
主論文

分裂酵母 (Schizosaccharomyces pombe) に
誘導される Cd-結合ペプチドの精製、
構造および性質

村杉 章

分裂酵母 (Schizosaccharomyces pombe) に
誘導される Cd-結合ペプチドの精製、
構造および性質

村杉 章

目 次

I.	要 約	-----	1
II.	序 論	-----	3
III.	材料および実験方法	-----	5
1.	材 料	-----	6
2.	実験方法	-----	7
(1)	Cd の 定 量	-----	7
(2)	ペプチドの定量	-----	8
(3)	SH 基の定量	-----	8
(4)	アミノ酸分析	-----	8
(5)	ろ紙電気泳動	-----	9
(6)	CD スペクトル	-----	10
(7)	Cd-BP1 および Cd-BP2 の誘導	-----	10
(8)	誘導された Cd-BP1 および Cd-BP2 の合成量の測定	-----	11
(9)	Cd-BPs の $[^3\text{H}]$ シスチンによる 標識	-----	12
(10)	Cd-BP1 および Cd-BP2 の精製	-----	13
IV.	結果と考察	-----	16
1.	Cd-BP1 と Cd-BP2 の誘導	-----	16

(1) 誘導時間による変化	16
(2) [^3H] シスチンによる Cd-BPs の 標識	19
(3) Cd-BP1 と Cd-BP2 の存在比	20
2. Cd-BP1 と Cd-BP2 の性質	22
(1) 一般的性質	22
(2) UV および CD スペクトル	26
(3) Cd $^{2+}$ との分離および再結合	28
謝辞	31
引用文献	32
表および図	34

I. 要 約

分 裂 酵 母 (Schizosaccharomyces pombe) は、高濃度の $CdCl_2$ (たとえば 1 mM) を含む培地中で増殖し、大量の Cd を菌体内に取り込んだ。このとき同時に、 Cd -結合ペプチド 1 (Cd -BP1、分子量約 4000) および Cd -結合ペプチド 2 (Cd -BP2、分子量約 1800) が多量に誘導合成されることがわかった (1)。これらの Cd -結合ペプチド (Cd -BP1 および Cd -BP2) は、 N -末端がグルタミン酸であり、7個のアミノ酸からなる同一の単位ペプチド (Cys_3, Glu_3, Gly_1) と Cd 原子で構成されている。 Cd -BP1 および Cd -BP2 の native な状態での分子量、単位ペプチドの分子量、および Cd 量とペプチド量との関係から、 Cd -BP1 は、4モルの単位ペプチドと6グラム原子の Cd 、 Cd -BP2 は、2モルの単位ペプチドと2グラム原子の Cd から構成されていると考えられる。このようにペプチドあたりの Cd 含量が異なっているので、この2種の Cd -BPs における Cd 結合様式は異なるものと考え

られる。これは、Cd-BP1 と Cd-BP2 の UV および CD スペクトルからも示唆された。また、酸性 (pH 2) で処理することによって、Cd-BP1 から Cd-BP2 への変換が可能であることも明らかとなった。

1 mM CdCl₂ によって、Cd-BP1 および Cd-BP2 が分裂酵母に誘導合成される時、時間を追ってそれらの量を、結合している Cd 量で示すと、初期には、Cd-BP1 に比べて Cd-BP2 が多いが、時間を経るに従って Cd-BP1 が増加し、約 5 時間でほぼ同量となった。その後も時間がたつに従って Cd-BP1 の量が増加し続け、やがてプレートに達した。また、誘導時間を一定 (17 時間) にして、培地中の CdCl₂ の濃度を変化させたとき、培地中の CdCl₂ 濃度が増加するに従って、Cd-BP2 に対して Cd-BP1 の割合は増大した。この二つの実験例では、ともに細胞がたくさんの Cd を取り込むようになる時、その量に従って Cd-BP1 の割合が増加することを示している。したがって細胞が取り込んだ Cd 量に

よって、Cd-BP1 と Cd-BP2 の量比が決められると考えられる。

ここで得られた Cd-BP1 および Cd-BP2 の単位ペプチドは、in vitroにおいて Cd^{2+} による酵素活性の阻害を防ぐことから、in vivoにおいても、細胞内に入ってくる Cd^{2+} と結合することによって、この Cd^{2+} による酵素活性などの阻害を防ぐ働きをしていると考えられる。この観点から考えると、細胞内に取り込んだ Cd 量が増加するに従って、より効率よく Cd を捕捉する Cd-BP1 が増加することは、酵母細胞にとって非常に都合の良いことであろう。

