

Title	Production and Characterization of Human Metallothionein and Its Domains
Author(s)	洪, 星慧
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42325">https://hdl.handle.net/11094/42325</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	洪 星 憲
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 16195 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	Production and Characterization of Human Metallothionein and Its Domains (ヒトメタロチオネインおよびそのドメインの生産と性質に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 室岡 義勝
	(副査)
	教授 菅 健一 教授 吉田 敏臣 教授 塩谷 捨明
	教授 原島 俊 教授 卜部 格 教授 福井 希一
	教授 小林 昭雄 教授 関 達治 教授 金谷 茂則
	教授 二井 将光 助教授 山下 光雄

### 論文内容の要旨

本論文は、遺伝子工学的な技術を利用し、重金属結合タンパク質であるヒトメタロチオネインおよびそのドメインの大腸菌による生産系を開発し、重金属結合特性などの性質を研究したもので、緒論、本文3章及び総括より構成されている。

緒論では、既知のメタロチオネインの一般的な性質と分類、構造、分光光学的及び生化学的特徴について述べると共に、本研究の目的について述べている。

第1章では、重金属結合量を増やすためヒトメタロチオネインのオリゴマーをデザインしている。大腸菌の宿主ベクター系を利用し、効率の良い発現システムを開発している。メタロチオネイン遺伝子をリンカーで連結して発現させた2量体および4量体オリゴマーは、モノマーの2倍および4倍量の重金属を結合することを示している。

第2章では、ヒトメタロチオネインモノマーの高効率大量生産システムを確立している。メタロチオネインをインテインタパク質と融合させたプラスミドを構築し、発現させている。還元剤を用いて融合タンパク質を切断し、金属を含まないアポチオネインを精製している。組換え法により得られたタンパク質は、ヒトより精製されたタンパク質と同一であることをMALDI-TOF-MS、CDスペクトルおよび重金属親和性により確かめている。

第3章では、本タンパク質を構成している二つのドメインを別々に発現させることに成功している。ヒトメタロチオネインはドメイン単位で独立的に機能を持つ形で発現していることを見いだしている。インテイン発現系により変異βドメインを生産し純化することに成功している。これら2つのドメインとその変異タンパク質の金属結合親和性やCDスペクトル等の諸性質を調べている。

総括では、本研究の成果、意義を要約し、今後の課題と展望について述べている。

### 論文審査の結果の要旨

最近、環境負荷の観点から、生分解性機能性高分子の重要性が認識され始めている。その中で、重金属を結合するタンパク質は興味のもたれるところである。本論文は、遺伝子工学とタンパク質工学的な技術を利用し、重金属結合タンパク質であるヒトメタロチオネインの大腸菌による生産とその純化により諸性質を研究したもので、主な成果は

以下のとおりである。

- (1)重金属の結合量を増やし大腸菌の中で分解されないように、ヒトメタロチオネインのオリゴマーをデザインしている。このデザインした遺伝子を異種遺伝子の発現のための効率の良い発現システムを開発して高発現させている。メタロチオネイン遺伝子をリンカーで連結して発現させた2量体および4量体オリゴマーがモノマーの2倍および4倍量の重金属を結合することを明らかにし、新規バイオマテリアルの生産に成功している。
- (2)一方、モノマーメタロチオネインの純化タンパク質がその構造と機能を明らかにする上で必要なために、ヒトメタロチオネインモノマーの高効率大量生産システムを確立している。メタロチオネインをインテインタンパク質と融合させたプラスミドを構築し、発現させている。ついで、還元剤を用いて融合タンパク質を切断し、金属を含まないアポチオネインを精製している。組換え法により得られたタンパク質は、ヒトより精製されたタンパク質と同一であることをMALDI-TOF-MS、CDスペクトルおよび重金属親和性により確かめている。
- (3)さらに細かく構造と重金属結合能を解析するため、メタロチオネインモノマータンパク質を構成している二つのドメインを別々に発現させることに成功している。ヒトメタロチオネインはドメイン単位で独立的に機能を持つ形で発現していることを見いだしている。こうして、インテイン発現系により変異 $\beta$ ドメインを生産し純化することに成功している。これら2つのドメインとその変異タンパク質の金属結合親和性やCDスペクトル等の諸性質を調べ、その特徴を明らかにしている。

以上のように、本論文は、生体内においても有用であり、またバイオマテリアルとしても有望なヒトメタロチオネインとその2つのドメインおよびオリゴマータンパク質の細菌による高生産系を開発し、その諸性質を明らかにしている。この研究を基にして、重金属で汚染された土壌などのバイオレメディエーションとしての応用が考えられている。よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。