

氏名	桑原 光彦		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	農学		
学位授与番号	博甲第 4279 号		
学位授与の日付	平成 23 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第 5 条第 1 項該当)		
学位論文の題目	キイロショウジョウバエ由来チオレドキシシン還元酵素の新規酸化還元モチーフの機能解析		
論文審査委員	教授 稲垣 賢二	教授 木村 吉伸	准教授 田村 隆

学位論文内容の要旨

セレンは食品中に含まれる微量必須元素であり、抗酸化作用や免疫賦活化作用等の生理活性を示し、疫学的研究からがん予防効果を持つと提唱されている。その一方で、セレン含有チオレドキシシン還元酵素 (TrxR) が肺がん細胞で高発現することが知られており、細胞のがん化とセレン代謝について不明な点が多い。哺乳類由来の TrxR は 53kDa (499 アミノ酸) サブユニット 2 量体構造を持つ。その C 末端配列 [-Gly-Cys-Sec-Gly (end)] の後ろから 2 番目にセレンを SeCys という特殊なアミノ酸残基の形で持っている。TrxR を遺伝子操作により人為的に高発現させるために SeCys498 を Cys に置換した Cys 型酵素は、野生型酵素の 0.1% 以下の活性 (<50mU/mg) に低下する。本研究では、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 由来 TrxR の触媒メカニズムを応用して Cys 型酵素の活性回復をはかり、TrxR の細胞内での機能を解析するための組換え型酵素の開発を目的とする。

まず、発現ベクター pQE30 を用いての組換え型 TrxR の大量発現系の構築を試みた。可溶化のための Trx タグを付加させずに発現させるため、この系ではタグ切断の必要なしに簡便に Ni カラムで精製ができる。pQE30 は T5 ファージ由来の強力なプロモーターを持つため、変異を起こして強力になったリプレッサーをコードする *lacI^q* 遺伝子をもっている大腸菌 NovaBlue を用いて発現させたが、僅かにしか目的の酵素を回収できなかった。組換え型 TrxR の発現には、pET32a ベクターを用いてチオレドキシシンタグを付加した融合蛋白質として発現させてアフィニティ担体で簡便に精製した後、エンテロキナーゼ処理によりタグを切り離す方法を確立した。

DmTrxR は SeCys 残基を持たないが高い酵素活性を示す。DmTrxR の活性には、C 末端の 4 アミノ酸配列 (-Ser-Cys-Cys-Ser-OH) が必須であると報告されているが、これをヒトの hTrxR に導入しても酵素活性は発現しなかった。そこで、分子軌道計算 MOPAC を用いて DmTrxR の酸化還元モチーフを探索した結果、2 残基上流まで含めた 6 アミノ酸配列 (Pro-X-Ser-Cys-Cys-Ser-OH) により酸化還元触媒として機能する可能性が示されたので hTrxR1 への導入を検討した。ヒト肺由来 TrxR1 遺伝子を発現ベクター pET32a に連結し、C 末端配列を上記の配列に改変した。ついで、0.3 mM IPTG 存在下で低温下、長時間 (18℃, 22h) の誘導を行い、精製した融合蛋白質の Trx タグ切断を経て目的蛋白質を調製した。PXSCCS 型酵素は DTNB を基質にした反応では、 A_{412} 値 1.26 mM, 比活性 434 mU/mg を示した。これは Pro を導入していない SCCS 型酵素 (比活性 50 mU/mg) と比較して、約 9 倍の比活性の上昇といえる。

MOPAC 計算によると、Pro 残基の疎水面がジスルフィド架橋形成を促進する効果を持つことが予測された。PXSCCS 型酵素は k_{cat} 値はセレン含有酵素よりも低い SeCys を持たない酵素は、人為的高発現が可能なので、研究用酵素としては有用と考えられる。さらに MOPAC 計算による DmTrxR の C 末端配列が取り得る安定な立体配座を解析した結果、4 つの立体配座 T-/T-'/C+/C- の内、C+フォームが最も安定であることが予測された。

論文審査結果の要旨

セレンは食品中に含まれる微量必須元素であり、抗酸化作用や免疫賦活化作用等の有益な生理活性を示す。哺乳類由来の TrxR は C 末端配列[-Gly-Cys-Sec-Gly(end)]中にセレノシステイン(Sec)を持つセレン酵素である。TrxR は分子レベルで詳細な反応機構研究が積み重ねられてきたが、細胞レベルでの機能解明に向けた研究は進展が乏しい。その主な要因として Sec 導入の翻訳過程は特殊な機構で制御されているので、組換え蛋白質として TrxR を細胞内で発現させることが困難であることが挙げられる。Sec を Cys に置換した Cys 型 TrxR は組換え蛋白質としての発現が可能であるが、その活性は野生型酵素の 0.1%以下である。ところがキイロショウジョウバエ由来のホモログ酵素 DmTrxR では、C 末端配列に Sec 残基を持たないがほ乳類 TrxR と同程度の触媒能を持つ。そこで本研究では、Dm TrxR の触媒メカニズムを解明し Sec を必要としないほ乳類 TrxR の開発に取り組んだ。

まず、発現ベクター pET32a を用いて組換え型 TrxR の大量発現系の確立を検討した。可溶化のための Trx タグ、アフィニティ担体による精製を目的とした His タグを融合した蛋白質として発現系を検討した。さらにこれらのタグをエンテロキナーゼ処理により切り離す方法を確立した。つぎに Dm TrxR の活性には、C 末端の 4 アミノ酸配列[-Ser-Cys-Cys-Ser(end)]の 2 つの Ser 残基が重要と報告されていたので、この配列をヒトの hTrxR に導入したが検出可能な酵素活性は発現しなかった。そこで、分子軌道計算 MOPAC を用いて Dm TrxR の酸化還元モチーフを探索した結果、さらに 2 残基上流まで含めた配列 [Pro-Ala-Ser-Cys-Cys-Ser(end)]が酸化還元活性を有する可能性が示されたのでこれら Pro 残基の導入を図った。その結果、ヒト肺由来 TrxR 1 は CTNB を基質にした反応では、 K_m 値 1.26mM、比活性 434mU/mg を示した。これは Pro を導入していない SCCS 型酵素（比活性 50mU/mg）と比較して、約 9 倍の比活性の上昇といえる。MOPAC 計算によると、Pro 残基の疎水面がジスルフィド架橋形成を促進する効果を持ち、Pro 残基は 2 つの Ser 残基と共に酸化型の C 末端配列が取り得る安定コンフォマーの中で C+型を最も有利にすることで酸化還元モチーフとして触媒サイクルを完結させることが示唆された。

上記の論文内容、発表会における応答を総合的に審査した結果、博士の学位に値するものと判断した。