

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570070

研究課題名（和文） バナジウムの濃縮機構と生理作用に関わる
金属タンパク質ネットワークの解析研究課題名（英文） Study on the network among metal-related proteins for
mechanisms and functions of vanadium ions.

研究代表者

植木 龍也 (UEKI TATSUYA)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：10274705

研究成果の概要（和文）：

本研究では高濃度にバナジウムを濃縮するスジキレボヤ *Ascidia sydneiensis samea* のバナドサイトおよび体腔における Vanabin を核とした金属タンパク質の相互作用および金属授受ネットワークの全貌を網羅的に解明することをめざして、既知のバナジウム結合タンパク質および金属輸送体について、バナドサイトから新規相互作用タンパク質を網羅的に探索するとともに、相互作用および金属の受け渡しの解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

In order to reveal protein-protein interaction network among Vanabins and metal-related proteins in vanadocytes and blood plasma in a vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea*, we performed the screening for proteins that interact with known vanadium-binding proteins, and analyzed protein-protein interaction and metal-binding and -transfer activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：動物生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：ホヤ、バナジウム、金属結合タンパク質、金属輸送体、タンパク質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

海産動物ホヤ類は稀少金属バナジウムを高選択的かつ高度に濃縮する。海水中に五価の陰イオン(VO_4^{3-})として存在するバナジウムは、ホヤの鰓や消化管から体腔内に入り、血球の一種であるバナジウム濃縮細胞(バナドサイト)の液胞中に取り込まれ、大部分が三価の陽イオン(V^{3+})として蓄積されている。蓄

積されたバナジウムの濃度は種によって生理的に決まっており、最大で 350mM に達するが、その生理的意義については未だ明らかではない。

我々の研究グループはスジキレボヤ *Ascidia sydneiensis samea* を主たる研究材料として、バナジウムの濃縮・還元機構に関与する遺伝子やタンパク質を数多く単離し機能解析を進めてきた。

一般的に生体内で金属タンパク質が働く場合には、他のタンパク質との直接相互作用、特に金属の受け渡しが行われる。バナジウム結合タンパク質 Vanabin を核として、相互作用タンパク質 VIP1、血漿タンパク質 VBP-129、バナジウム輸送体候補遺伝子 metal-ATPase や Nramp との相互作用についても解析を始めつつある段階である。その一方で、濃縮されたバナジウムの生理機能については未だ手がかりが得られていない。

2. 研究の目的

我々は、ホヤにおけるバナジウム濃縮・還元メカニズムを解明するとともに、濃縮されたバナジウムの生理的役割を明らかにする上で必須のステップとして、バナドサイトおよび体腔における Vanabin を核とした金属タンパク質の相互作用および金属授受ネットワークの全貌を網羅的に解明するべきであると着想した。本研究の研究目的は以下の3項目である。

- (1)我々がこれまでにスジキレボヤ *Ascidia sydneiensis samea* から単離した既知のバナジウム結合タンパク質および金属輸送体について、相互作用および金属の受け渡しがあるか否かを明らかにする。
- (2)それら金属タンパク質をプローブとして two-hybrid 法によりバナドサイト cDNA ライブラリーから新規相互作用タンパク質を網羅的に探索する。
- (3)得られたタンパク質について、発現解析および配列情報から予測される機能解析を行い、バナドサイトおよび体腔における金属タンパク質の相互作用および金属授受ネットワークの全貌を解明する。

3. 研究の方法

本研究では以下の5つの方法で行った。研究に使用した既知のバナジウム結合タンパク質および金属輸送体については、濃縮還元経路とともに、図1にまとめた。

- (1) 既知のバナジウム結合タンパク質および金属輸送体についての構造・機能解析。
- (2) 既知のバナジウム結合タンパク質および輸送体の相互作用の解析と金属授受解析。
- (3) 新規相互作用タンパク質の網羅的スクリーニング。
- (4)得られた遺伝子について塩基配列の決定と全長クローニング。
- (5)スクリーニングで得られた新規タンパク質の発現解析と機能解析。

