

氏名	たまきひさのり 玉置尚徳
学位の種類	農学博士
学位記番号	農博第649号
学位授与の日付	平成3年1月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科食品工学専攻
学位論文題目	Studies on Yeast Glutathione S-Transferase (酵母のグルタチオンS-トランスフェラーゼに関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 枅倉辰六郎 教授 木村 光 教授 佐々木隆造

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文の著者は、グルタチオンを高濃度含有している酵母についてグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) の分布を調べ、GST 高活性株として選定した *Issatchenkia orientalis* について、生化学的及び遺伝子工学的手法を用いて研究し、本酵母におけるグルタチオン及び GST の役割と機能を解析している。本論文の主な内容は次のとおりである。

#### 1. GST の分布、誘導生成、安定化

(1)研究室保存の酵母168株についてスクリーニングを行なったところ、その78株に GST 活性が認められた。最も高い GST 活性を有していた *Issatchenkia orientalis* を優良株として選定した。(2) *I. orientalis* を GST の基質の1つである *o*-ジニトロベンゼン (DNB) の存在下で培養すると約48時間の lag が観察された。その後菌の増殖に伴い、GST 活性は誘導的に増大した。培養条件を検討した結果、グルタチオンの構成アミノ酸であるシステインとグリシンを各0.1%添加することにより、lag は24時間に短縮された。(3)本酵母の GST は非常に不安定であり、無細胞抽出液の状態では4°C、1週間の保存で活性は半減した。そこで安定化条件を検討し、20%グリセロール、1mMEDTA、10mM 亜硫酸ナトリウムの添加により、活性は少なくとも30日間安定に保持されることを見いだした。

#### 2. GST の精製と性質

本酵母の無細胞抽出液から、GST の精製を行なって2種のアイソザイムを単離し、それぞれ GST Y-1、GST Y-2 と命名した。GST Y-1、Y-2 は、HPLC を用いたゲルろ過及び SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果から、それぞれ分子量22,000、23,500のサブユニットからなるホモダイマーであった。両酵素について基本的性質を明らかにした。

#### 3. グルタチオン関連解毒代謝系の解析

DNB 存在下で本酵母を培養し、経時的にサンプリングして HPLC の C<sub>18</sub> 逆相カラムを用いて分析した。培地中の DNB は lag の後、本酵母が増殖するのに伴い急激に減少し、これと対応して増大する新しい物

質を認めた。本物質はS-(2-ニトロフェニル)システインと同定された。これらの事実から、グルタチオン抱合体であるS-(2-ニトロフェニル)グルタチオンはさらに代謝分解されることが示唆された。また同時に菌体内グルタチオン量の変化を測定し、DNBが培地中に存在する間は菌体内グルタチオンはすべてDNBのグルタチオン抱合に使われるものと考察した。

#### 4. GST Y-2の mRNA レベルでの誘導

GSTの誘導機構を解析する目的で、本酵母からmRNAを調製し、また<sup>35</sup>S-メチオニンを用いて、*in vitro*のタンパク質合成を行なった。その結果、DNB存在下の誘導菌体から得られたmRNAでは、タンパク質の総合成量が通常菌体由来のmRNAの場合に比べて1/3以下に減少していた。それにもかかわらず、GST Y-2の生合成量は、DNB誘導菌体のmRNAを用いると約37倍に増大しており、GST Y-2の誘導が転写レベルで行なわれていることが強く示唆された。

#### 5. GST Y-2の cDNA クローニング、塩基配列の決定、*E. coli*での発現

(1)DNB誘導菌体からGST Y-2 mRNAが濃縮されている各画分を調製した。この画分を用いてcDNAを合成し、pUC118をベクターとして*E. coli* DH5 $\alpha$ を形質転換しcDNAライブラリーを作成した。次いでGST Y-2のcDNAクローニングを行なった。(2)得られた陽性クローンのうちプラスミドpHT108を有する株は、1mM イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (IPTG)存在下で培養してGST活性を測定したところ、pUC118を有する対照株と比べて比活性で約28倍高い値を示した。(3)プラスミドpHT108は約650bpのcDNA断片を含んでおり、分子量約23,500のGST Y-2サブユニットをコードしていることが推定された。そこで本酵素の構造を解析するため、GST Y-2 cDNAの塩基配列の決定を行ない、本遺伝子が開始コドンと190アミノ酸残基をコードしていることを明らかにした。最後に、他起源のGSTとアミノ酸レベルでシークエンスを比較した。トウモロコシGST IとラットGST Y-2に対しては、比較したアミノ酸177残基、151残基について一致したアミノ酸は、それぞれ25%、21%であった。

### 論文審査の結果の要旨

グルタチオンは、生体内に最も高濃度に存在するチオール化合物であり、そのチオール基の持つ強い求核作用のため、親電子性の生体異物質と反応してこれをグルタチオン抱合体とすることにより無毒化する生理機能を有している。グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)は、このグルタチオン抱合反応を触媒する酵素であり、生体内解毒代謝に広く関与している。本酵素は生物界に広く分布し、高等動物では数多くのアイソザイムが単離されて諸性質が調べられており、植物や昆虫では農薬や殺虫剤に対する耐性との関連が研究されてきた。しかし、微生物に関しては、カビ (*Mucor* 属)と大腸菌の本酵素が調べられたのみである。酵母の本酵素を対象にした本論文で評価すべき主な点は次のとおりである。

1. 酵母におけるGSTの分布を明らかにしている。

2. GST高活性株として選定した *Issatchenkia orientalis* について培養条件を検討し、DNBのほかにシステインとグリシンを添加することによりGST活性が誘導的に増大することを見いだした。また酵素の安定化条件を明らかにした。

3. 本酵母の GST の精製を行なって 2 種のアイソザイム GST Y-1, Y-2 を単離し, それらの基本的性質を明らかにした。

4. グルタチオン関連解毒代謝系を解析し, 培地中の DNB が GST によりグルタチオン抱合体に変換され毒性を軽減された後さらに分解を受けて, 最終的に S-(2-ニトロフェニル) システインの形で細胞外に排泄されることを確認した。

5. DNB による GST Y-2 の誘導が mRNA レベルで行なわれることを指摘した。

6. DNB 存在下で培養した菌体から精製した poly(A)<sup>+</sup> RNA を用いて cDNA ライブラリーを構築し, GST Y-2 の cDNA クローンを行なった。得られた陽性クローニングのうちプラスミド pHT108 を保持している株は, IPTG を用いて誘導培養することにより pUC118 を保持している株に比べて, 比活性で約 28 倍高い GST 活性を発現していた。GST Y-2 cDNA の塩基配列を決定し, 他起源の GST とアミノ酸レベルで比較したところ, 相同性は低く, トウモロコシ GST I とラット GST Yb2 に対して一致するアミノ酸は, それぞれ 25%, 21% であった。

以上のように, 本論文は酵母のグルタチオン S-トランスフェラーゼに関して新知見を加えたもので, 微生物生産学, 食品生化学及び酵素化学に寄与するところが大きい。

よって, 本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお, 平成 2 年 12 月 6 日, 論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果, 農学博士の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。