II. 序 論

メタロチオネインは、分子量の小さい、多量の金属を結合しているタンパク質であり、その構成アミノ酸のうち、システインの占める割合は、約 30% と非常に大きい。これは、大量にカドミウムが蓄積しているウマ腎臓の皮質 (2) から初めて単離された (3)。その後、

ヒト、マウス、ラットからアカパンカビに至るたくさんの生物種から純化され、アミノ酸の配列が決定されてきた (4-19)。

メタロチオネインは、生体内においてカドミウムなどの有害な重金属の毒性をおさえたり (20-22)、亜鉛を貯蔵していて、活性発現に亜鉛を必要とする酵素にこれを与える役割を果たしていると考えられている (23, 24)。

マウスなどにカドミウムを皮下または腹腔内に注射して与えると、肝臓や腎臓にカドミウムチオネインが大量に誘導されるが、これはカドミウムを与えることによつて、結果的にチオネイン遺伝子の転写が促進される為であることがわかった (25)。またマウスの多くの培養細胞においても、細胞の種類によつて程度の違いはあるものの、カドミウムによる誘導現象が観察される (26)。これらの中には、カドミウムが与えられると大量のチオネインを合成して、非常に高濃度のカドミウムに耐えられる細胞があるが (selected Friend Leukemia

cells) 、この細胞のチオネイン遺伝子は、増幅されていることがわかった(27)。逆にカドミウムによって誘導しても、チオネインを合成しないものもある(mouse Thymoma cells, W7)。この細胞については、チオネイン遺伝子とそのまわりのDNAにメチル化塩基が多いので、その遺伝子の発現が妨げられる結果であると説明されている(28)。一方、酵母では、カドミウムによって誘導合成されるCd-結合物質が存在するという確かな報告さえなかった。しかし、われわれは、Cdを菌体内にとりこみ、しかも増殖できるものであればメタロチオネイン様の物質があるはずであると考えて探索した結果、分裂酵母(S. pombe)中にCdによって誘導合成される物質(Cd-BP1およびCd-BP2)があることを見いだした。さらにこの物質の構造および性質について明らかにした。

III. 材料および実験方法

1. 材料

Sephadex G-50 (SF) は、Pharmacia Fine Chemicals AB から、DEAE-セルロース (DE-52) は、Whatman Inc. から、Bio-Gel P-4 は、Bio-Rad Laboratories から入手した。ニトロセルロースフィルター (HAWG 047) は、Millipore Ltd. から、 $[^3\text{H}]$ シスタン (1.2 Ci/mmole) は、The Radiochemical Centre, Amersham から購入した。過ギ酸酸化 (29) したインシュリン A 鎖は、Sigma Chemical Co. の子牛すい臓のインシュリンから調製した。バシトラシン、馬のチトクロム C、そして馬のミオグロビン は、Sigma Chemical Co. から購入した。牛すい臓リボヌクレアーゼ A、子牛すい臓の塩基性トリプシンインヒビターは、Worthington Biochemical Corp. から購入した。カルシトニン (ヒト)、ニューロテンシン、フィサレミン、血清胸腺因子およびロイシン-エンケファリンは、蛋白質研究奨励会ペポチド研究所 (大阪) から入手した。Agasol-2 および Protosol は、New England Nuclear Corp. より購入した。マウス

(C57BL/6J) の Cd-チオネイン I は、愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所の林幸正博士より、分裂酵母 [*S. pombe* L 972(h⁻)] は、名古屋大学理学部生物学教室の吉田和夫博士より供与された。以下に使用する「PBS」は、Dulbecco のリン酸緩衝塩類溶液 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 0.90 mM CaCl₂, および 0.49 mM MgCl₂ を含む pH 7.2 の溶液) (30), 「緩衝液 A」は、0.1 M KCl を含んだ 50 mM Tris-Cl (pH 7.6) の緩衝液である。

2. 実験方法

(1) Cd の定量

Cd は Perkin-Elmer 403 型 原子吸光分光光度計を使って測定した。酵母細胞の Cd 取り込み量の測定では、ニトロセルロースフィルター上で、表面に吸着した Cd を除くに十分な量の PBS を使って 3 回洗った細胞を、硫酸と数滴の硝酸で完全に分解して、試料とした。細胞の粗抽出液や、DEAE-セルロースおよび Sephadex

