

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月1日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570077

研究課題名（和文） Vanabinが共役する新規電子伝達カスケードの解析

研究課題名（英文） Analysis on the electron transfer cascade coupled by Vanabin2

## 研究代表者

道端 齊（MICHIBATA HITOSHI）

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：00111740

## 研究成果の概要（和文）：

アスキジア科のホヤは高選択的に遷移金属の一種バナジウム(V)イオンを最大 350mM に濃縮し、その大部分を三価に還元している。最近、Vanabin2 はグルタチオン(GSH)が共存すると五価Vイオンを四価に還元する新規の metal redox タンパク質であると考えに至った。本研究では、ホヤの Trx/Grx 系の探索を行い、NADPH、グルタチオン還元酵素(GR)、GSH、Trx/Grx、Vanabinに至る一連のカスケードが、SH-SS 交換反応を介して電子伝達を行い、Vの酸化・還元反応に共役していることを実証した。

## 研究成果の概要（英文）：

Ascidians belonging to the class Ascidiidae accumulate a transition metal vanadium (V) ions up to 350 mM, and reduce most of the accumulated V. Recently we found that Vanabin2 can act as a V(V)-reductase in the presence of glutathione (GSH). In this study, we identified Trx/Grx genes in ascidians and examined the redox cascade composed of NADPH, glutathione reductase (GR), GSH, Trx/Grx, and Vanabin and found that this redox cascade functions as coupled with SH-SS exchange reactions.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

## 研究分野：生理化学

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、酸化還元、グルタチオン、金属結合タンパク質、システイン

## 1. 研究開始当初の背景

アスキジア科のホヤは高選択的に遷移金属の一種バナジウム(V)イオンを濃縮する。その濃度は最大、海水のV濃度の1,000万倍( $10^7$ )に相当する350mMに達し、濃縮された五価Vイオンは四価を経て三価に還元される。

最近、グルタチオン(GSH)存在下でVanabin2のジスルフィド(SS)がthiol(RSH)に還元され、その結果9対のSS結合が開裂することを発見した。Vanabin2とGSHが共存すると五価Vイオンが四価に還元されることを見だし、Vanabin2は新規の metal redox タンパク質であると考えに至った。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、NADPH、グルタチオン還元酵素(GR)、GSH、Trx (thioredoxin) / Grx (glutaredoxin)、Vanabin に至る一連のカスケードが、SH-SS 交換反応を介して電子伝達を行い、V の酸化・還元反応に共役していることを実証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) PCR 法によって、スジキレボヤとカタユウレイボヤの cDNA ライブラリーから酸化還元・電子伝達系の遺伝子の網羅的探索を行った。

(2) マイクロアレイ法を用いて、V イオンの添加に反応する遺伝子群を探索した。

(3) RT-PCR 法によって、得られた遺伝子のカタユウレイボヤ主要器官における発現を調べた。

(4) 得られた遺伝子の組換えタンパク質を作成し、電気泳動移動度検定法、ESR 法および紫外分光法によって、*in vitro* でのカスケード実証を行った。

## 4. 研究成果

### (1) Trx/Grx 系の酵素群と redox タンパク質

スジキレボヤとカタユウレイボヤの cDNA ライブラリーから酸化還元・電子伝達系の遺伝子とタンパク質チオレドキシシン Trx およびチオレドキシシン還元酵素 TrxR、グルタレドキシシン Grx の網羅的探索を行った。

また、カタユウレイボヤのマイクロアレイを用いて V イオンの添加に反応する遺伝子群を探索した。Fe や Cu イオンの添加に反応する遺伝子群も同様に網羅的に探索した。

得られたタンパク質・遺伝子の組織局在(特にバナドサイトに局在するか否か)を RT-PCR と免疫学的手法で明らかにした。

### (2) Trx 系と Vanabin の還元カスケード

スジキレボヤの Trx1 (AsTrx1) と TrxR2 (AsTrx2) の全長をクローニングし、それらの組み換えタンパク質を作成した。

AsTrx1 のシステイン残基の酸化還元状態と中間体形成について、移動度検定法によって解析した。一定濃度の還元剤存在下で中間体を形成することを見出した。

AsTrx1 は Vanabin2 のジスルフィドをチオールに還元することと AsTrx1 存在下で

Vanabin2 が五価バナジウムを四価に還元することが分かった。

### (3) 金属イオンの酸化還元反応の化学量論的解析

Vanabin2 による五価 V の四価への還元は、生体濃度の 1mM GSH 共存下で起こる室温反応で 50  $\mu$ M Vanabin2 で 1mM V(V) の 30% が還元される。この還元反応が 100% 進むための化学量論的解析は進行中である。

