

学 位 論 文 題 名

Role of Two Cysteiny Residues in the Amino-terminal Region in Biosynthesis
of Metallothionein by Using Expression System in *Escherichia coli*

（大腸菌発現系を用いたメタロチオネイン生合成に
おけるアミノ末端領域のシステイン2残基の役割）

学位論文内容の要旨

真核生物の生体内に重金属結合低分子量タンパク質，メタロチオネイン，が存在する。このタンパク質の特徴のひとつはシステイン残基を多く含んでいることである。メタロチオネイン中のシステイン残基は，その重金属との結合能により，高等動物において，必須微量元素である亜鉛・銅の生体内恒常性の維持，カドミウム・水銀などの有害重金属に対する耐性や解毒など種々の重要な生理作用に関与していると考えられている。一方，最近ではアルツハイマー型老人性痴呆症の脳内にメタロチオネインが欠除しているという報告もなされた。さらに，システイン残基は，生物種を問わず，アミノ酸配列中の出現位置において高い相同性（ホモロジー）が維持されており，特に哺乳動物においてはその出現位置が完全に保持されている。これらシステイン残基がメタロチオネインの機能や立体構造に深く関与していると考えられている。このようにシステイン残基はメタロチオネインにおいて，非常に重要な役割を演じている。一般に，システイン残基を含んでいるタンパク質の多くは，システイン残基どうしが結合しタンパク質の立体構造を維持している。しかし，メタロチオネインは通常システイン残基どうしで結合することではなく，すべてのシステイン残基が重金属と結合した形をとっていることから，本研究ではメタロチオネインの生合成機構や生理作用を解明するためシステイン残基に着目した。

メタロチオネインは，システイン残基が直接重金属と結合しそれらを取り込むことにより，その立体構造を維持し機能している。しかし，メタロチオネインが生体内で合成されるときに，まず重金属を含まないペプチド鎖を全合成しその後重金属を取り込むのか，または，合成する過程で順次取り込んでいくのか，そして後者の場合，もし最初のシステイン残基が他のアミノ酸に置換されるとボタンの掛け違いのようなことが起こるのか，または，ファスナーの歯が欠けたとき

のように全く取り込まないのか、という研究は未だなされていない。これらの研究を遂行するためには、我々が世界に先駆けて開発した、大腸菌を利用したメタロチオネイン発現系を用いて研究することが不可欠である。従って、これらの研究の最初の重要な課題となるシステイン残基をほかのアミノ酸に置換したミュータント・メタロチオネイン、いわゆるシステイン置換人工タンパク質が重金属と結合するかどうかを検討するため、本研究では、遺伝子工学の手法を用い、メタロチオネインが生合成される過程において5番目と7番目に出現するシステイン残基をアラニン残基に置換した、システイン置換人工タンパク質を大腸菌内で発現させることを試みた。ここでシステイン残基をアラニン残基に置換した理由は、アラニン残基は、システイン残基から重金属と結合するのに必要なSH基を除いた以外は同じ構造をしているからである。

本研究は以下のように遂行した。システイン置換人工タンパク質遺伝子を合成した。それを発現させるため、当研究室で開発した、大腸菌トリプトファン・ラクトース・プロモーターの下流域にヒト・メタロチオネイン-II_AcDNA (MTcDNA) を結合させたメタロチオネイン発現プラスミド、pEXPMT II, のMTcDNA部分とこの合成遺伝子を組み換えた。これを大腸菌内に挿入することにより形質転換させ、それを培養し、カドミウムさらに転写誘導物質、IPTG, を加えることにより大腸菌内でシステイン置換人工タンパク質を発現させた。この大腸菌を集菌・破碎し、遠心分離を行い、その上清画分からタンパク質を分子量により分離する、ゲル濾過法によりシステイン置換人工タンパク質の分離を試みた。この大腸菌内に目的とするカドミウムと結合したシステイン置換人工タンパク質が存在するか否かを、カドミウムを測定することと、同時に紫外部の吸光度を測定すること、すなわちこのタンパク質の特徴の一つである280nmの吸収をもたないことを指標に検討した。結果は、分子量約6000~7000のシステイン置換人工タンパク質が溶出するべき位置にカドミウムの顕著なピークは認められず、逆に280nmの吸収が認められた。しかし、このデータをさらに解析すると、システイン置換人工タンパク質が溶出するべき位置に、カドミウムが存在し280nmの吸収が少ない事をあらわす指標、カドミウム濃度/ A_{280nm} 比の小さなピークが確認された。この位置にシステイン置換人工タンパク質が存在する可能性が示唆されたため、あらたに大腸菌の上清画分を有機溶媒で分画してから、ゲル濾過し、解析を行った。その結果、システイン置換人工タンパク質が溶出するべき位置にカドミウム濃度/ A_{280nm} 比の顕著な高いピークがみられた。この画分をさらにイオン交換樹脂で精製し、アミノ酸分析に供した。システイン置換人工タンパク質は、システイン残基をアラニン残基に置き換えているため、システイン残基を置換していない元のメタロチオネインと比較すると、システイン残基が少なくアラニン残基が多く含まれていることが理論値より考えられ、精製した画分に含まれ

