

Title	魚類の解毒機構におけるグルタチオンを基盤とする生体分子
Author(s)	小西, 隆文
Citation	
Issue Date	2006-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/2193
Rights	
Description	Supervisor:高木 昌宏, 材料科学研究科, 博士

「魚類の解毒機構におけるグルタチオンを基盤とする生体分子」

高木研究室 340019 小西 隆文

【第1章】序論

化学物質や薬剤の安全性を評価するために、モデル生物を用いた毒性試験法が多用されている。生態系やヒトへの薬物の影響を推測するために、魚類は適した特徴を備えている。特に、多様な生物種と広い生育域、大量スクリーニングが可能な多産性、ヒトゲノムとの高い相同性などが挙げられる。しかし、魚類の薬物代謝に関する分子生物学的な研究は立ち遅れており、その機構も不明な点が多い。そこで、生体成分グルタチオン（図1）を基盤とする魚類の生体防御機構に着目して、以下の研究を試みた。解毒酵素として知られるグルタチオン S-転移酵素（GST）の遺伝子クローニングおよびタンパク質の特徴付けをおこなった（第2章－第4章）。一方、上記の魚類の利点を活かして、重金属の解毒機構に関わる植物ペプチドの機能を魚類胚の評価系により個体レベルで検討した（第5章）。

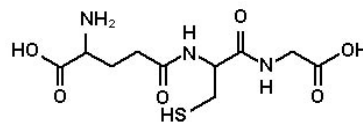


図1 還元型グルタチオンの構造式

【第2章】マダイ由来の Alpha クラス GST 遺伝子の単離と特徴付け

本章では、供試魚として養殖マダイを用いて、先ず肝臓から GST タンパク質を精製した。精製標品は2種類の異なる分子量のタンパク質を含んでいた（25kDa, 28kDa）（図2A）。25kDa GST の cDNA をクローニングした結果、2種類の GST 遺伝子を得た（*GSTA1*, *GSTA2*）。両者の配列はともに、哺乳類や鳥類の Alpha クラス GST と高い相同性を示した（図2B）。また、ゲノム DNA 上の GST 遺伝子のエキソン構造や組換え体 GST の触媒能は、既報の Alpha クラス GST と非常に類似していた。以上より、魚類から哺乳類まで Alpha クラス GST が進化的に保存されていることが明らかとなった（論文1）。

