

学位論文題名

Studies on Substituted Metallothionein at the Conserved Serine - 32 and - 35 to Leucine Residues by Site - directed Mutagenesis in *Escherichia coli*

(大腸菌における遺伝子部位変異法による、保存されたセリン-32と-35をロイシンに置換したメタロチオネインに関する研究)

学位論文内容の要旨

メタロチオネインはカドミウムや亜鉛、銅などの重金属と結合する、分子量6500から7000の低分子量蛋白質であり、その重金属結合能により有害重金属の解毒、必須微量元素の恒常性の維持などの生理作用を持つと考えられている。また最近メタロチオネインはアルツハイマー病に深く関与している蛋白質として注目されている。

哺乳類のメタロチオネインは、61又は62のアミノ酸残基より構成されており、システイン残基(Cys)が全アミノ酸残基の約1/3を占めている。重金属の結合はこれらシステイン残基を介して行われておりカドミウムの場合、メタロチオネイン一分子当たり、7個のカドミウム原子が結合していることが明らかとなっている。

システイン残基に次いで多いセリン残基(Ser)は7個から10個存在している。これらのセリン残基の大部分はシステイン残基の近傍に位置し、-Cys-Ser-Cys-, -Ser-Cys-Cys-Ser-Cys-Cys-などの特徴的なアミノ酸配列を構成している。さらに重金属と結合しているシステイン残基の近傍に存在しているセリン残基はアミノ酸配列上の位置が長い進化の過程で変化を受けていない。一方セリン残基は側鎖に水酸基をもっていることより、親水性のアミノ酸残基であり、酵素などでは活性中心部位に存在し活性に大きな役割をはたしている場合があり、重要な働きをしているアミノ酸残基である。これらのことよりシステイン残基の近傍に位置し、保持されているセリン残基がメタロチオネインの重金属結合能、生理作用ならびに立体構造の維持などにどのような役割を果たしているかに興味もたれている。

本論文では、これらのセリン残基の果たす役割を明らかにすることを目的として、これらセリン残基を他のアミノ酸残基に置き換えるいわゆるミュータント・メタロチオネインを作成し、そ

の性質を述べた。置き換えたセリン残基は32番目と35番目のセリン残基で哺乳類のメタロチオネインの場合、完全に保持されている位置にあり、また - Ser - Cys - Cys - Ser - Cys - Cys - の配列中に存在し、セリン残基の役割を解明する上で一番適していると考えられた。セリン残基を置き換えるアミノ酸残基として、側鎖に水酸基をもたず、疎水性が高く側鎖の立体構造の少し大きなロイシン残基を選んだ。

本論文の構成と内容を以下に示す。

序論では、本研究の経緯と目的について述べた。

方法では、セリン残基を置換したミュータント・メタロチオネインの合成遺伝子を我々が開発したメタロチオネイン発現系に組み込み、発現させる遺伝子工学的手法、その発現蛋白質の精製について述べた。ミュータント・メタロチオネインの合成遺伝子はヒト・メタロチオネインⅡ_A型の遺伝子をベースとし、32番目と35番目のセリン残基をコードするコドン AGC と TCC をロイシン残基をコードするコドン CTG に置き換えたものを DNA 合成機で合成させた。この合成遺伝子をメタロチオネイン発現遺伝子に組み込み、大腸菌に入れ、カドミウムを含む培地中でミュータント・メタロチオネインを発現させた。大腸菌の集菌・超音波破碎、遠心分離による大腸菌の上清画分をミュータント・メタロチオネインの精製出発材料とした。

結果では、ミュータント・メタロチオネインの精製、そのアミノ酸組成および分光学的性質を提示した。ミュータント・メタロチオネインを発現させた大腸菌の上清画分のイオン交換体吸着画分のゲルろ過の結果、カドミウムを含む3つのピークが得られた。490-560nmに溶出してくるカドミウムを含むピークは280nmの吸収が非常に低く通常のメタロチオネインと溶出する位置がほぼ同じであることよりミュータント・メタロチオネインと考えられるので、このピークを集めさらにイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。イオン交換クロマトグラフィーの結果、カドミウムを含む単一のピークが得られた。この画分のアミノ酸分析の結果は高いシステイン残基の含有量、また同時に行ったヒト・メタロチオネイン2型の結果と比較しミュータント・メタロチオネインではセリン残基の含有量の低下、ロイシン残基の増加を示した。また中性および酸性条件下でのミュータント・メタロチオネインの紫外部のスペクトルは中性条件下において245-255nmに肩を示し、酸性条件下ではその肩は消失した。

考察では、セリン残基を置換したミュータント・メタロチオネインにカドミウムが含まれ、そのカドミウムはシステイン残基と結合していることを明らかにした。

セリン置換ミュータント・メタロチオネインは以下のような性質を持つと考えられる。まず61のアミノ酸残基より構成されアミノ酸組成はシステイン残基の高い含有量、またヒト・メタロチ

オネイン2型と比較してセリン残基の含有量が減少し、ロイシン残基の含有量が増加する。次に分子量は一次構造より計算すると、重金属と結合していない状態で6094、カドミウムが7個結合している状態で6881となる。さらにミュータント・メタロチオネインの分光学的性質は、芳香族アミノ酸残基がないことより、280nmの吸収を持たない。またカドミウムとの結合がメタロチオネインと同様にシステイン残基によって行われているのであれば Kági ら (1961) や Vašák ら (1981) が述べているように、中性条件下での紫外部のスペクトルは、カドミウム-メタロチオネインの特長である245-255nm に肩を持ち、酸性条件下ではカドミウムが解離しこの245-255nm の肩が消失する。

