

## 学位論文題名

## Study on copper binding to plant glycine-rich proteins

(植物グリシンリッチ蛋白質の銅イオン結合の研究)

## 学位論文内容の要旨

生物は、外界からのさまざまなストレスにさらされながら生命を維持している。特に個体を移動させることができない植物は、乾燥ストレス、塩ストレス、温度ストレスなどの環境ストレスに応答し適応している。ストレス誘導蛋白質において、グリシンを豊富に含むグリシンリッチ蛋白質 (GRP) が知られている。植物の GRP は巨大なファミリーを形成し、細胞壁を強化する構造蛋白質と RNA 結合蛋白質の大きく 2 つに分類されている。しかしながら、GRP の機能および構造についてほとんど明らかにされていません。

本研究において、我々はこれまで細胞壁を強化する構造蛋白質であると考えられている *Atriplex canescens* のオゾン誘導蛋白質 (OI2-2, OI14-3)、*Cicer arietinum* の GRP1 と GRP2、*Medicago sativa* 由来の pSM2075、pUM90-1、CORa、*Pisum sativum* 由来の DRM2、*Fagus sylvatica* 由来の GRPF1 に着目した。配列解析から、これらの GRP はグリシンばかりではなく、ヒスチジンやチロシンも多く含む (His-, Gly-, Tyr-(HGY)リッチドメインと名づける)。また、この HGY リッチドメインはヘキサペプチドやヘプタペプチドなどのアミノ酸配列が連続して繰り返す配列 (タンデムリピート) をもつことを見出した。

植物 GRP の HGY リッチドメインに似た配列が、狂牛病の原因蛋白質、プリオン蛋白質にも存在する。プリオン蛋白質の HGY リッチドメインは、プロリン-ヒスチジン-グリシン-グリシン-グリシン-トリプトファン-グリシン-グルタミン (PHGGGWGQ) のオクタペプチドが 4 回繰り返したタンデムリピートからなる。興味あることに、このタンデムリピートは銅イオンと結合することが明らかにされた。したがって、植物 GRP の HGY リッチドメインも銅イオンと結合することが期待される。

プリオンのタンデムリピートの銅イオン結合は、このリピート配列に相当する比較的短い合成ペプチドの円偏光二色性 (CD)、核磁気共鳴法 (NMR)、電子スピン共鳴法などを用いて調べられている。そこで、本研究の目的は、さまざまな生物種からの植物 GRP に存在する HGY リッチドメインの配列に対応する比較的短いペプチドを合成し、それらの合成ペプチドと銅イオンの結合能を、CD および NMR を用いて調べることである。

オゾン誘導蛋白質 (OI2-2, OI14-3) の HGY リッチドメインは、YGHGGG が 8 回または 10 回繰り返している。そこで、HGGGY、HGGGYGH、YGHGGGY、YGHGGGYGHGGGY の 4 つのペプチドを合成した。可視領域の CD スペクトルを、銅イオンが存在するときと存在しない条件下で、pH 6.0 と pH 7.4 の両方で測定した。その結果、pH 7.4 においてのみ銅イオンが加えられた条件下で、300 nm 付近と 580 nm 付近に正の CD バンドが観測された。580 nm 付近の正の CD バンドは銅イオン錯体の形成によるものである。一方、300 nm 付近のバンドは電荷移動によるものである。これらの結果は、pH 7.4 において 4 つのペプチドすべてが銅イオンと結合することを示す。

また、可視領域の CD 測定による銅イオン滴定から、HGGGY、HGGGYGH、YGHGGGY は銅イオンと 2:1、YGHGGGYGHGGGY は 1:1 の化学量論比で結合することが示唆された。さらに、錯体の構造情報を得るために、ペプチド  $Y^1G^2H^3G^4G^5G^6Y^7$  の  $^1H$  NMR を行った。NMR

スペクトルの解析から、4つのグリシンを含めすべての残基を曖昧さなく連鎖帰属することができた。その結果、銅イオンの添加に伴い His3、Tyr1、Gly2、Gly4 の残基が、選択的にブロードされた。

