



亜鉛結合タンパク質のモデルとしてのメタロチオネイン-3におけるサルフェン硫黄の役割

著者	イウンジエイ ディン
発行年	2020
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2019
報告番号	12102甲第9540号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00160975

氏名	Yunjie Ding		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 9540 号		
学位授与年月	令和2年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	亜鉛結合タンパク質のモデルとしてのメタロチオネイン-3におけるサルフェン硫黄の役割		
主査	筑波大学教授	医学博士	久武 幸司
副査	筑波大学准教授	博士（薬学）	大林 典彦
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	石井 一弘
副査	筑波大学助教	博士（医学）	渡邊 幸秀

論文の内容の要旨

Yunjie Ding 氏の博士学位論文は、メタロチオネイン-3におけるサルフェン硫黄の役割とその作用機構を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

（目的）

ヒトは生活環境、ライフスタイル及び食生活を介して酸化・親電子ストレスに日々曝されている。サルフェン硫黄は6個の価電子からなる硫黄原子で、他の硫黄原子に可逆的に結合したものを指し、高い抗酸化性および高い求核性を有する。また、サルフェン硫黄を有するシステインパーサルフィド (CysSSH) やグルタチオンパーサルフィド (GSSH) などの分子により、活性酸素種 (ROS) や親電子物質が不活性化されること及び新生ペプチドに導入する tRNA の合成酵素であるシステイン tRNA 合成酵素 (CARS) がシステイン (CysSH) を基質として CysSSH を生成することから、細胞内タンパク質中に CysSSH が広範に存在する可能性が示唆された。本論文で、著者はタンパク質結合性のサルフェン硫黄の機能を明らかにするために、生体内からサルフェン硫黄結合タンパク質 (SSBP) を同定し、その同定されたタンパク質をモデルとして、タンパク質におけるサルフェン硫黄の機能やサルフェン硫黄を介した生体防御システムの解明を試みている。

（方法）

著者は、マウス脳可溶性画分を各種カラムクロマトグラフィーにて分離し、得られた画分と親電子プローブである β -(4-hydroxyphenyl)ethyl iodoacetamide (HPE-IAM) を反応させ、生成した bis-S-HPE-IAM 付加体を UHPLC-ESI-MS/MS にて検出することで、SSBP を追跡している。タンパク質の同定には、nanoUPLC-MS^E を用い、大腸菌の高発現系を用いてリコンビナントタンパク質を調製している。金属の定量は ICP-MS にて行い、タンパク質の3次元構造モデリングには統合計算システム MOE を用いている。培養細胞での解析は、ヒトグリア芽細胞腫 U87 細胞で行っている。

（結果）

著者は、UHPLC-ESI-MS/MS によるサルフェン硫黄の定量法を用いて、マウス脳可溶性画分から複

数のSSBPの存在が観察し、最終的にSDS-PAGE上で16 kDaを示す高純度のタンパク質を得ている。当該タンパク質のトリプシン消化断片をnanoUPLC-MS^Eにて解析し、メタロチオネイン-3 (MT3) であると同定している。次にヒトリコンビナントMT3を調製し、本タンパク質中サルフェン硫黄を定量するための測定条件を最適化し、以下の結果を得ている。1) 分子内に20個のCysSH残基および7個の亜鉛(Zn)を有するMT3は約20個のサルフェン硫黄を含有する。さらに、MT3のCysSH残基のアラニン置換によりサルフェン硫黄の含有量は減少する。2) MT3およびZn非結合型のapo-MT3は共に同程度のサルフェン硫黄を含有するが、前者は37°Cで28日間安定的に保持された一方で、後者は3日以内に消失する。3) HPE-IAMまたはシアンイオン処置によりMT3中からサルフェン硫黄を除くと、MT3中のZnも同様に減少する。4) MT3をROSであるH₂O₂、NO誘発剤あるいは親電子物質であるメチル水銀と反応させると、曝露濃度依存的にサルフェン硫黄とZnは減少する。5) U87細胞をH₂O₂あるいは親電子物質の曝露条件化において、MT3のノックダウンにより細胞毒性は有意に増加し、逆にMT3の高発現でそれぞれの毒性は有意に減少する。6) MT3の3次元構造モデル解析を行うと、サルフェン硫黄が結合したMT3は、サルフェン硫黄非結合型のMT3と比較して、その3次元構造を維持したまま、熱安定性およびZn結合の親和性が共に高い可能性がある。

(考察)

本論文において、著者はMT3がSSBPであり、MT中CysSH残基と同程度のサルフェン硫黄が付加していることを明らかにしている。他の研究グループから種々のMT分子種に酸不安定な硫黄(硫化水素として検出)が付加していることが報告されているが、著者はMT3のCysSH変異体においてサルフェン硫黄の結合量は減少することを明らかにしている。MT3のZnがCysSH残基に結合することが知られているため、著者はCysSH残基に結合するサルフェン硫黄はZnの保持に関与するのではないかと考察している。リコンビナントMT3及びMOEを用いた解析により、MT3がタンパク質内にサルフェン硫黄を保持することでZn親和性が向上し、さらにZn非結合型のapo-MT3においては、サルフェン硫黄を安定的に保持することが難しいことから、著者はZnの結合がサルフェン硫黄にとって必要不可欠であり、MT3に結合するサルフェン硫黄とZnは相互依存の関係性にあるのではないかと推察している。サルフェン硫黄はCysSHの炭素鎖に結合した硫黄に比べて高い抗酸化性および求核性を有することより、著者は、実際にMT3結合性のサルフェン硫黄は酸化・親電子ストレスのモデルとしてのH₂O₂、NO誘発剤あるいはメチル水銀との反応により減少することを明らかにしている。また、同時に認められたZnの遊離は、細胞内においてはZnシグナルの活性化とそれに伴うストレス応答に関連する可能性を見出している。著者は、U87細胞での実験より、MT3はROS及び親電子物質に対して防御的に働くことを明らかにしているが、その理由として1)サルフェン硫黄の直接的な作用、2)Znシグナルを介した抗酸化・抗親電子制御の間接的な作用を考えている。MT3以外のZn結合タンパク質もサルフェン硫黄を保持できることが報告されているので、著者はサルフェン硫黄がそれらのタンパク質の機能にも重要な役割を果たしている可能性があるとして述べている。

(結論)

本論文において、著者はマウスの脳よりSSBPの1つとしてMT3を同定し、MT3の分子内に約20個のサルフェン硫黄および7個のZnを有することを見出している。また、MT3中のサルフェン硫黄とZnは相互依存の関係性にあり、MT3がサルフェン硫黄を結合することで抗酸化・抗親電子作用を有することを明らかにしている。

審査の結果の要旨

(批評)

本論文は、サルフェン硫黄結合タンパク質(SSBP)の1つとしてMT3を同定し、組換え体MT3を用いて、サルフェン硫黄とZnの結合状態及びMT3の抗酸化・抗親電子作用を明らかにしている。本論文は、MT3のみならず、他のSSBPについても一般化できる作用機構を明らかにしており、生体が酸化・親電子ストレスにいかに対応するかについて重要な知見を提示している。

令和元年12月23日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。