

学 位 論 文 題 名

Biosynthesis of Cadmium - binding  $\alpha$ -fragment of Metallothionein  
without Participation of  $\beta$  (Amino - terminal)-fragment in  
*Escherichia coli*

(大腸菌におけるメタロチオネインのカドミウム結合  
 $\alpha$ -フラグメントの $\beta$ (アミノ末端)-フラグメントの  
関与のない生合成)

学位論文内容の要旨

重金属結合低分子量蛋白質 メタロチオネインは、哺乳動物において、61および62のアミノ酸残基から構成され、その分子量は6500-7000である。この蛋白質の生化学的特徴として、システイン残基が、全アミノ酸残基のうち約30%、20残基存在し、そのシステイン残基を介して7-20原子の重金属と結合すること、その他、構成アミノ酸残基には、芳香族アミノ酸残基を全く含まないこと、さらにメタロチオネイン生合成が、重金属その他で誘導されることなどが挙げられている。

未解決の問題も残されているが、メタロチオネインは、その生理学的な機能として、カドミウムおよび水銀などの有害重金属の解毒、亜鉛および銅などの生体必須微量重金属の恒常性の維持、さらに、生体に種々の傷害を与えるストレスおよび放射線からの防御等重要な生理作用に関与していると考えられている。また、最近、アルツハイマー型老人性痴呆症の脳内に、メタロチオネインのイソ蛋白質の顕著な減少が報告され注目を集めている。これらの全ての機能は、メタロチオネインが重金属と結合することに基づくと考えられている。

メタロチオネインは、これらの重金属を結合する際に2つのクラスター（房状）構造を持つという特徴を有している。つまり、メタロチオネイン分子中に、重金属を中心に2つの領域、すなわち蛋白質のカルボキシル末端側にある $\alpha$ -フラグメントとアミノ末端側の $\beta$ -フラグメントの2つに分かれて存在している。この立体構造は、核磁気共鳴の分析により、 $\alpha$ -フラグメントには4原子、 $\beta$ -フラグメントには3原子のカドミウム等の重金属が結合していることが明らかにさ

れている。またメタロチオネインが生合成される際には、この $\beta$ -フラグメントのアミノ末端側から、順次生合成されることがよく知られている。

$\alpha$ -および $\beta$ -フラグメントが、おのおの独立して単独でも細胞内で重金属を結合した形で生合成されることができるか、ことにカルボキシル末端側の $\alpha$ -フラグメントがアミノ末端側の $\beta$ -フラグメントの関与なしに重金属を結合し生合成されるかどうかに関する研究が行われるならば、メタロチオネインの機能と重金属結合に関する問題の解決に寄与すると期待されているが、このような研究はこれまで全く行われていなかった。この研究を遂行するには、遺伝子工学的な手法を用いてフラグメントのみを生合成することが、最も有効的な方法である。現在までに、我々のヒト・メタロチオネインの発現を含めいくつかの研究室において、 $\alpha$ -および $\beta$ -両フラグメントをもつ天然型のメタロチオネインを大腸菌内で発現させることに成功している。しかし、これら単一に $\alpha$ -フラグメントおよび $\beta$ -フラグメントを、それぞれ別々に生合成させ、その生合成過程において、重金属と結合する能力を保持できるかという研究は全くなされておらず、これまでそれに成功したという報告もない。

本研究の目的は、メタロチオネインの $\alpha$ -フラグメントが、通常先に生合成がはじめられる $\beta$ -フラグメントの関与なしに生合成されるか否か、 $\alpha$ -フラグメントが、単独でも細胞内で重金属を結合した形で生合成されるか否かを明らかにすることである。

本学位論文研究の結果を以下に述べる。まず、メタロチオネインの $\alpha$ -フラグメントをコードする遺伝子を人工的に合成し、すでに我々によって開発されたメタロチオネインを大腸菌内に生合成させることができる遺伝子に結合させ、その融合遺伝子を大腸菌内に組み込んだ。大腸菌内にメタロチオネインが存在しないことを既に確認しており、本研究に用いる実験系として最適であると考えられる。この $\alpha$ -フラグメントのみの遺伝子をカドミウム存在下で、大腸菌内で発現させ、その発現蛋白質を大腸菌の菌体よりゲルろ過法により精製した。その結果、分子量3500ぐらいと推定されるカドミウムを含むピークが認められ、様々な知見から、これは、カドミウムと結合した $\alpha$ -フラグメントであると推定された。このカドミウムを含む画分を、陰イオン交換クロマトグラフ法を用いてさらに精製を行い、得られた精製 $\alpha$ -フラグメントの解析を行った。

