

学位論文題名

Significance of α -fragment in Biosynthetic Processes
of Cadmium-metallothionein

（カドミウム－メタロチオネイン生合成過程における α -フラグメントの意義）

学位論文内容の要旨

蛋白質のポリペプチド鎖の骨格の生合成やその制御に関しては、今まで20年間の分子生物学の発展により、ほとんど解明されたと言ってもよいと思われる。現在では、それに続いておこる蛋白質のポリペプチド鎖の修飾、すなわち、post-translational modification（翻訳後修飾）が、新しく生化学の研究の中心として注目されている。

我々の研究室において、メタロチオネイン（重金属結合蛋白質）の様な金属蛋白質の場合、生合成されたポリペプチド鎖に金属がどのような機構で結合し、どのように調節され、ある決った立体構造を構築していくのか等の疑問を部位特異的変異法を用いて解明する研究を行っている。メタロチオネインは、メチオニン残基からはじまるアミノ酸残基61のポリペプチドであり、そのうち20残基はシステインで、その全てが7原子のIIb族の重金属と結合している。この蛋白質は、さきに生合成が起こる β -フラグメントと、続いて生合成される α -フラグメントの2つのフラグメントから構成され、それぞれ β -フラグメントには3、 α -フラグメントには4原子の金属が結合し、一定の複雑な立体構造をとっていることが、過去の研究より明らかにされている。

本学位論文研究において、メタロチオネインが金属を結合し立体構造が作られて行く過程で、これらのフラグメントの役割を明らかにするため、大腸菌内に蛋白質を遺伝子工学的に発現・生合成させる系を用いて以下の実験を行った。

- (1) まず、以下の蛋白質・ポリペプチドをコードするDNAを準備した。
 - 1) ヒト・メタロチオネイン-2型をコードするcDNA
 - 2) ヒト・メタロチオネイン-2型の α -フラグメントの有機合成DNA
 - 3) ヒト・メタロチオネイン-2型の β -フラグメントの有機合成DNA
 - 4) ヒト・メタロチオネイン-2型の α -フラグメントのシステイン残基11のうち9残基を部位特異的変異法を用いてアラニン残基に置換し、 α -フラグメントの金属と結合する能力を失わせるようにしたミュータント・メタロチオネインの有機合成DNA
- (2) 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発現プラスミドに組み入れ、その作製された発現プラスミドの組み込んだ部分のDNAの塩基配列が間違えなく組み換えられたかをDNAシーケンスにより確認した。
- (3) 確認された融合発現プラスミドを大腸菌に形質転換し、転写誘導物質およびカドミウムを含む培地で大腸菌内にヒト・メタロチオネイン、 α および β -フラグメントおよび、ミュータント・メタロチオネイン遺伝子の発現を試み、カドミウムと結合した蛋白質をゲル濾過等を用い検索した。

- (4) 発現したカドミウム結合蛋白質をイオン交換クロマトグラフィ等を用い精製し、アミノ酸分析および分子吸光スペクトル等で同定した。さらに、発現蛋白質に結合しているカドミウムの結合数をSH分析法等を用い測定した。

本学位論文研究の結果を以下に述べる。

- (1) ヒト・メタロチオネイン-2型をコードするcDNAを含む発現プラスミドを用いた発現実験において、ゲル濾過の結果、分子量7000ぐらいと推定されるカドミウムを含む画分が認められた。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った。この精製蛋白質のアミノ酸分析の結果は、高いシステイン含量等を示した。さらに、紫外部の吸収スペクトルの結果では、245-255 nmに吸収の肩を持ち、その肩が酸性条件下で消失するという現象が示された。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、ヒト・メタロチオネイン-2型であると同定された。さらに、このヒト・メタロチオネイン-2型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。ヒト・メタロチオネイン-2型1分子は、天然から精製されたメタロチオネインと同様に、7原子のカドミウムと結合していることが確認された。
- (2) ヒト・メタロチオネインの α -フラグメントのみをコードするDNAを含む発現プラスミドを用いた発現実験においても、ゲル濾過で、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た。この精製されたカドミウムを含む画分のアミノ酸分析、および紫外部の吸収スペクトルの結果から、この生合成されたカドミウムを含む蛋白質は、 α -フラグメントであると同定された。さらに、この α -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、同様に測定したところ、4原子のカドミウムと結合していることが確認された。これは、天然のメタロチオネインの α -フラグメントと同様であった。
- (3) ヒト・メタロチオネイン-2型の α -フラグメントのシステイン残基11のうち9残基をアラニン残基に置換したミュータント・メタロチオネインおよびヒト・メタロチオネイン-2型の β -フラグメントをコードするDNAを含む発現プラスミドを用いた発現実験では、上記の結果に反し、ゲル濾過において、はっきりとしたカドミウムを含むピークが認められなかった。