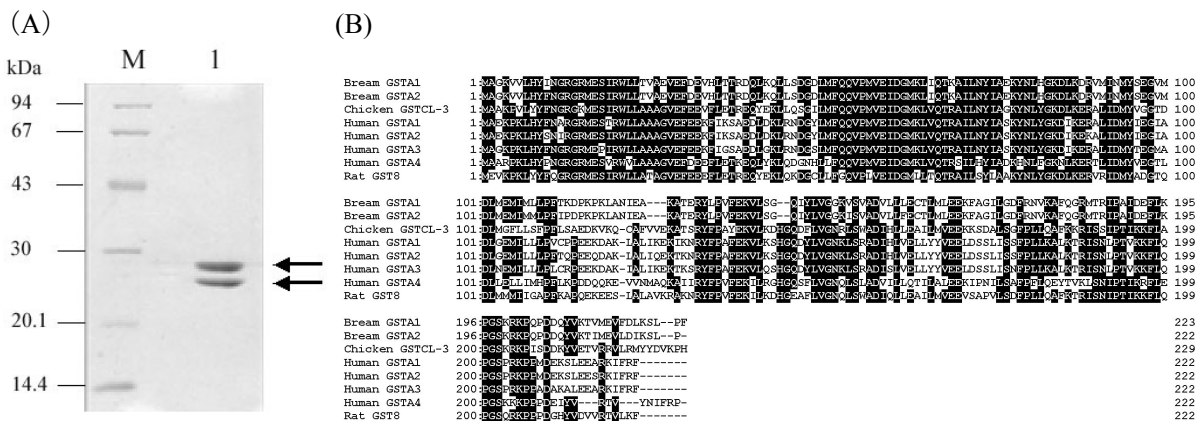


図2 (A)精製 GST の SDS-PAGE, (B) Alpha クラス GST 遺伝子のアミノ酸配列のアライメント

【第3章】マダイ由来の新規 Rho クラス GST 遺伝子の単離と特徴付け

本章では、マダイの 28kDa GST の cDNA を単離した (*GSTR1*)。本遺伝子は既存のクラスに分類されない魚類に特異な配列であった (図 3 A)。また、この遺伝子をコードするゲノム DNA を単離した結果、エキソン構造は既報の GST 遺伝子と全く異なっていた。さらに、組換え体 GST を精製して、マダイの Alpha クラス GST と熱安定性を比較した。すなわち、CD スペクトルにより温度と 2 次構造の関係を解析した結果、組換え体 *GSTR1* は熱に不安定な性質を示すことが明らかとなった ($T_m=30^{\circ}\text{C}$) (図 3 B)。以上より、この魚類に特異な GST 遺伝子を「Rho クラス GST」として新たに分類した (論文 2)。

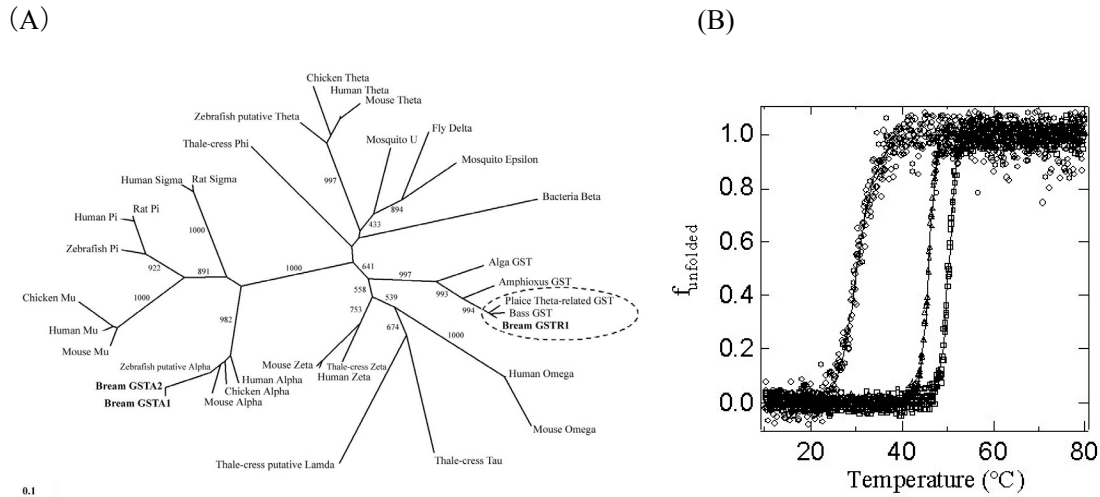


図 3 (A) GST 遺伝子のアミノ酸配列に基づく樹形図, (B) 組換え体 GST における温度と構造の関係

(凡例: ○, *GSTR1*; △, *GSTA1*; □, *GSTA2*)

【第4章】ゼブラフィッシュ由来の Rho クラス GST 遺伝子の構造解析

本章では、Rho クラス GST の遺伝子を小型魚類のゼブラフィッシュを用いて解析することを試みた。cDNA クローニングの結果、ゼブラフィッシュから 2 種類の相同遺伝子を単離した (*drGSTR1*, *drGSTR2*)。 *drGSTR1* は、既知の Rho-class GST と同様の一次構造だったが、*drGSTR2* は C 末端ドメインを欠損していた (図 4)。ゲノム DNA 配列に対する配列解析の結果、両者の mRNA は同一な DNA 遺伝子を基として選択的スプライシングにより合成される産物であることが示唆された。以上より、Rho クラス GST 遺伝子には、機能未知の新規バリエーション (drGSTR2) が存在することが明らかとなった。