アミノ酸分析の結果は、30%以上の高いシステイン含有量を示し、リジン、セリン、アラニン残基の測定値等、アミノ酸配列から予測される $\alpha$ -フラグメントの理論値とよく一致していた。さらに、 $\alpha$ -フラグメントには含まれない芳香族アミノ酸残基およびアルギニン、ロイシンおよびスレオニン残基は、精製 $\alpha$ -フラグメント中には存在しなかった。これらの結果より、この大腸菌内に生合成されたカドミウムを含む蛋白質は、 $\alpha$ -フラグメントであると同定された。

次にこの $\alpha$ -フラグメントに含まれたカドミウムが、 $\alpha$ -フラグメントのシステイン残基と結合しているか否かを、検討するために紫外部の吸収スペクトルによる解析を行った。中性領域の pH において、 $\alpha$ -フラグメントは、245–255nm に吸収の肩を持ち、その肩は、酸性条件下で消失した。この現象は、Cd-SH の結合が、245–255nm に吸収を持ち、酸性条件下でカドミウムを離すと吸収が消失するという Kagi ら (1961) および Vařák ら (1981) の報告に一致している。この事実より、 $\alpha$ -フラグメントはシステイン残基を介してカドミウムと結合していることが明らかになった。

さらに、この $\alpha$ -フラグメント 1 分子あたり何原子のカドミウムが結合しているかを、アミノ酸分析、SH 分析および重金属分析の値より求めた結果、 $\alpha$ -フラグメント 1 分子は、天然のメタロチオネインの $\alpha$ -フラグメントと同様に、4 原子のカドミウムと結合していることが確認された。以上、本研究において得られた、分子ふるいによる分子量、アミノ酸分析、吸収スペクトルの解析およびカドミウムと $\alpha$ -フラグメントとのモル比の結果から、大腸菌内で生合成された $\alpha$ -フラグメントは、 $\beta$ -フラグメントの関与なしに、単独で 4 原子のカドミウムを結合した形で生合成されることが、はじめて明らかにされた。

以上をまとめると、本学位論文研究において、遺伝子工学的手法を用いて大腸菌内に $\alpha$ -フラグメントのみを発現させる系を開発し、本研究の目的に挙げた、カドミウム存在下の細胞内で $\alpha$ -フラグメントを発現させることに初めて成功したことを述べた。さらに、その精製蛋白質の解析から、 $\alpha$ -フラグメントが、天然のメタロチオネインの場合と同様に、カドミウム 4 原子と結合した状態で存在し、生合成過程で最初に作られる $\beta$ -フラグメントの関与なしに、単独でも生合成されることを初めて立証し、その意義について考察した。

また本研究の特色として、遺伝子操作を行った大腸菌を用いることにより、金属蛋白質が細胞内で生合成される過程における蛋白質と重金属との結合能を解析したという点が挙げられる。生合成された蛋白質と重金属との結合機構に関する過去の研究では、精製した金属蛋白質より重金属を取り除き、その後に重金属をアポ蛋白質に添加するという手法がとられており、その手法は、細胞内の反応をそのまま反映しているとは言い難い。

本論文は、細胞内における金属蛋白質の重金属結合機構および重金属選択性の解明に大きく貢献することが期待される。

# 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

重金属結合低分子量蛋白質 メタロチオネインは、システイン残基が、全アミノ酸残基のうち約30%, 20残基存在し、そのシステイン残基を介して重金属と結合している。さらに生合成が、重金属その他で誘導されることも、この蛋白質の特徴としてよく知られている。

メタロチオネインの生理学的な機能として、カドミウムなどの有害重金属の解毒、亜鉛などの生体必須微量重金属の恒常性の維持など重要な生理作用に関与していると考えられている。また、最近、アルツハイマー型老人性痴呆症の脳内に、メタロチオネインのイソ蛋白質の顕著な減少が報告され注目を集めている。これらの全ての機能は、メタロチオネインが重金属と結合することに基づくと考えられている。