G-50のカラムクロマトグラフィーの画分は、
分解せずにそのまま試料とした。

(2) ペプチドの定量

Cd-BP1およびCd-BP2の精製における粗抽出液、78,000gの上清、DEAE-セルロースカラムの溶出液は、マイクロビレット法を使用した。最終段階であるSephadex G-50カラムからの溶出液は、硫酸アンモニウムを標準としたKjeldahl-Nessler法、あるいはロイシンを内部標準とした定量的アミノ酸分析によって行なった。

(3) SH-基の定量

p-クロルメルクリ安息香酸 (pCMB) と使い、RiordanとValleeの方法(31)に従って定量した。

(4) アミノ酸分析

試料は、分解前に、過キ酸酸化(29)、還元およびS-カルボキシメチル化(32)、あるいは

は S-アミノエチル化した (33)。Cd-BP1 を過ギ酸酸化し、減圧状態で 5.7N 塩酸中、110°C において 24 時間、48 時間、および 72 時間の分解を行なったが、互いに違いは見られなかった。またこの分解では、Cd が入っていても、結果として得られるアミノ酸の量比に大きな影響は現われなかった。

(5) ろ紙電気泳動

過ギ酸酸化した試料を pH 6.5 の緩衝液（ピロジン・酢酸・水、100:4:900 V/V）でしめらせた Whatman No. 1 ろ紙にスポットし、ならべたスポットしたマーカー [Lys, Gly, Glu. および CysO_3H (システイン酸)] とともに約 1 時間、4°C で泳動した (30 V/cm)。泳動後風乾したろ紙をニンヒドリンのアセトン溶液 (0.2%) に浸して発色させた。S-アミノエチル化した Cd-BP1 についても同様の操作を行なった。pH 3.6 の緩衝液の組成は、ピロジン・酢酸・水 (1:10:89 V/V) であり、pH 7.0 の緩衝液は、

コリジン・1 N 酢酸・水 (36.3 : 185 : 3860)
 である。過キ酸酸化 BP1 は、泳動後発色させ
 たる紙を、島津ニ波長クロマトスキャナ (CS-
 910) を使ってスキャンした。

(b) CD スペクトル

CD スペクトルは、日本分光 (JASCO) J 20
 旋光分散計を使って室温で測定した。このと
 き光路長 0.5 cm のセルを使い、スキャンの速
 度は、10 nm/min あるいは 2 nm/min であつた。

(7) Cd-BP1 および Cd-BP2 の誘導

S. pombe を YEP 培地 (1 % 酵母抽出物、
 2 % ホリペプトン、および 2 % グルコース)
 で 1 晩培養し (30 ml)、これを $CdCl_2$ を含んだ
 新しい培地 (500 ml / 3l フラスコ中) に加え、
 29 °C で振とう培養した (8 の字回転振とう器
 で 72 回転 / 分) 。

Cd-BPs 精製の材料を得るための培養では、
 30 ml の前培養を、500 ml の $CdCl_2$ の入っていない

培地でもう一度培養し、これを 1 mM CdCl_2 の入った 10 l の YEP 培地に加え、20 時間通気培養した (29°C)。ここで得られた細胞 (湿重で約 100 g) は -75°C で保存した。

(8) 誘導された Cd-BP1 および Cd-BP2 の含量の測定

Cd^{2+} による誘導後 (約 530 ml の培養)、所定の時間には、光路長 1 cm のセルを使った 660 nm における吸光度 (A_{660}) を測定し、一部は細胞による Cd 取り込み量測定用として使い、 500 ml を 4°C で遠心して集め、PBS で 3 回洗った後、凍結させておく (-30°C)。この細胞を乳ぼろの中で石英砂とともにすりつぶし、 5 ml の緩衝液 A で抽出し、 $17,000 \text{ g}$ で 20 分間遠心して上清をとった。この抽出操作をもう一度くり返した。合わせた上清の 3 ml を、緩衝液 A で平衡化した Sephadex G-50 (SF) のカラム ($1.6 \times 53 \text{ cm}$) にのせ、同じ緩衝液 A で溶出し、 1.5 ml ずつに分画した。これらの操作はすべて 4°C

以下で行なった。Cd-BP1 と Cd-BP2 の量は、それぞれの領域 (Cd-BP1 は分画番号 45 - 52、Cd-BP2 は分画番号 54 - 59) に含まれる Cd 量で表わした。また Cd-BP1 と Cd-BP2 の割合も、それぞれの領域に含まれる Cd 量の割合で表わした。