*Ca*GRP (GRP1 と GRP2) は、NYGHGGG が繰り返している。そこで、NYGHGGGNYGN、HGGGNY、HGGGNYGN の3つのペプチドを合成した。オゾン誘導蛋白質の場合と同様な測定を行った。その結果、NYGHGGGNYGN において、pH 7.4 で銅イオンが加えられた条件下で、銅イオン錯体の形成の際に生じる d-d 遷移による正の CD バンドが 590 nm に観測された。また、正のバンドが 320nm に、負の CD バンドが 480 nm に観測された。

銅イオン滴定から、NYGHGGGNYGN は銅イオンと1:1の化学量論比で結合することが示唆された。したがって、NYGHGGGNYGN が一つの銅イオンとの結合単位であり、オゾン誘導蛋白質の YGHGGG の場合とは異なっている。NYGHGGGNYGN の 2D-TOCSY NMR 測定は、His4、Gly5、Asn8 および Asn11 の残基が配位に寄与することを示唆した。

*Ms*GRP (pSM2075, pUM90-1, CORA) と *Ps*DRM2 の HGY リッチドメインは、YHNGGGGYHN、YNHGGGGYNH、YNHGGGGYN の配列を含む。そこで、これらの3つのペプチドを合成した。オゾン誘導蛋白質および *Ca*GRP の場合と同様な測定を行った。その結果、YHNGGGGYHN において、pH 7.4 で銅イオンが加えられた条件下で、350 nm、506 nm、640 nm 付近に正の CD バンドが観測された。これらの結果は、明らかに、pH 7.4 においてこのペプチドが銅イオンと結合することを示す。一方、YNHGGGGYNH、YNHGGGGYN においては、銅イオン錯体の形成に生じる d-d 遷移による 650 nm 付近の正の CD バンドが観測された。加えて、350 nm に負のバンドと 530 nm に正のバンドが観測された。これらの結果は、明らかに pH 7.4 においてこのペプチドが銅イオンと結合することを示す。

銅イオン滴定から YHNGGGGYHN と YNHGGGGYNH は 1:2、YNHGGGGYN は 1:1、の化学量論比で銅イオンと結合することが示唆された。2D-TOCSY NMR 測定は、少なくとも His 残基のプロトンが銅イオン結合によりブロードされることを示した。

遠紫外領域の CD スペクトルは、二次構造の情報を与える。そこで、上述のペプチドすべての遠紫外 CD 測定を行った。YGHGGGY の CD スペクトルは、銅イオンの有無に関わらず 200 nm と 229 nm 付近に正のバンドを示した。NYGHGGGNYGN においては、銅イオンを加えると CD スペクトルが大きく変化し、1:1 で 207 nm と 226 nm 付近に正の CD バンドを示した。YHNGGGGYHN、YNHGGGGYNH、YNHGGGGYN は、230 nm 付近に正の CD バンドを示した。これらの結果は、二次構造が互いに異なることを示している。YGHGGGY は  $\beta$  ターン、NYGHGGGNYGN は左巻き  $\alpha$  ヘリックスの構造をとっていることが示唆される。

本研究から、次の点が明らかとなった。HGY リッチドメインをもつ GRP は銅結合蛋白質であることを示した。His のイミダゾール基および脱プロトン化した主鎖アミドが、銅イオンの配位に寄与する。銅錯体の形成に伴い、HGY リッチドメインは  $\beta$  ターンや左巻きの  $\alpha$  ヘリックス構造をとることが示唆される。植物 GRP の HGY リッチドメインは、新しい銅イオン結合モチーフである。銅結合蛋白質 GRP は、活性酸素のスカベンジャーあるいは銅イオンの貯蔵庫として機能している可能性がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 新 田 勝 利  
副 査 教 授 河 野 敬 一  
副 査 助 教 授 出 村 誠  
副 査 教 授 松 嶋 範 男

(札幌医科大学保健医療学部)

学 位 論 文 題 名

## Study on copper binding to plant glycine-rich proteins

(植物グリシンリッチ蛋白質の銅イオン結合の研究)