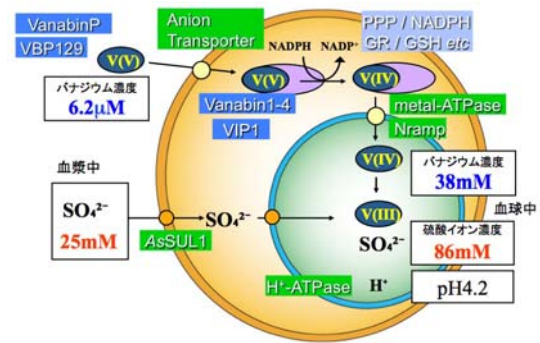


図 1. スジキレボヤのバナジウム濃縮還元経路と、既知のバナジウム結合タンパク質および金属輸送体。

4. 研究成果

以下の9項目の研究成果が得られた。このうち(5)(6)は雑誌論文として発表済み、(1)(3)(9)は投稿準備中である。(2)(3)(4)はさらに発展的研究を計画中である。

- (1) スジキレボヤおよびヒトの metal-ATPase の細胞内金属結合ドメインを取り出して組み換えタンパク質を作成した。両者の金属選択性およびタンパク質間相互作用を比較した。バナジウム結合能が metal-ATPase に普遍的な性質であると示唆された。
- (2) Vanabin1-4 および VBP-129 の組み換えタンパク質を作成し、ゲル濾過および金属固定化カラムによってバナジウム結合能を調べた。Vanabin4 から Vanabin2 への金属受け渡しを示唆する結果が得られた。
- (3) VBP-129 の欠失変異体および点突然変異体を作成し、バナジウム結合および VanabinP との相互作用に必須のドメインをそれぞれ同定した。
- (4) スジキレボヤ血球から、2種類のネイティブ型 Vanabin-Interacting Protein (VIP1)の精製を試みた。生理・環境条件によってその存在比が変動することを見出した。また、ウェスタンブロット法によるVIP1の組織局在と発現変動に関する解析を行った。
- (5) Vanabin2 について、リジン・アルギニン・システイン残基に変位を導入したコンストラクトを作成し、構造安定性と金属結合能の相関関係を解析した。高親和性部位を特定した。



図 2. Vanabin2 変異体の金属結合能(IMAC 解析の結果)。

	K_d	N_{max}
野生型Vanabin2	30 μ M	19
K10A/R60A 領域1	180 μ M	(19)
K24A/K38A/R41A/R42A 領域2	18 μ M	9

図 3. Vanabin2 変異体の金属結合能 (Hummel-Dreyer 解析の結果)。

(6) Nramp について、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた金属輸送能の解析を行った。pH 依存的で Na によって阻害される四価バナジウム輸送能を確認した。ラットのホモログ DCT1 には同様の活性はみられず、ホヤ Nramp に特有の機能であることがわかった。