(9) Cd-BPs の $[^3\text{H}]$ シスチンによる標識

S. pombe を酵母窒素ベース (6.7 mg/ml, Difco) とグルコース (2%) からできている合成培地中 ($\pm 1 \text{ mM CdCl}_2$) で、6 時間、29 °C で振とう培養し、これに $[^3\text{H}]$ シスチン (1.2 Ci/mmole) を加え (最終濃度 5 $\mu\text{Ci/ml}$)、30 分間標識した。標識後はすぐに氷水で冷やし、4 °C で遠心して細胞を集めた。細胞の抽出液 (約 2 ml) を、(8) と同様に作り同じ様にゲルろ過した。各画分について、一部を取り Aquasol-2 を加えて、 ^3H のカウントを測定した。また各画分の一部に、一定量の DEAE-セルロース (DE-52) を加えて、Cd-BP を吸着させ、緩衝液 A で洗ったのち、Protosol 1 ml を加えて 2 時間以上 45 °C

で加温してから、トルエンシンチレーターを加えて ^3H のカウントを測定した。

(10) Cd-BP1 および Cd-BP2 の精製 (34)

操作はすべて4℃以下で行なった。湿重量約50gの細胞から始めた。細胞の破壊は、乳ぼろの中で石英砂とともにすりつぶすか、またはガラスビーズ(直径200 μ)約50gと緩衝液A 50 mlを加えて、Virtis-45ホモジナイザーを使って、冷やすために休みながら60Vで合計10分間ホモジナイズした。緩衝液Aで抽出した粗抽出液約100 mlを緩衝液Aで平衡化したDEAE-セルロース(DE-52)カラム(1.0 x 12 cm)に吸着させた後、緩衝液Aから0.5 M KClを含んだ50 mM Tris-Cl (pH 7.6)へのKClの直線的濃度勾配(合計200 mlの溶出液)によって溶出した(図1(a))。3 mlずつに分画した。Cd-BPsに含まれると思われるCd- \times ルカポチド結合には、250 nmに吸収のピークがあり(4)、一方、後で示すようにCd-BP2では280 nmには

とんど吸収がないのに対して Cd-BP1 では 250 nm における吸収の約 40% の吸収があるので、図 1 では、Cd 濃度とともに A_{250} と A_{280} を示した。Cd は、素通りの部分にはおぼつかずあり、ほとんどが、0.12 M KCl 付近に大きなピークとして溶出された。このピークには、Cd-BP1 および Cd-BP2 が含まれているはずである（図 3 (d) 参照）。ここに述べているものと同じスケールの予備実験において、Cd-BP2 は Cd-BP1 より早く DEAE-セルロースカラムから溶出されることがわかっており、その位置は、Cd の大きなピークの溶出され始めた部分であった。したがって分画番号 41、42 を Cd-BP2 画分として集め、分画番号 43 - 52 を Cd-BP1 画分として集めた。これらとそれぞれ凍結乾燥によって濃縮し、緩衝液 A で平衡化した Sephadex G-50 (SF) カラム (1.6 x 53 cm) にのせ、緩衝液 A で溶出し、1.5 ml ずつに分画した。Cd-BP1 の溶出パターンは図 1 (b)、Cd-BP2 は図 1 (c) に示した。Cd-BP2 は、その溶出のピークが分画番号 56 付近であ

ること〔図3(b)〕から判断して、図1(c)の分画番号54-60の部分を集めた。Cd-BP1は、その溶出位置が分画番号49、または50にあること〔図3(b)〕から判断して、分画番号47-53を集めた。また分画番号55-60は、Sephadex G-50のカラムで再クロマトして、Cd-BP2を得た。ホモジナイザーを使って細胞を破壊した場合のCd-BPsの精製の結果を表1に示す。ペブチド量は、約23mgにもなり、非常にたくさん Cd-BPs が誘導されていることがわかる。また粗抽出液に含まれていたCdの59%が、精製されたCd-BPsに保持されていた。

細胞を破壊してCd-BPsを抽出する際に、これがタンパク質分解酵素などで変化を受けている可能性もあるので、穏やかな凍結融解法によってCd-BPsの抽出を試みた(35)。Cd-BPsの抽出量は、石英砂とともに乳ばちですりつぶした時の約半分であった。Sephadex G-50とDEAE-セルロースのカラムで精製したCd-BP1を過キ酸酸化し、6Mグアニジン塩酸塩中で、