### (4) 金属イオンの酸化還元機構と共役する Vanabin の SS 結合部位の特定

Vanabin2 の 9 対の SS 結合のうち、金属イオンの還元に直接関与するクリティカルな部位はどこかを明らかにするために、部位特異的変異体を作製した。各システインをセリンにそれぞれ置換した変異体を作製し、それらを用いて金属イオンの還元に必要な部位を特定した。一部の変異体では還元反応活性が上昇することがわかった。

### (5) Vanabin を含む還元カスケードによる種々の遷移金属の還元

二価銅、二価マンガン、三価鉄、二価コバルト、二価亜鉛の還元反応を検証した。バナジウム以外のこれら遷移金属イオンの還元反応は認められなかった。

### (6) GSH 合成経路の酵素群の遺伝子発現調節

マイクロアレイと RT-PCR および酵素活性測定によって GSH 合成経路の酵素群の遺伝子発現調節を検証した。これら酵素群の発現・活性とバナジウム濃縮とが密接につながっていることを見出した。また MRP 遺伝子の発現も同様の調節を受けることを見出した。

## 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)

1. S. Samino, H. Michibata and T. Ueki. Identification of a novel vanadium-binding protein by EST analysis on the most vanadium-rich ascidian, *Ascidia gemmata*. Mar. Biotechnol., 14, 143-154 (2012). 査読有り (DOI 10.1007/s10126-011-9396-1)
2. T. Ueki, N. Furuno and H. Michibata. 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 (2011) 査読有り (DOI 10.1016/j.bbagen.2010.12.006).
3. T. Ueki and H. Michibata. Molecular mechanism of the transport and reduction pathway of vanadium in ascidians. *Coord. Chem. Rev.*, 255, 2249-2257 (2011). 査読有り (DOI 10.1016/j.ccr.2011.01.012)
4. H. Michibata and T. Ueki. Advances in research on the accumulation, redox behavior, and function of vanadium in ascidians. *Biomol. Concep.* 1, 97-107 (2010). 査読有り (DOI 10.1515/BMC.2010.003)
5. N. Kawakami, T. Ueki, Y. Amata, K. Kanamori, K. Matsuo, K. Gekko, and H. Michibata. A novel vanadium reductase, Vanabin2, forms a possible cascade involved in electron transfer. *Biochim Biophys Acta*, 1794, 674-679 (2009). 査読有り (DOI 10.1016/j.bbapap.2009.01.007)
6. T. Ueki, N. Furuno, Q. Xu, Y. Nitta, K. Kanamori and H. Michibata. 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 (2009). 査読有り (DOI 10.1016/j.bbagen.2009.04.001)
7. T. Ueki, N. Kawakami, M. Toshishige, K. Matsuo, K. Gekko and H. Michibata. Characterization of vanadium-binding sites of the vanadium-binding protein Vanabin2 by site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1790, 1327-1333 (2009). 査読有り (DOI 10.1016/j.bbagen.2009.05.016)

[学会発表] (計 29 件)