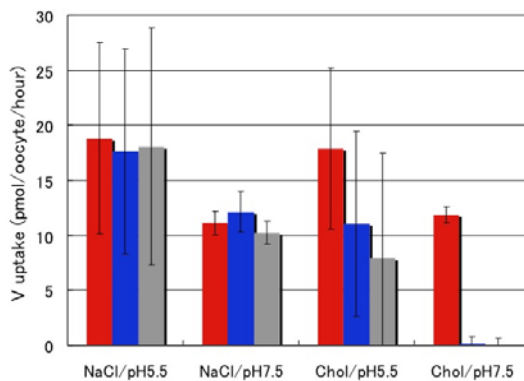


図 4. 四価バナジウム輸送能の解析結果。Nramp(赤)、rat DCT1(青)、コントロール(灰)。

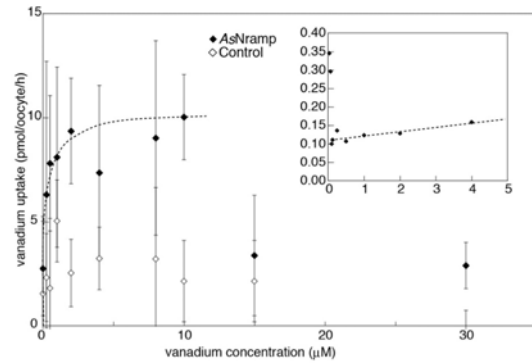


図 5. Nramp の四価バナジウム輸送能のカイネティクス解析結果。

- (7) スジキレボヤ血球から mRNA を抽出し、その cDNA をターゲットベクター pBT に組み込んだ cDNA ライブラリーの作成した。スクリーニングに十分な数の独立クローンが得られるまで、繰り返し形質転換を行った。
- (8) Vanabin1-4, VanabinP, VIP1, VBP-129 および Nramp, metal-ATPase をベイトとして、two-hybrid 法による相互作用タンパク質のスクリーニングを行った。
- (9) 得られた新規タンパク質のうちの一つ、バナジウム結合タンパク質 Ag-151 の詳細な機能解析を行った。組換えタンパク質を作製し、金属選択性と酵素活性、相互作用を検証した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- Ueki, T., Furuno, N., Michibata, H. (2011) A novel vanadium transporter of the Nramp family expressed at the vacuole of vanadium-accumulating cells of the ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. *Biochim. Biophys. Acta* 1810: 457-464. 査読有り
- Ueki, T., Michibata, H. (2011) Molecular mechanism of the transport and reduction pathway of vanadium in ascidians. *Coord. Chem. Rev.*, in press. 査読有り
- Michibata, H., Ueki, T. (2010) Advances in research on the accumulation, redox behavior, and function of vanadium in ascidians. *Biomol. Concep.* 1: 97-107. 査読有り
- Ueki, T., Kawakami, N., Toshishige, M., Matsuo, K., Gekko, K., Michibata, H. (2009) Characterization of vanadium-binding sites of the vanadium-binding protein Vanabin2 by

site-directed mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1790: 1327-1333. 査読有り

5. Ueki, T., Furuno, N., Xu, Q., Nitta, Y., Kanamori, K., Michibata, H. (2009) Identification and biochemical analysis of a homolog of a sulfate transporter from a vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. *Biochim. Biophys. Acta* 1790: 1295-1300. 査読有り
6. Kawakami, N., Ueki, T., Amata, Y., Kanamori, K., Matsuo, K., Gekko, K., Michibata, H. (2009) A novel vanadium reductase, Vanabin2, forms a possible cascade involved in electron transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 1794: 674-679. 査読有り
7. Ueki, T., Satake, M., Kamino, K., Michibata, H. (2008) Sequence variation of Vanabin2-like vanadium-binding proteins in blood cells of the vanadium-accumulating ascidian *Ascidia sydneiensis samea*, *Biochim. Biophys. Acta* 1780: 1010-1015. 査読有り

[学会発表] (計 32 件)

1. Ueki, T., Michibata, H. Molecular mechanism of the transport and reduction pathway of vanadium in ascidians. 招待講演. 第7回国際バナジウム化学生物学シンポジウム, 富山. 2010年10月8日. 招待講演.
2. Samino, S., Ueki, T., Michibata, H. Expressed sequence tag (EST) analysis of the intestine from the most vanadium-rich ascidian *Ascidia gemmata*, and their application to heavy metal biosorption system. 第7回国際バナジウム化学生物学シンポジウム, 富山. 2010年10月8日.
3. Kimizu, T., Ueki, T., Michibata, H. Measurement and comparison of V(V)-reductase activity of Vanabin family of a vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. 第7回国際バナジウム化学生物学シンポジウム, 富山. 2010年10月8日.
4. Kume, S., Ueki, T., Michibata, H. Identification of genes regulated by excess vanadium ions in ascidians, focusing on redox and accumulation of metals. 第7回国際バナジウム化学生物学シンポジウム, 富山. 2010年10月8日. ポスター賞受賞.
5. Michibata, H., Ueki, T. A novel vanadium reductase, Vanabin2, forms a possible cascade involved in electron transfer. 第14回国際生

物無機化学会, 名古屋, 2009年7月25日.

6. Ueki, T., Michibata, H. A novel vanadium transporter of the Nramp/DCT family from a vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. 第14回国際生物無機化学会, 名古屋, 2009年7月25日.
7. Ueki, T., Michibata, H. Protein-protein interactions among vanadium-binding proteins and related proteins in a vanadium-rich ascidian. 第6回国際バナジウムシンポジウム, リスボン(ポルトガル), 2008年7月17日.

他 25 件

[図書] (計 1 件)

1. Ueki, T., Michibata, H. Vanadium compounds/vanadate oligomers in biological systems: Chemistry, biochemistry and biological effects Research Signpost Inc, 2008年, 総ページ数 356 ページ.

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/bio/APN/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植木 龍也 (UEKI TATSUYA)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 10274705

(2) 研究分担者

()

(3) 連携研究者

()