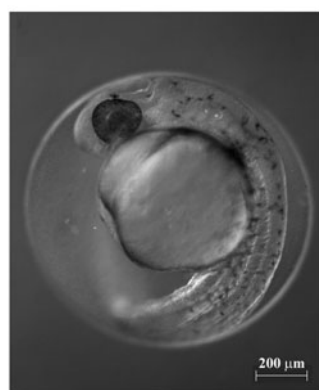
Largemouth bass	1:	MAKDMTLLWGSGSPPCWRVQIALEEKSLQGYNOKILLRFDKMEHKSCEVMDMNPGRQLPAFKHGNNVLNESYAACLYLESFQKSGQGNKLIPOCSAERALMY	100
Plaice	1:	MAKDMTLLWGSGSPPCWRVMIVLEERKLLQYNSKILLSFEEKGEHKSCEVMSMNPRGQLPAFKHGSKVLNESYAACMYLESQFQKSGQGNKLIPOCPACQAMMY	100
Red sea bream	1:	MAKDMTLLWGSGSPPCWRVMIVLEERKLLQYNSKILLSFEEKGEHKSCEVMSMNPRGQLPAFKHGDKVLNESYAACLYLENQFQKSGQGNKLIPOCPAELAMMY	100
Zebrafish 1	1:	MAQNMLLYWGTGSPPCWRVMIALEEKSLQGYKHKILLSFDKKEHQSBEVKALNPRAQLPTEFKHGEIVVNESFAACLYLESVFKSGQTRILPDNPAEMALVY	100
Zebrafish 2	1:	MAQNMLLYWGTGSPPCWRVMIALEEKSLQGYKHKILLSFDKKEHQSBEVKALNPRAQLPTEFKHGEIVVNESFAACLYLESVFKSGQTRILPDNPAEMALVY	100
Largemouth bass	101:	QRMFEGGLTLNOKMADVIIYNNKVPGERHDSAVKRNKRDVLSADFKLWEGYLQKASGSEF-FAGKNFSLADVIIVNESIAYLDF-HFGLCEERYPRLAAYYNSN	198
Plaice	101:	QRMFEGGLTLNOKMADVIIYNNKVPGERHDSAVKRNKREMLSTELKLWEGYLQKISGSEF-VAGKSFSLADVSVFEGVAYLDF-RFGLTEERYPOLTAYYNSL	198
Red sea bream	101:	QRMFEGGLTLNOKMADVIIYNNKVPGERHDSAVKRNKREMLSTELKLWEGYLQKISGSEF-LAGKTFSLADVSVFEGVAYLDF-RFGLTEERYPRLAAYYNSL	198
Zebrafish 1	101:	QRMFETENLQOKMYEAFYDMLVPEGERLESALKRNKKEKLIEELKLWEGYLEKMGKGSYLAKGNFSLADVVCPEVIAY-FEELQCPKPERCERLMEYEMV	199
Zebrafish 2	101:	QRMFETENLQOKMYEAFYDMLVPEGERLESALKRNKKEKLIEELKLWEGYLEKMGKGSYLAKGNFSLADVVCPEVIAY-FEELQCPKPERCERLMEYEMV	163
Largemouth bass	199:	KDRPSIKASWPPPTWLENPGQDQDLKDI	225
Plaice	199:	KDRPSIKASWPPPTWLENPGQDQDLKDV	225
Red sea bream	199:	KDRPSIKASWPPPTWLENPGQDQDLKDI	225
Zebrafish 1	200:	KDRPSIKASWPPPTWLENPGQDQDLKSL	226
Zebrafish 2	164:	-----	164

図 4 Rho-class GST のアミノ酸配列のアライメント

【第5章】植物遺伝子の発現によるゼブラフィッシュの重金属耐性の強化

植物や酵母などは、グルタチオン由来のファイトケラチン(PC)と呼ばれる抗酸化ペプチドをもっている。PC 合成酵素により作り出されるこのペプチドは、重金属の解毒機構に関わる重要な役割を演じている。本章では、ゼブラフィッシュを用いて PC の生理的機能を動物個体で評価した。まず、蛍光タンパク質 GFP を融合した植物由来の PC 合成酵素の mRNA をゼブラフィッシュ初期胚へ導入した。その結果、ゼブラフィッシュ胚は正常に発生して目的タンパク質の発現が全身的に検出された (図 5 A)。また、PC ペプチドを胚から検出された。この胚をカドミウム溶液に曝露して表現型を経時的に観察した結果、胚の生存率は対照に比べて著しく増加した (図 5 B)。以上より、生体内で合成された PC により、ゼブラフィッシュ胚の重金属耐性が個体レベルで向上することが明らかとなった。

