

学 位 論 文 題 名

Effect of Amino Acid Replacements on Cadmium
Binding of Metallothionein α -fragment

（メタロチオネイン α -フラグメントのカドミウム
結合におよぼすアミノ酸置換の影響に関する研究）

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(MT)は、2次元核磁気共鳴法を用いて立体構造が決定された世界初の蛋白質である。MTは、カドミウムがCys残基と結合しテトラヘドラル構造をとり、その構造3つから成るN末端側の β 、4つから成るC末端側の α の、2つのフラグメントから成るカドミウム-チオレートクラスター構造を形成し、非常に厳格な立体構造をとっている。一方、Cys残基の位置が貝の1種からヒトに至るまで完全に保持されており、構成アミノ酸残基の種も良く保持されている。これらの事実よりMTは厳格な金属ペプチド結合構造をとっていることが通説となっている。しかし、申請者は、異なる様々な重金属とMTが結合することに着目し、通説となっているMTの厳格な立体構造にも自由度があるのではないかと考えた。そこで本研究では、MTを構成するアミノ酸残基の種および位置の変化がMTの重金属結合に影響を与えているか否かを解明することを目的とした。先ほども触れたが、重金属と結合したMTの構造は、 β -フラグメント(N末端側1-30)と α -フラグメント(C末端側31-61, 62)の2つのフラグメントから構成されている。我々により、C末端側の α -フラグメントが単独でMT同様にカドミウムと結合することを既に報告している。本研究では α -フラグメントをMTのモデルとして、これに変異を導入することにより、カドミウムと結合するCys残基の位置の重要性を調べるためにCys残基の位置を1~2残基変化させたミュータントMT α を2種類、即ち、

