

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。