これらの性質は実験結果と合致しており、セリン残基置換ミュータント・メタロチオネインはカドミウムと結合していることが証明された。

本研究より、現在まで興味を持たれていたが、ほとんど研究のなされていなかったメタロチオネイン中の相同性の高いセリン残基の役割を解明するために、セリン残基を置き換えたミュータント・メタロチオネインを得ることに初めて成功した。本研究において、セリン残基を置換したミュータント・メタロチオネインが大腸菌内で発現されカドミウムと結合するという事実を得られた。さらに、このミュータント・メタロチオネインを用いることによりセリン残基の役割をさらに解明することができると期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	小島	豊
副査	教授	齋藤	和雄
副査	教授	保原	喜志夫
副査	教授	道	幸哲也
副査	教授	黒柳	俊雄

メタロチオネインは重金属と結合する、低分子量蛋白質であり、その重金属結合能により有害重金属の解毒、必須微量金属の恒常性の維持などの生理作用を持つと考えられている。

哺乳類のメタロチオネインは、61又は62のアミノ酸残基より構成されており、システイン残基(Cys)が全アミノ酸残基の約1/3を占めている。重金属はこれらシステイン残基を介して結

合しており、カドミウムの場合、メタロチオネイン一分子当たり、7個のカドミウム原子が結合していることが明らかとなっている。

システイン残基に次いで多いセリン残基(Ser)は7個から10個存在している。これらのセリン残基の大部分はシステイン残基の近傍に位置し、-Cys-Ser-Cys-, -Ser-Cys-Cys-Ser-Cys-Cys-などの特徴的なアミノ酸配列を構成している。さらに、これらセリン残基はアミノ酸配列上の位置が長い進化の過程で変化を受けておらず、相同性の高いことが知られている。またセリン残基は親水性のアミノ酸残基であり、酵素などでは活性中心部位として大きな役割をはたしており、生理学的に重要な働きをしているアミノ酸残基である。これらよりシステイン残基の近傍に位置し、進化の上でよく保持されているセリン残基がメタロチオネインの重金属結合能、生理作用ならびに立体構造の維持などにどのような役割を果たしているかに興味もたれている。

本論文では、これらのセリン残基の果たす役割を明らかにすることを目的として、これらセリン残基を他のアミノ酸残基に置き換えるいわゆるミュータント・メタロチオネインを作成し、その性質を述べた。置き換えたセリン残基は32番目と35番目のセリン残基で哺乳類のメタロチオネインの場合、進化の上で完全に保持されてきた位置にあり、また-Ser-Cys-Cys-Ser-Cys-Cys-の配列中に存在し、セリン残基の役割を解明する上で最適であると考えられた。セリン残基を置き換えるアミノ酸残基として、側鎖に水酸基をもたず、疎水性が高く側鎖の立体構造の少し大きなロイシン残基を選んだ。

このセリン残基をロイシン残基に置換したミュータント・メタロチオネインを、遺伝子工学的手法を用いて、カドミウムを含む培地中で、大腸菌内に発現させた上精製した。ミュータント・メタロチオネインの合成遺伝子はヒト・メタロチオネインII_A型の遺伝子の32番目と35番目のセリン残基をコードするコドンでロイシン残基をコードするコドンに置き換えたものを合成した。ミュータント・メタロチオネインを発現させた大腸菌の上清画分を精製出発材料とした。

ミュータント・メタロチオネインの精製は、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過およびイオン交換クロマトグラフィーにより行った。精製されたミュータント・メタロチオネインのアミノ酸分析の結果を同時に行ったヒト・メタロチオネイン2型の結果と比較し、同じく高いシステイン残基の含有量、セリン残基の含有量の低下、ロイシン残基の増加を示した。またミュータント・メタロチオネインの紫外部のスペクトルは中性条件下において245-255nmに肩を示し、酸性条件下ではその肩は消失した。

セリン置換ミュータント・メタロチオネインは以下のような性質を持つと考えられる。まず61

のアミノ酸残基より構成されアミノ酸組成はシステイン残基の高い含有量、またヒト・メタロチオネイン2型と比較してセリン残基の含有量が減少し、ロイシン残基の含有量が増加する。次に分子量は一次構造より計算すると、カドミウムが7個結合している状態で6881となる。さらにミュータント・メタロチオネインの分光学的性質は、芳香族アミノ酸残基がないことより、280 nmの吸収を持たない。またカドミウムとの結合がメタロチオネインと同様にシステイン残基によって行われているのであれば、中性条件下で紫外部のスペクトルは、カドミウム-メタロチオネインの特徴である245-255nmに肩を持ち、酸性条件下ではカドミウムが解離しこの245-255 nmの肩が消失する。

実験結果はこれら予想された性質と合致しており、セリン残基置換ミュータント・メタロチオネインはカドミウムと結合して存在することが証明された。

以上のように申請者は、現在まで興味を持たれていたがほとんど研究のなされていなかったメタロチオネイン中の相同性の高いセリン残基の役割を解明するために、セリン残基を置換したミュータント・メタロチオネインを得ることに初めて成功し、さらにミュータント・メタロチオネインがカドミウムと結合するという事実を見いだした。本研究を基礎にセリン残基の役割をさらに解明することができると期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。