1. 植木龍也. バナジウム結合タンパク質 Vanabins : 構造と金属結合および還元活性. 第 25 回海洋生物活性談話会 2011 年 10 月 8 日. 東京大学臨海実験所(三崎市).
2. 植木 龍也. バナジウムボヤ消化管から抽出された新規バナジウム結合タンパク質. 日本動物学会第 82 回大会. 2011 年 9 月 20 日. 旭川市.
3. 上梶昌幸. ホヤの五価バナジウム酸化還元カスケードの解析. 2011 年度中国四国動物生理シンポジウム. 2011 年 9 月 2 日. 周防大島町.
4. 山本草平. Vanabin2 ジスルフィド結合変異体の還元酵素活性. 2011 年度中国四国動物生理シンポジウム. 2011 年 9 月 2 日. 周防大島町.
5. 中川貴文. バナジウム結合タンパク質 VBP-129 の欠失変異体作成と金属結合能の解析. 2011 年度日本動物学会中国四国支部大会. 2011 年 5 月 14 日. 高松市.
6. 上梶昌幸. バナジウム結合タンパク質 Vanabin family の五価バナジウム還元能の解析. 2011 年度日本動物学会中国四国支部大会. 2011 年 5 月 14 日. 高松市.
7. 久米悟士. バナジウム暴露で発現が制御されるカタユウレイボヤの遺伝子解析. 2011 年度日本動物学会中国四国支部大会. 2011 年 5 月 14 日. 高松市.
8. T. Ueki. Molecular mechanism of the transport and reduction pathway of vanadium in ascidians. 第 7 回国際バナジウム化学・生物学シンポジウム(招待講演). 2010 年 10 月 8 日. 富山市民プラザ(富山市).
9. S. Samino. 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. 2010 年 10 月 8 日. 富山市民プラザ(富山市).
10. T. Kimizu. 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. 2010 年 10 月 8 日. 富山市民プラザ(富山市).
11. S. Kume. 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. 2010 年 10 月 8 日. 富山市民プラザ(富山市). 最優秀ポスター賞受賞.
12. 久米悟士. カタユウレイボヤにおいてバナジウム添加で発現が制御される遺伝子の解析. 生物系三学会中国四国支部大会. 2010 年 5 月 15 日. 山口大学(山口市).
13. 大渡健太. バナジウム暴露による MRP (multidrug resistance protein) 遺伝子の発現変動. 生物系三学会中国四国支部大会. 2010 年 5 月 15 日. 山口大学(山口市).
14. 上梶昌幸. スジキレボヤ血球細胞におけるチオレドキシ系酵素群の遺伝子クローニング. 生物系三学会中国四国支部大会. 2010 年 5 月 15 日. 山口大学(山口市).
15. 久米悟士. バナジウムによって発現制御されるカタユウレイボヤ遺伝子の解析、特にグルタチオン代謝の変化について. 第 24 回海洋生物活性談話会. 2010 年 6 月 5 日. 竹原市.
16. S. Samino. Expressed Sequence Tag (EST) Analysis of Intestine from the most Vanadium-rich Ascidian, *Ascidia gemmata*,

and the Identification of AgVanabins. 第24回海洋生物活性談話会. 2010年6月5日. 竹原市.

17. 植木 龍也. スジキレボヤから単離したバナジウム輸送体Nrampの機能解析. 第24回海洋生物活性談話会. 2010年6月5日. 竹原市.

18. 足立知基. トランスポゾン挿入ミュータジェネシスによるバナジウム濃縮に関連するホヤ変異体の探索. 第24回海洋生物活性談話会. 2010年6月5日. 竹原市.

19. 木水朋也. バナジウム結合タンパク質Vanabinファミリーの五価バナジウム還元能の解析. 中国・四国動物生理シンポジウム. 2010年9月3日. 高知大学研修所(土佐市).

20. 植木龍也. Nrampファミリーの新規バナジウム/プロトン共役輸送体. 日本生化学会第82回大会. 2009年10月21日. 神戸ポートアイランド(神戸市).

21. 久米悟士. バナジウム添加で発現制御されるカタユレイボヤの酸化還元遺伝子. 日本生化学会第82回大会. 2009年10月21日. 神戸ポートアイランド(神戸市).

22. 中川貴文. バナジウム結合タンパク質VBP-129におけるバナジウム結合部位. 日本生化学会第82回大会. 2009年10月21日. 神戸ポートアイランド(神戸市).

23. 植木龍也. スジキレボヤ由来のNrampによる四価バナジウム輸送. 日本動物学会第80回大会. 2009年9月17日. グランシップ(静岡県).

24. H. Michibata. 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(招待講演). 2009年7月25日. 名古屋国際会議場(名古屋市).

25. T. Ueki. A Novel Vanadium Transporter of the Nramp/DCT Family from a Vanadium-Rich Ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. 2009年7月25日. 名古屋国際会議場(名古屋市).

26. 植木龍也. スジキレボヤ血球における硫酸イオンの役割と膜輸送体. 第23回海洋生物活性談話会. 2009年5月23日. 三崎臨海実験所(三崎市).

27. 植木龍也. バナジウム結合タンパク質Vanabinファミリーによるバナジウム還元能の解析. 生物系三学会大会中国四国支部・高知大会. 2009年5月16日. 高知大学(高知市).

28. 久米悟士. バナジウム暴露で発現が制御されるカタユレイボヤの遺伝子解析. 生物系三学会大会中国四国支部・高知大会. 2009年5月16日. 高知大学(高知市).

29. 中川貴文. バナジウム結合タンパク質VBP-129の金属選択性に関する解析. 生物系三学会大会中国四国支部・高知大会. 2009年

5月16日. 高知大学(高知市).

[図書] (計1件)

1. H. Michibata 編. Vanadium - Biochemical and Molecular Biological Approaches. 228 pages. Springer UK (2012).

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

道端 齊 (MICHIBATA HITOSHI)  
広島大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 00111740

### (2) 研究分担者

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

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: