

Title	Nematode (Caenorhabditis elegans) のメタロチオネイン様蛋白質に関する研究
Author(s)	丸山, 幸治
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35141
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【7】

氏名・(本籍)	まる 丸	やま 山	こう 幸	じ 治
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	7 2 4 8	号	
学位授与の日付	昭和 61 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	薬学研究科応用薬学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当			
学位論文題目	Nematode(<u>Caenorhabditis elegans</u>)のメタロチオネイン 様蛋白質に関する研究			
論文審査委員	(主査) 教授 近藤 雅臣 (副査) 教授 岩田平太郎 教授 三浦 喜温 教授 内田 駿			

論 文 内 容 の 要 旨

メタロチオネインは、Cd, Zn, Cuなどの重金属を結合する分子量約 7000の蛋白質である。本蛋白質は、システイン含量が高く(哺乳類で約 30%)、芳香族アミノ酸を含まず、また、Cd, Zn, Cu, Hgなどの重金属イオンやホルモンなどによって誘導合成されるなどの特徴を有している。本蛋白質の生理的役割に関しては、これまで重金属の解毒あるいは貯留や移送機構に関与することが報告され、その重要性が論じられているが、未だ十分に解明されてはいない。

メタロチオネインは、1957年に Margoshes と Vallee がウマの腎皮質から発見して以来、原核生物から真核生物に及ぶ様々な生物種より見い出されている。現在では、そのうち、いくつかのメタロチオネインについてアミノ酸配列が明らかにされており、哺乳類においては、アミノ酸配列の相同性が指摘され、また、これらと他生物種との間にも共通な保存配列の存在が示され、この配列がメタロチオネインの生理的役割に重要であることが示唆されている。しかしながら、対象生物種が哺乳類を中心としたものであり、その検討は充分とは言えない。したがって、系統発生的に異なる様々な生物種からメタロチオネインを分離し、そのアミノ酸配列および遺伝子レベルでの解析を行うことは比較生物学的にも重要であり、さらにはメタロチオネインの生物学的意義の解明にも繋がるものと考えられる。

このような観点に基づき、未だメタロチオネインの存在が知られていない線形動物の一種 Caenorhabditis elegans に着目した。C. elegans は、大きさ約 1mm、細胞数 959 の雌雄同体で自家受精により増殖する食菌性の自活性土壌線虫である。C. elegans は、実験的扱いが容易で遺伝的解析も可能なことから、発生と分化を研究する格好のモデル生物として注目され、これまでに細胞分裂に伴う細胞系譜が完全に明らかにされている。

まず、C. elegans がメタロチオネイン様蛋白質を誘導合成するか否かを検討した。メタロチオネインの誘導金属である Cd に曝露した C. elegans を超音波破碎し、105000 xg, 60 分間の超遠心により細胞質画分を調製し、ゲルろ過による分画を行った。溶出された画分の Cd 濃度および 254nm の吸光度を測定したところ、他生物の既知メタロチオネインの溶出位置とほぼ一致する画分に Cd が検出された。この画分の Cd 濃度および Cd-thionein に特徴的な 254 nm の吸光度は、曝露期間に伴って増加したことから、C. elegans が、Cd により、メタロチオネイン様蛋白質を誘導合成することが示唆された。

次に、このメタロチオネイン様蛋白質をさらに陰イオン交換クロマトグラフィにより分離精製したところ、哺乳類などと同様、二種類 (MT-I および MT-II) に分離された。そこで、これらの諸性質を検討し、既知メタロチオネインの範ちゅうに属するか否かを判定した。

UV スペクトルは、既知メタロチオネインと同様で、250nm 付近に吸収のショルダーが存在し、280nm の吸収はほとんど認められなかった。この 250nm 付近の吸収は、pH を 1 に下げると消失することから、Cd-mercaptide bonds の存在が示唆された。また、分子量は、ゲルろ過法により、MT-I : 約 7400, MT-II : 約 6800 と推定された。MT-I と MT-II には、共に Cd の他に Zn と Cu が検出されたが、その含有量は各々異なっていた。電気泳動的に均一であった MT-II の抗体を調製し、他のメタロチオネインとの交叉反応性を検討した。その結果、MT-I と MT-II は同一抗原性を有しているが、ラットのメタロチオネインとは異なることが示された。ここで通常のカラム操作では、MT-I の精製が不完全であったので、その精製法について種々検討し、逆相系カラムを用いた高速液体クロマトグラフィによる精製法を確立した。この方法により精製分取した MT-I および MT-II のアミノ酸組成を測定したところ、システイン含量は、各々、22.3% および 21.9% であり、構成アミノ酸中、最も高い値であった。次いで、Asp, Glu, Ala, Lys 含量が高かったが、Tyr, Phe などの芳香族アミノ酸は検出されなかった。

以上の諸性質より、陰イオン交換クロマトグラフィにより二本に分離された C. elegans のメタロチオネイン様蛋白質 (MT-I および MT-II) は、既知メタロチオネインの範ちゅうに属するものと結論された。

C. elegans のメタロチオネインは、システイン含量が約 20% であり、Asp-Glu の酸性アミノ酸含量の高いことが特徴的であった。この特徴は、哺乳類のメタロチオネインよりは、むしろ系統発生的に低位な生物種 (ミミズや酵母) のものと類似していた。したがって、システイン含量が 20% 程度で、酸性アミノ酸含量の高いことは、系統発生的に低位な生物種のメタロチオネインに共通であることが推察された。

論文の審査結果の要旨

メタロチオネインの生物学的意義を明らかにするため、比較生物学的観点に立ち、これまで本蛋白質

の存在が知られていなかった Nematode を用い検討し、以下の事実を明らかにした。

すなわち、C. elegans はカドミウムの存在によりメタロチオネイン誘導合成することを明らかにし、更に精製の段階で2種のメタロチオネインが存在することを確認した。これらのメタロチオネインに関する物理化学的、タンパク質化学的検討を行ないそれぞれ特徴ある性質を示し、アミノ酸組成などから考えて動物よりもむしろ酵母に含まれるメタロチオネインに近いものと判定された。

以上の研究成果は重金属の生体影響に関する研究に有益な知見を加えるとともに、メタロチオネインを中心とした比較生物学的研究に先鞭をつけるものと評価し、薬学博士の称号を授与するに値するものと判定した。