学位申請者は、植物グリシンリッチ蛋白質(GRP)の銅イオン結合の研究を行ってきた。審査会では学位論文に関する既公表論文が紹介され、研究の背景として、植物の GRP についての説明がされ、GRP が様々な植物において数多く存在し、現在、巨大なファミリーを形成していながらも、立体構造及び機能は、ほとんど明らかにされていないことが述べられた。続いて、GRP に存在するヒスチジン、グリシン、チロシン(HGY)リッチドメインについて説明され、HGY リッチドメインに類似した配列をもつプリオン蛋白質について説明された。プリオン蛋白質が銅イオンと結合することから、植物 GRP も同様に銅イオンに結合する可能性があることが述べられた。次に本研究の目的は、様々な生物種からの GRP に見出される HGY リッチドメインに対応するモデルペプチドを合成し、構造上の特徴、銅イオンとの結合能を調べてこの一群の蛋白質の構造・機能を明らかにすることにあることが述べられた。

本研究ではまず、ソルトブッシュ(*Atriplex canescenes*)のオゾン誘導蛋白質の銅イオン結合について扱っている。オゾン誘導蛋白質の一次構造が説明され、試料として合成ペプチドを用いたこと、方法として、円偏光二色性測定(CD)と核磁気共鳴分光測定(NMR)を行ったことが説明された。次にオゾン誘導蛋白質の部分配列として、Tyr-Gly-His-Gly-Gly(YGHGGG)のペプチドを用いた実験によって以下の結果が得られた。まず、遠紫外部 CD の結果からペプチドがタイプ II  $\beta$  ターン構造を取ることが示唆され、また、可視部 CD の結果から pH 7.4 においてペプチドが銅イオンと 2:1 で結合することが示された。また、銅イオン結合が pH 依存性を示し、NMR の結果から、配位に寄与する残基が示唆された。以上の結果から、可能な錯体のモデルが提案された。

次に、ヒヨコマメ(*Cicer arietinum*)の2つの GRP、GRP1 と GRP2 の銅イオン結合について研究された。これらの蛋白質の部分配列として Asn-Tyr-Gly-His-Gly-Gly-Gly-Asn-Tyr-Gly-Asn (NYGHGGGNYGN) のペプチドを用いた実験の結果が以下のように述べられている。遠紫外部 CD の結果から、銅イオンの結合により、ペプチドが左巻き  $\alpha$  ヘリックス構造を取ること、可視領域の CD から、pH 7.4 においてペプチドが銅イオンと1:1で結合することが示された。また、ソルトブッシュのオゾン誘導蛋白質と同様に、銅イオン結合の pH 依存性が示され、NMR から、配位に寄与する残基が推定され、可能な錯体モデルが提案された。

次に、ムラサキウマゴヤシ(*Medicago sativa*)とエンドウマメ(*Pisum sativum*)由来の4つの GRP の銅イオン結合について研究した。これらの蛋白質の部分配列として2種類のペプチドを用いた実験の結果が以下のように説明された。遠紫外部 CD の結果から、銅イオンの結合により構造形成を誘起することが示された。可視部 CD から、pH 7.4 においてペプチドが銅イオンと1:2で結合することが示され、NMRの結果から、ヒスチジン残基が配位に寄与することが示唆された。以上の結果から、可能な錯体モデルが提案された。

本研究は、次の点を明らかにした。HGY リッチドメインをもつ GRP は銅結合蛋白質である。ヒスチジン残基のイミダゾール基および脱プロトン化した主鎖アミドが、銅イオンの配位に寄与する。銅錯体の形成に伴い、HGY リッチドメインは  $\beta$  ターンや左巻きの  $\alpha$  ヘリックス構造をとる。植物 GRP の HGY リッチドメインは、新しい銅イオン結合モチーフである。銅結合蛋白質 GRP は、活性酸素のスカベンジャーあるいは銅イオンの貯蔵庫として機能している可能性があることが示唆される。

学位論文の公開発表の質疑応答では、申請者は自らの様々な実験経験や過去の参考文献等を引用し、豊富な知識に基づいて質問に明快に回答した。

以上のように申請者は、グリシンリッチ蛋白質のモデルペプチドの構造学的研究、銅イオンとの相互作用の構造学的研究を行う事で、これらの一群の蛋白質の機能、構造におけるいくつかの重要な知見を示した。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、申請者が北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格があるものと認定した。