フラグメントF: Cys-x-Cys配列をアミノ酸1残基分N末端側に変化させたもの、

フラグメントG: y-Cys-x-Cys配列をCys-y-x-Cys配列に変化させたもの、

および、構成アミノ酸残基が良く保持されていることの重要性を調べるためにCys残基以外の構成アミノ酸残基をその種類によりGly残基に置換したもの5種類、即ち、

フラグメントA: Cys残基以外の構成アミノ酸残基を全てGly残基に置換したもの、

フラグメントB: Cys残基と-OH基をもつSer残基および-NH₂基を持つGln残基以外の構成アミノ酸残基を全てGly残基に置換したもの、

フラグメントC: Cys残基と極性アミノ酸残基のAsp, Lys残基以外の構成アミノ酸残基を全てGly残基に置換したもの、

フラグメントD: Cys残基とSer, Gln, Asp, Lys残基以外の構成アミノ酸残基を全てGly残基に置換したもの、

フラグメントE: Cys残基と非極性アミノ酸残基のAla, Val, Ile, Pro残基以外の構成アミノ酸残基を全てGly残基に置換したもの、

以上計7種類のミュータントMT α を作製した。

これらのミュータントMT α の構造遺伝子をDNA合成機を用いて合成し、我々が開発したヒト・MT-2型発現プラスミドpEXPMTHのヒト・MT-2型構造遺伝子の部分に組み換え、ミュータントMT α 発現プラスミド計7種類を作製した。この各ミュータントMT α 発現プラスミドを用い大腸菌を形質転換させ、カドミウムを含むLB培地中で培養し転写誘導物質IPTGを加え、各ミュータントMT α をそれぞれ発現させた。大腸菌自体には、低分子量の重金属結合蛋白質を持たないことが既に多くの研究により明らかにされている。大腸菌を集菌後、超音波破碎し得られた上清を、Sephadex G-50カラムを用いたゲルろ過をおこない分子量により分画した。各画分のカドミウム濃度を原子吸光光度計を用いて測定したところ、フラグメントD, F, Gおよびコントロールの α -フラグメントは溶出量300ml~400mlの範囲の低分子量画分にカドミウムのピークが認められたが、フラグメントA, B, C, Eはカドミウムのピークは認められなかった。また、フラグメントA~Gおよび α -フラグメントの300ml~400mlの範囲の溶出試料のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこなったところ、フラグメントA~Gは全て α -フラグメントと思われる位置と同じ位置にバンドが認められた。さらに、それぞれのカドミウムの存在が認められた低分子量画分の精製標品の吸収スペクトルを測定したところ、フラグメントD, F, Gは α -フラグメントと同様245~250nmにカドミウムとチオール基の結合を示す吸収の肩が認められた。以上のことより、フラグメントA~Gは全て蛋白質としては発現したが、カドミウムと結合した形で発現したのはフラグメントD, F, Gのみであり、フラグメントA, B, C, Eはカドミウムを結合した形では発現しなかった。興味深いことに、哺乳類でCys残基の位置は完全に保持されているにも関わらず、Cys残基の位置を変化させた2種類のミュータントMT α はカドミウムと結合した形で発現していた。次に、カドミウムと結合して発現したフラグメントD, F, Gが何原子のカドミウムと結合しているのかをアミノ酸分析値およびカドミウム量から求めたところ、フラグメントD, F, Gはそれぞれ3.17, 3.77, 3.38原子のカドミウムと結合していることが明らかにされた。フラグメントFは、コントロールである α -フラグメントが結合する4原子に近い値を示した。さらに、これらのカドミウムと結合したフラグメントD, F, Gのカドミウムに対する結合能をDTNB(5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸))を用いた動力学的解析により調べたところ、各フラグメントD, F, GとDTNBの反応の初速度は、 α -フラグメントに比べて10~22倍の値を示し、みかけの1次定数はこの α -フラグメントに比べてフラグメントD, Fでは約1.7倍、フラグメントGでは1.2倍の値を示した。以上のことは、各フラグメントD, F, Gは α -フラグメントほどではないが、我々のこれまでの研究により示されたワイルドタイプのMT(β -, α -フラグメントから成る)の結合能とはほぼ同程度の結合能を示していた。

以上の結果を総括すると、Cys残基以外の構成アミノ酸残基を全てGly残基に置換したフラグメントA等4種類のミュータントMT α はカドミウムと結合した形で発現しなかったが、Cys残基の位置を変化させたフラグメントF, G および、構成アミノ酸残基のSer, Gln, Asp, Lys残

基以外をGly残基に置換したフラグメントDはカドミウムと結合した形で発現した。興味深いことに完全に保持されてきたCys残基の位置を変化させたミュータントMT α 2種類がカドミウムと結合した形で発現した。以上のことより、ミュータントMT α がカドミウムと結合するためにはCys残基だけでなくCys残基以外の構成アミノ酸残基も重要であるが、我々の過去の知見ともあわせると重要と思われてきたアミノ酸残基および完全に保持れてきたCys残基の位置にもある程度の自由度があることが明らかにされた。これらのことより、MTは考えられてきたよりも柔軟性をもって重金属と結合することが示唆され、得られた新たな知見は今迄の通説を覆すものであり、MTの重金属結合およびクラスター構造形成の機構の解明およびMTの金属蛋白質工学的な研究に大きく寄与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	東	正剛
副査	教授	高木	信夫
副査	助教授	新岡	正

学位論文題名

Effect of Amino Acid Replacements on Cadmium Binding of Metallothionein α -fragment

(メタロチオネイン α -フラグメントのカドミウム

結合におよぼすアミノ酸置換の影響に関する研究)

重金属結合低分子量蛋白質メタロチオネイン(MT)は、2次元核磁気共鳴法を用いて立体構造が決定された世界初の蛋白質である。MTはカドミウムがCys残基と結合し、N末端側の β 、C末端側の α 、の2つのフラグメントから成るカドミウム-チオレートクラスター構造を形成し、非常に厳格な立体構造をとっている。一方、Cys残基の位置が貝の1種からヒトに至るまで完全に保持されており、構成アミノ酸残基の種も良く保持されている。これらの事実よりMTは厳格な金属ペプチド結合構造をとっていることが通説となっている。しかし、申請者は、異なる様々な重金属とMTが結合することに着目し、通説となっているMTの厳格な立体構造にも自由度があるのではないかと考えた。本研究では、MTを構成するアミノ酸残基の種および位置の変化がMTの重金属結合に影響を与えているか否かを解明することを目的とした。重金属と結合したMTの構造は、 β -フラグメント(N末端側)と α -フラグメント(C末端側)の2つのフラグメントから構成されている。本研究では α -フラグメントをMTのモデルとして、これに変異を導入することにより、カドミウムと結合するCys残基の位置の重要性を調べるためにCys残基の位置を1~2残基変化させたミュータントMT α を2種類、および、構成アミノ酸残基が良く保持されていることの重要性を調べるためにCys残基以外の構成アミノ酸残基をその種類によりGly残基に置換したもの5種類、計7種類のミュータントMT α を作製した。これらのミュータントMT α の構造遺伝子をDNA合成機を用いて合成し、申請者らが開発したヒト・MT-2型発現プラスミドに組み換え、ミュータントMT α 発現プラスミド計7種類を作製した。各ミュータントMT α 発現プラスミドを用い大腸菌内で各ミュータントMT α をそれぞれ発現させた。大腸菌自体には、低分子量の重金属結合蛋白質を持たないことが既に明らかにされている。大腸菌を集菌後、超音波破碎し得られた上清を、ゲルろ過をおこない分画した。各画分のカドミウム濃度を測

定したところ、Cys残基の位置を1～2残基変化させた2種類のミュータントMT α およびCys残基とSer, Gln, Asp, Lys残基以外の構成アミノ酸残基を全てGly残基に置換したミュータントMT α およびコントロールの α -フラグメントは低分子量画分にカドミウムのピークが認められたが、その他のミュータントMT α はカドミウムのピークは認められなかった。また、これらの溶出試料のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこなったところ、ミュータントMT α 全てにおいて α -フラグメントと同じ位置にバンドが認められた。さらに、それぞれのカドミウムの存在が認められた精製標品の吸収スペクトルを測定したところ、 α -フラグメントと同様245～250nmにカドミウムとチオール基の結合を示す吸収の肩が認められた。以上のことより、ミュータントMT α は全て蛋白質としては発現したが、カドミウムと結合した形で発現したのは3種類ミュータントMT α であり、その他のミュータントMT α はカドミウムを結合した形では発現しなかった。興味深いことに、哺乳類でCys残基の位置は完全に保持されているにも係らず、Cys残基の位置を変化させた2種類のミュータントMT α はカドミウムと結合した形で発現していた。さらに、これらのカドミウムと結合したミュータントMT α のカドミウムに対する結合能をDTNB(5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸))を用いた動力学的解析により調べたところ、各ミュータントMT α は α -フラグメントほどではないが、これまでの研究により示されたワイルドタイプのMT(β -, α -フラグメントから成る)の結合能とはほぼ同程度の結合能を示していた。

以上の結果を総括すると、Cys残基以外の構成アミノ酸残基を全てGly残基に置換したミュータントMT α 等4種類のミュータントMT α はカドミウムと結合した形で発現しなかったが、Cys残基の位置を変化させた2種類のミュータントMT α および、構成アミノ酸残基のSer, Gln, Asp, Lys残基以外をGly残基に置換したミュータントMT α はカドミウムと結合した形で発現した。興味深いことに完全に保持されてきたCys残基の位置を変化させたミュータントMT α 2種類がカドミウムと結合した形で発現した。以上のことより、ミュータントMT α がカドミウムと結合するためにはCys残基だけでなくCys残基以外の構成アミノ酸残基も重要であるが、我々の過去の知見ともあわせると重要とわれてきたアミノ酸残基および完全に保持されてきたCys残基の位置にもある程度の自由度があることが明らかにされた。これらのことより、MTは考えられてきたよりも柔軟性をもって重金属と結合することが示唆された。本研究で得られた新たな知見は今迄の通説を覆すものであり、MTの重金属結合およびクラスター構造形成の機構の解明およびMTの金属蛋白質工学的な研究に大きく寄与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（地球環境科学）の学位をうけるのに十分な資格を有するものと判定した。