

Title	植物由来ファイトケラチン合成酵素の解析と異種生物での発現
Author(s)	松本, 幸子
Citation	
Issue Date	2003-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/3019
Rights	
Description	Supervisor:高木 昌宏, 材料科学研究科, 修士

植物由来ファイトケラチン合成酵素の解析と異種生物での発現

松本 幸子

[背景・目的] ファイトケラチン (Phytochelatins; PC)

は $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}(n=2 \sim 11)$ を基本構造とし、重金属を捕捉・無毒化するペプチドである。ファイトケラチン合成酵素(Phytochelatinsynthase; PCS)は植物、藻類、酵母などに存在し、重金属イオンの曝露によりグルタチオン(GSH)を基質としてPCを合成する(図1)。このことから、PCはGSHより高い抗酸化能をもつ可能性がある。また、PCSのN末端領域は相同性が高く活性中心を含み、C末端領域は保存性が低くCys残基を7個以上含む。このことから、C末端領域はN末端触媒領域のレギュレーターとして機能している可能性がある。本研究では、植物 *Arabidopsis thaliana* 由来PCS遺伝子の異種生物における発現と重金属イオン耐性について調べ、さらにPCSの精製法の確立と活性化機構の解析を目的とした。

[実験・結果] 大腸菌 *E.coli*(BL21(DE3))、酵母 *S. cerevisiae*(INVSc1)にPCS遺伝子を導入し、PCSを誘導発現させた。それぞれについてカドミウム耐性を比較したところ、耐性が付与されていた。次に、大腸菌組換え体に高発現させたPCSを、様々な条件で検討した結果、オープンカラムDEAE(弱陰イオン交換クロマトグラフィー)、HitrapSP(強陽イオン交換クロマトグラフィー)、HitrapQ sepharose(強陰イオン交換クロマトグラフィー)に供することで精製法を確立し、精製したPCS活性をHPLCにより確認した。また、PCS活性に対するGSH濃度、カドミウム濃度、反応時間、保存条件の影響を解析した。その結果、合成されるPC鎖長は、カドミウム(ストレス)濃度

のみ依存することがわかった。さらに、カドミウムや酸素の共存によりPCS活性の保存性が高まったことから、重金属や酸化ストレスにより制御される機能部位の存在が示唆され、特にPCSのC末端アミノ酸配列に着目し、ストレス種によるCysの結合様式変化とそれに伴う機能変化を予想し、モデル(図2)を立案した。

[キーワード] ファイトケラチン、ファイトケラチン合成酵素、カドミウム

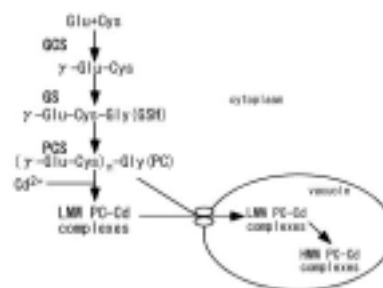


図1. PC合成・機能経路



図2. PCS C末端側機能モデル