(A)



(B)

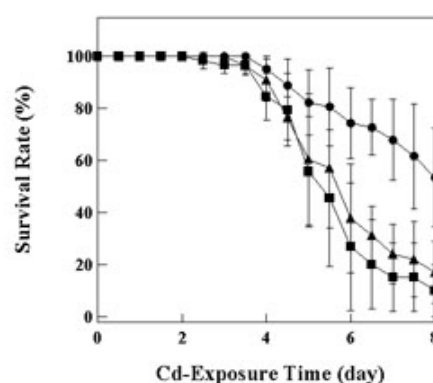
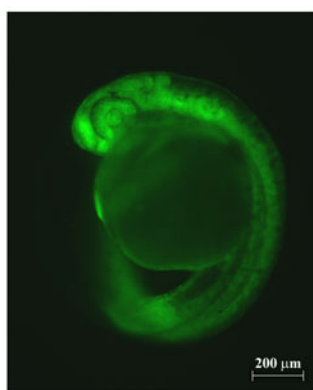


図5 (A) 目的タンパク質を発現したゼブラフィッシュ初期胚(受精後 30 時間)

(B) カドミウム曝露時間とゼブラフィッシュ胚の生存率の関係

(凡例：■, mRNA なし；▲, GFP mRNA 導入；●, PCS mRNA 導入)

【第6章 総括】

薬物が生物へ与える影響を検討する上で、種差の考慮は不可欠である。本研究の成果により、魚類は哺乳類と相同な GST 遺伝子だけでなく、特異な GST 遺伝子を有することが明らかとなった。魚類における新たな薬物代謝系の存在が示唆され、ヒトの薬物代謝機構と比較する上で重要な知見が得られたといえる。今後、これら遺伝子の生理的機能や発現の薬物誘導性が解明されることにより、新たな分子マーカー遺伝子としての応用も期待される。一方、小型魚類の表現型を指標とした評価系により、ファイトケラチン (PC) の重金属解毒機能が培養細胞レベルだけでなく、動物個体レベルで作用することが初めて示された。今後、動物細胞内における PC ペプチドの解毒機構や、抗酸化物質としての生理的機能を検討することにより、健康食品・医薬品への応用が期待される。以上、本研究の成果が、魚類を用いた毒性学研究や薬理学研究のさらなる発展へ寄与することを期待する。

【論文目次】

CHAPTER 1	General introduction (page 1-7)
CHAPTER 2	Molecular cloning and characterization of Alpha-class glutathione S-transferase genes from the hepatopancreas of red sea bream, <i>Pagrus major</i> (page 8-31)
CHAPTER 3	A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream, <i>Pagrus major</i> (page 32-51)
CHAPTER 4	Identification and characterization of Rho-class glutathione S-transferase from zebrafish (<i>Danio rerio</i>) (page 52-61)
CHAPTER 5	Enhancing the tolerance of zebrafish (<i>Danio rerio</i>) to heavy metal toxicity by the expression of plant phytochelatin synthase (page 62-77)
CHAPTER 6	General conclusion (page 78-80)

【業績】

1) **Konishi, T.**, Kato, K., Araki, T., Shiraki, K., Takagi, M., Tamaru, Y.

Molecular cloning and characterization of Alpha-class glutathione S-transferase genes from the hepatopancreas of a red sea bream, *Pagrus major*. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.** (2005) 140, 309-320.

2) **Konishi, T.**, Kato, K., Araki, T., Shiraki, K., Takagi, M., Tamaru, Y.

A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream, *Pagrus major*. **Biochem. J.** (2005) 388, 299-307.

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)