メタロチオネインは、重金属と結合する際にクラスター（房状）構造をとるという特徴を有している。つまり、メタロチオネイン分子中に、重金属を中心に2つの領域、すなわち蛋白質のアミノ末端側の $\beta$ -フラグメントとカルボキシル末端側にある $\alpha$ -フラグメントの2つに分かれ、 $\beta$ -フラグメントには3原子、 $\alpha$ -フラグメントには4原子のカドミウム等の重金属が結合していることが明らかにされている。またメタロチオネインが生合成される際には、この $\beta$ -フラグメントのアミノ末端側から、順次生合成される。

この $\beta$ -及び $\alpha$ -フラグメントの生合成における役割、相互関係についての研究はこれまで全く行われていなかった。

本研究の目的は、メタロチオネインの $\alpha$ -フラグメントが、はじめに生合成がされるアミノ末端側 $\beta$ -フラグメントの関与なしに、単独で重金属を結合した形で生合成されるか否かを明らかにすることである。

申請者は、メタロチオネインの $\alpha$ -フラグメントをコードする遺伝子を人工的に合成し、申請者らによって開発されたメタロチオネインを大腸菌内に生合成させることができる遺伝子に結合させ、その融合遺伝子は大腸菌内に組み込んだ。大腸菌内にメタロチオネインが存在しないこと

は確認しており、本研究の実験系として最適と考えられた。この $\alpha$ -フラグメントのみの遺伝子をカドミウム存在下で、大腸菌内で発現させ、その発現蛋白質を大腸菌の菌体よりゲル濾過法により精製した。その結果、分子量3500ぐらいと推定されるカドミウムを含むピークが認められ、カドミウムと結合した $\alpha$ -フラグメントであると推定された。このカドミウムを含む画分を、陰イオン交換クロマトグラフ法を用いてさらに精製を行い、得られた精製 $\alpha$ -フラグメントの解析を行った。

アミノ酸分析の結果は、30%以上の高いシステイン含有量を示し、 $\alpha$ -フラグメントの実験値は、アミノ酸配列から予測される理論値とよく一致していた。この結果より、大腸菌内に生合成されたカドミウムを含む蛋白質は、 $\alpha$ -フラグメントであると同定された。

次にこの $\alpha$ -フラグメントに含まれたカドミウムが、システイン残基と結合しているか否かを、検討するために紫外部の吸収スペクトルによる解析を行った。中性領域のpHにおいて、 $\alpha$ -フラグメントは、245-255nmに吸収の肩を持ち、その肩は、酸性条件下で消失した。この事実より、 $\alpha$ -フラグメントはシステイン残基を介してカドミウムと結合していることが明らかになった。

さらに、この $\alpha$ -フラグメント1分子あたり何原子のカドミウムと結合しているかを、アミノ酸分析、SH分析及び重金属分析の値より求めた結果、天然のメタロチオネインの $\alpha$ -フラグメントと同様に、4原子のカドミウムと結合していることが確認された。

以上まとめると、申請者の学位論文研究において、遺伝子工学的手法を用いて大腸菌内に $\alpha$ -フラグメントのみを発現させる系を開発し、カドミウム存在下の大腸菌体内で $\alpha$ -フラグメントを発現させることに初めて成功した。さらに、 $\alpha$ -フラグメントが、天然のメタロチオネインの場合と同様に、カドミウム4原子と結合した状態で存在し、生合成過程で最初に作られる $\beta$ -フラグメントの関与なしに、単独でも生合成されることを初めて立証し、その意義について考察した。

また本研究の独創的な点として、遺伝子操作を行った大腸菌を用いることにより、金属蛋白質が細胞内で生合成される過程において、蛋白質と重金属との結合を解析したこと及びメタロチオネインの一部分を人工的に生合成させ得ることを示したことが挙げられる。さらに本論文は、細胞内における金属蛋白質の重金属結合機構及び重金属選択性の解明に大きく貢献することが期待され、高く評価できる。

審査員一同は、参考論文(24編)の内容、専門試験および語学試験の結果とも併せて申請者が博士(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認定した。