るタンパク質のアミノ酸分析を行った結果、このことが確認された。ほかのアミノ酸については、比較に用いたシステイン残基を置換していない元のメタロチオネインとほぼ同程度の値が得られた。これらのことから、システイン置換人工タンパク質が存在していることが証明された。さらに、タンパク質の性質を解析する方法の一つである、吸光スペクトルを測定した。システイン置換人工タンパク質のスペクトルは、中性条件下のカドミウムを含んだメタロチオネインと、酸性条件下にしカドミウムをはずしたメタロチオネインの2つのスペクトルの間にあること、またこのシステイン置換人工タンパク質を酸性条件下にすると、システイン残基とカドミウムの結合をあらわす250nm 付近の吸収が減少し、システイン残基からカドミウムがはずれた事実などから、このシステイン置換人工タンパク質はカドミウムと結合していることが証明された。

以上の結果から、メタロチオネインが生合成される過程において5番目と7番目に出現する、つまりアミノ末端領域の初めの2つのシステイン残基をアラニン残基に置換した、システイン置換人工タンパク質を大腸菌発現系を用いて発現・精製することに初めて成功し、またそれがカドミウムと結合することが確認された。これらの事実により進化の過程で完全に保持されているシステイン残基のうち本研究で置換した2つのシステイン残基が存在しなくとも、メタロチオネインの生合成には影響を与えないという新しい知見が得られ、一般の金属タンパク質における生合成のメカニズムの解明にも大きく貢献するものと思われる。

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

真核生物の生体内に重金属結合低分子量蛋白質、メタロチオネイン、が存在する。この蛋白質の特徴のひとつはシステイン残基を多く含んでいることである。これらのシステイン残基は、アミノ酸配列中の出現位置において進化の過程で高い相同性（ホモロジー）が維持されており、特に哺乳動物においてはその出現位置が完全に保持されている。メタロチオネイン中のシステイン

残基は、その重金属との結合能により必須微量元素である亜鉛・銅の生体内恒常性の維持、カドミウム・水銀などの有害重金属に対する耐性や解毒など種々の重要な生理作用や立体構造に関与していると考えられている。一方、最近ではアルツハイマー型老人性痴呆症の脳内にメタロチオネインと同様の化学構造的特徴を持った蛋白質が欠除しているという報告もなされた。

しかし、メタロチオネインが生体内で合成されるときに、まず重金属を含まないペプチド鎖を全合成しその後重金属を取り込むのか、または、合成する過程で順次取り込んでいくのか、そして後者の場合、もし最初のシステイン残基が他のアミノ酸残基に置換されるとボタンの掛け違いのようなことが起こるのか、または、ファスナーの歯が欠けたときのように全く取り込まないのか、という金属蛋白質の生合成機構に関する研究の報告は未だない。従って、本研究では、遺伝子工学の手法を用い、メタロチオネインが生合成される過程において5番目と7番目に出現するシステイン残基をアラニン残基に置換した、システイン置換人工蛋白質を大腸菌内で発現させ、その蛋白質の金属結合を解析した。ここでシステイン残基をアラニン残基に置換した理由は、アラニン残基は、システイン残基から重金属と結合するのに必要なSH基を除いた以外は同じ構造をしているからである。

本研究は以下のように行った。システイン置換人工蛋白質遺伝子を合成した。それを発現させるため、当研究室で世界に先駆けて開発した、メタロチオネイン発現プラスミドにこの合成遺伝子を組み換えた。これを大腸菌内に挿入し、この大腸菌を培養し、カドミウムさらに転写誘導物質、IPTG、を加えることにより大腸菌内でシステイン置換人工蛋白質を発現させた。この大腸菌を集菌・破碎し、その上清画分から蛋白質を分子量により分画する、ゲル濾過法によりシステイン置換人工蛋白質の分離を試みた。結果は、システイン置換人工蛋白質が溶出されるべき位置に、カドミウム濃度/A280nm 比の小さなピークが確認された。この位置に、発現されたシステイン置換人工蛋白質が存在する可能性が示唆されたため、あらたに大腸菌の上清画分を有機溶媒で分画してから、ゲル濾過し、解析を行った結果、システイン置換人工蛋白質が溶出されるべき位置にカドミウム濃度/A280nm 比の顕著な高いピークを作る画分がみられたので、この画分をさらにイオン交換樹脂で精製した。

精製後のアミノ酸分析の結果、システイン残基を置換していない元のメタロチオネインと比較すると、システイン残基が少なくアラニン残基が多く含まれていることが確認された。ほかのアミノ酸については、比較に用いたメタロチオネインとほぼ同程度の値が得られた。これより、システイン置換人工蛋白質が存在していることが証明された。さらに、蛋白質の分光学的性質を解析した。システイン置換人工蛋白質の吸光スペクトルは、中性条件下のカドミウムを含んだメタ

ロチオネインと、酸性条件下にしカドミウムをはずしたアポ・メタロチオネインの2つのスペクトルの間にあること、さらにシステイン置換人工蛋白質を酸性条件下にすると、250nm 付近の吸収が減少し、システイン残基からカドミウムがはずれたという事実などから、このシステイン置換人工蛋白質はカドミウムと結合していることが証明された。

以上の結果から、メタロチオネインが生合成される過程において、アミノ末端領域の初めの2つの、つまり5番目と7番目に出現するシステイン残基をアラニン残基に置換したシステイン置換人工蛋白質を、大腸菌発現系を用いて発現・精製することに初めて成功し、またそれがカドミウムと結合することを確認した。

本論文により進化の過程で完全に保持されているシステイン残基のうち本研究で置換した2つのシステイン残基が存在しなくとも、メタロチオネインの生合成には影響を与えないという新しい知見が得られ、一般の金属蛋白質における生合成のメカニズムの解明にも大きく貢献するものと思われる。

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。