以上本学位論文研究において得られた結果をまとめ、これまでに得られた所見を考慮に入れると、メタロチオネインが金属を結合した一定の立体構造を構築するためには、カドミウムと結合した α -フラグメントの存在が必要条件であるとの結論を得ることができた。ここで、興味深いことは、メタロチオネインの金属を結合した立体構造の構築が、生合成の際、あとからできる α -フラグメントに依存するという点である。

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を解析したという点が挙げられる。本論文は、細胞内における金属蛋白質の重金属結合機構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	助教授	井上	勝一
副査	助教授	神山	昭男

学位論文題名

Significance of α -fragment in Biosynthetic Processes of Cadmium-metallothionein

(カドミウム-メタロチオネイン生合成過程における α -フラグメントの意義)

蛋白質のポリペプチド鎖の生合成やその制御に関しては、分子生物学の発展により、ほとんど解明されたと云ってもよいが、それに続いておこる蛋白質のポリペプチド鎖の修飾、たとえば、金属蛋白質の場合、ポリペプチド鎖にいかに関金属が結合するかについては不明の点が多い。

生合成されたポリペプチド鎖に金属がどのような機構で結合し、どのように調節され、ある決った立体構造を構築していくのかなどの疑問を解明するのに、最適であると思われるメタロチオネイン（重金属結合蛋白質）を用いて研究を行った。

メタロチオネインは、重金属を多く含む低分子量の蛋白質であり、その立体構造も既に決定されている。アミノ酸61残基のうち20残基はシステインで、その全てが7原子のIIb族の重金属と結合している。この蛋白質は、さきに生合成が起こる β -フラグメントと、続いて生合成される α -フラグメントの2つのフラグメントから構成され、それぞれ β -フラグメントには3、 α -フラグメントには4原子の金属が、四面体構造 (tetrahedral configuration) の形で結合し、一定の複雑な立体構造をとっている。

本研究において、メタロチオネインが金属を結合し立体構造が作られて行く過程で、これらフラグメントの役割を明らかにするため、大腸菌内で蛋白質を遺伝子工学的に発現・生合成させる系を用いて実験を行った。

まず、4種類のポリペプチドをコードするDNAを調整した。(1) ヒト・メタロチオネイン-2型、(2) ヒト・メタロチオネイン-2型の α -フラグメントと(3) β -フラグメント、及び(4) ヒト・メタロチオネイン-2型の α -フラグメントのシステイン残基11のうち9残基を部位特異的変異法を用いてアラニン残基に置換し、 α -フラグメントの金

属と結合する能力を失わせるようにしたミュータント・メタロチオネインの合成DNA。

これらDNAを、シーケンスで確認した後、発現プラスミドに組み込んだ。融合発現プラスミドを大腸菌に形質転換し、転写誘導物質およびカドミウムを含む培地で大腸菌内に発現させた。発現されカドミウムと結合した蛋白質をゲル濾過などを用い検索した。この蛋白質を精製し、アミノ酸分析および吸収スペクトルなどで同定した。さらに、発現蛋白質に結合しているカドミウムの結合数をSH分析法などを用い測定した。

その結果、(1) ヒト・メタロチオネイン-2型をコードするcDNAを含む発現プラスミドを用いた発現実験において、ゲル濾過で、分子量7000ぐらいと推定されるカドミウムを含む画分が認められた。この画分の精製蛋白質は、ヒト・メタロチオネイン-2型であると同定され、さらに、この蛋白質1分子は、天然から精製されたメタロチオネインと同様に、7原子のカドミウムと結合していることが確認された。

(2) ヒト・メタロチオネインの α -フラグメントのみをコードするDNAを含む発現プラスミドを用いた発現実験において、分子量3500と推定されるカドミウムを含む蛋白質は、 α -フラグメントであると同定された。さらに、天然のメタロチオネインの α -フラグメントと同様、1分子あたり4原子のカドミウムと結合していることが確認された。

(3) ヒト・メタロチオネイン-2型の α -フラグメントのシステイン残基11のうち9残基をアラニン残基に置換したミュータント・メタロチオネインおよびヒト・メタロチオネイン-2型の β -フラグメントをコードするDNAを含む発現プラスミドを用いた発現実験では、上記の結果に反し、カドミウムを含む蛋白質は得られなかった。

以上の結果をまとめると、メタロチオネインのポリペプチド鎖が金属と結合した一定の立体構造を構築するためには、カドミウムと結合した α -フラグメントの存在が必要条件であるとの結論を得た。ここで、興味深いのは、メタロチオネインの金属を結合した立体構造の構築が、生合成の際、あとからできる α -フラグメントに依存するという点である。

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を解析したという点が挙げられる。本論文は、細胞内における金属蛋白質の金属結合機構の解明に大きく貢献することが期待される。

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。