のPC合成能は低下して

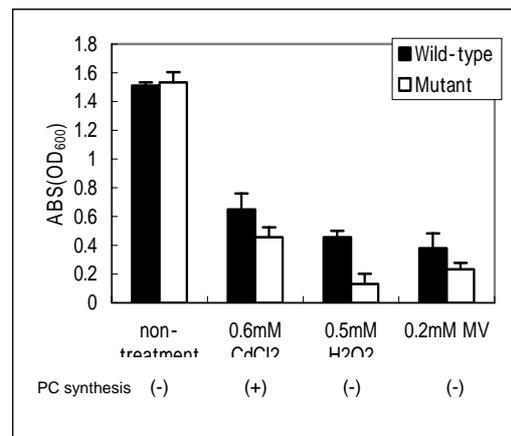


Figure 3. Enhancement of Cd^{2+} , H_2O_2 and methyl viologen (MV) tolerance to *E. coli*, and PC synthesis.

おり、Cysの置換によりPC合成能が低下したことが明らかとなった。また、酵素溶液を酸化処理すると、変異型酵素のPC合成能が大きく低下したことから、Cysの置換によりPC合成活性が酸化の影響を受け易くなったことがわかった。チオレドキシンは活性部位でジスルフィド結合をすることにより酸化還元を調節し⁴⁾、メタロシャペロンであるAtx1は活性部位でのジスルフィド結合の形成や、GSHとの結合により、酸化から活性部位を保護する⁵⁾。PC合成酵素もC末端領域のCysが活性中心を酸化ストレスから保護している可能性が示唆された。

次に、円偏光二色性(CD)スペクトルを測定し、 T_m ()を算出したところ、野生型と変異型酵素はそれぞれ 54.8 ± 0.2 、 55.5 ± 0.2 であり、 Cd^{2+} 存在下ではそれぞれ 57.8 ± 0.1 、 56.6 ± 0.2 であった。野生型酵素は Cd^{2+} の存在により T_m が3℃上昇したが、変異型酵素では1℃の上昇であった。よって、野生型酵素が Cd^{2+} との結合により構造が大きく安定化されることが明らかとなり、変異型酵素は Cd^{2+} 結合能が野生型よりも低いと考えられた。各種重金属(Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^+)に対するPC合成量を比較したところ、野生型と変異型で相違が見られた(Fig.4)。総PC合成量は、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} では野生型の方が多く、 Cu^{2+} では変異型の方が多かった。また、 Cd^{2+} と Zn^{2+} の場合を比較すると、野生型と変異型酵素のPC合成量の差が大きくなっていった。よって、着目したC末端領域は重金属特異性に関与すると考えられた。さらに、誘導結合プラズマ発光(ICP-AES)分析により重金属濃度を定量し、PC合成酵素と重金属との結合比を決定した。 Cd^{2+} との結合比は、野生型と変異型酵素でそれぞれ 7.54 ± 0.03 、 5.73 ± 0.07 であり、 Zn^{2+} との結合比は 7.78 ± 0.31 、 4.83 ± 0.11 であった。よって、PC合成酵素は7つの Cd^{2+} と結合し、置換したCysは2つの Cd^{2+} 結合に関与していることが明らかとなった。また、変異型酵素は Zn^{2+} との結合数が減少したことから、置換したCysは重金属の認識機能や結合能に関与することがわかった。

PC合成酵素は植物をはじめ、藻類、酵母で同定されている。いずれもCysに富み、PCを合成するが、機能メカニズムなどの詳細は解析されていなかった。本研究では、PC合成酵素が異種生物においても発現し、活性化することを明らかにした。PC合成酵素の精製に成功し、活性化条件を明らかにすることで、C末端領域のCysの役割に着目した。C末端領域のCysは、PC合成に必須ではないが、PC合成における活性中心を酸化から保護し、重金属認識や重金属運搬をすることで効率的なPC合成に重要な役割を果たしていると考えられた。さらに、重金属捕捉や抗酸化作用に直接関与していることが明らかとなった。本研究は、タンパク質中のCysの活性への役割の解明に加え、PCおよびPC合成酵素の産業への応用研究の発展につながると考えられる。

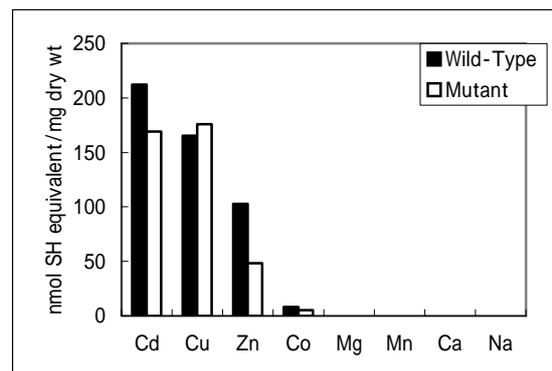


Figure 4. HPLC profiles of the interaction between wild-type and mutant PC synthase and metal ions. 0.5mM $CdCl_2$, $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $CoCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $CaCl_2$ or $NaCl$ was used for the analysis.

【参考文献】

1. Martin MN. (2003) Biosynthesis and metabolism of glutathione in plants. *Genet Eng (N Y)*. **25**, 163-188.
2. Cobbett CS. (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol*. **123**,825-32.
3. Cobbett C, Goldsbrough P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol*. **53**, 159-82.
4. Watson WH, Yang X, Choi YE, Jones DP, Kehrer JP. (2004) Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol Sci*. **78**, 3-14.
5. Finney LA, O'Halloran TV. (2003) Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science*. **300**, 931-936.

【論文目次】

Chapter 1 : General Introduction (pp. 1-13)

Chapter 2 : Functional Analysis of Phytochelatin Synthase from *Arabidopsis thaliana* and its Expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* (pp. 14-27)

Chapter 3 : Role of the C-terminal Cys-Rich Region of Phytochelatin Synthase in Tolerance to Cadmium Ions (pp.28-40)

Chapter 4 : Characterization of the C-terminal Region of the Phytochelatin Synthase as a Heavy Metal Binding Site (pp. 41-51)

Chapter 5 : General Conclusions (pp. 52-58)

【本研究の業績】

1. **Matsumoto S**, Shiraki K, Tsuji N, Hirata K, Miyamoto K, Takagi M. (2004) Functional analysis of phytochelatin synthase from *Arabidopsis thaliana* and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Tech Adv Mat*. **5**, 377-381.
2. **Matsumoto S**, Nishikori S, Shiraki K, Tsuji N, Hirata K, Miyamoto K, Takagi M. Role of the C-terminal Cys-rich region of phytochelatin synthase in tolerance to cadmium ions. in preparation.

【その他の論文】

1. Matsui S, **Matsumoto S**, Adachi R, Kusui K, Hirayama A, Watanabe H, Ohashi K, Mizuno K, Yamaguchi T, Kasahara T, Suzuki K. (2002) LIM kinase 1 modulates opsonized zymosan-triggered activation of macrophage-like U937 cells. Possible involvement of phosphorylation of cofilin and reorganization of actin cytoskeleton. *J Biol Chem*. **277**, 544-549.
2. 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**, 181-91.
3. Konishi T, **Matsumoto S**, Tsuruwaka Y, Shiraki K, Hirata K, Tamaru Y, Takagi M. Enhancing the tolerance of zebrafish (*Danio rerio*) to heavy metal toxicity by the expression of plant phytochelatin synthase. *J Biotechnol*. in press.