Bio-Gel P-4 を使って分画し、その大きさを他の方法で抽出したものと比較した。その結果、大きさは全く同じであった。後に述べる様に、酵母を石英砂ですりつぶしても、ホモジナイザーで破壊しても、Cd-BPs の構成ペプチドは均一であることから、タンパク質分解酵素が作用していることは考之にくい。

IV 結果と考察

1 Cd-BP1 および Cd-BP2 の誘導

(1) 誘導時間による変化 (1)

分裂酵母を 1 mM CdCl_2 を含む培地で培養すると、大量の Cd を菌体内に取り込みながら増殖し、20 時間をこえるとやがてプレートに達する (図 2)。細胞あたりに取り込まれた Cd 量は、約 10 時間までは、すみやかに増加するが、その後はほぼ一定となった (図 5 参照)。このとき細胞の湿重量 1 g あたり約 0.5 mg の Cd が蓄積している。次に、誘導時間を追って、細胞の抽出液をゲルろ過し、Cd-BP1 と Cd-BP2

の量を測定した結果を図3に示した。但し、Cd-BPsは、細胞 10^{10} 個に含まれる量を表わしている。CdCl₂を培地に与えなければ、Cdも250nmの吸収もCd-BPsの位置には存在しない〔図3(a)〕。しかし、CdCl₂を与えた酵母では、5時間後には、多量のCd-BP1とCd-BP2が現われて来る〔図3(b)〕。9時間半後には更に増加しており、特にCd-BP1の増加は著しい〔図3(c)〕。細胞あたりに含まれるCd-BPs(1と2の和)の量は、図3(d)で明らかたように、誘導後10時間まで急激に増加し、その後は一定の値となった。この現象は、細胞あたりに取り込まれたCd量の変化に対応している(図5)。Cd-BPsの合成は、取り込まれたCd量によって決められるのか、あるいは逆に、最大合成量が、取り込むCd量を規制するのか。Cd-BPsの合成量とCdの細胞内への取り込み量との関係は、重金属に対する防御の機構を考える上で興味深い。

CdCl₂をこの酵母に与えることによってCd-

BP_s が誘導されたことを確かめるために、
CdCl₂ を加えない培地で培養した酵母の細胞抽出液に、最終濃度 0.5 mM の CdCl₂ を加え、同じようにゲルろ過した。すると、Cd-BP₂ の溶出位置付近に A₂₅₀ のピークを伴った Cd のピークが現われた。しかしこれは、A₂₅₀ と Cd 濃度との比が Cd-BP_s と大きく異なっていた。また同じゲルろ過をもう一度行なうと、Cd のピークと A₂₅₀ のピークはともに見かけの分子量が小さくなり、画分ごとに A₂₅₀ と Cd 濃度との比を算出してみると、もはや一定の値を示さなかった。さらに、この A₂₅₀ のピークの 80% 以上を集めて、緩衝液 A で平衡化した DEAE-セルロースのカラムに吸着させ、0.5 M までの KCl の直線的濃度勾配で溶出した。すると Cd²⁺ は素通りし、あとの画分には Cd が検出できなかった。従って、CdCl₂ を与えていない酵母の抽出液には、Cd-BP と思われる物質は存在しない。また、後で述べるように、Cd-BP を形成するペプチドの構成アミノ酸は、Cys, Glu および Gly であり

グルタチオンと同じである。そこで還元型グルタチオンと $CdCl_2$ を中性 (pH 7.6) で混合し、ゲルろ過した。この場合も一度目は、 $Cd-BP_2$ の溶出位置近くに Cd と A_{250} のピークがあるが、再クロマトでやはり Cd を放出してしまう。すなわち後で述べるように、 Cd との結合力が弱い (図 14)。さらに CD スペクトルも全く違っていているので、 $Cd-BPs$ を形成するペプチドとグルタチオンは、同一のものではない。

(2) $[^3H]$ シスチンによる $Cd-BPs$ の標識

Cd^{2+} によって $Cd-BP$ が新たに誘導合成されるならば、 $[^3H]$ シスチンが細胞内に入れば、すぐに $Cd-BP$ は標識されるはずである。1 mM $CdCl_2$ により 6 時間誘導してから 30 分間標識した。細胞抽出液の Sephadex G-50 によるゲルろ過の結果 (図 4)、明らかに $Cd-BP_1$ の位置に 3H のピークが現われた。 $Cd-BPs$ は DEAE-セルロースに吸着するので、各画分についての、DEAE-セルロースに吸着する 3H のカウントを測定し

たところ、もともと量が少ないためか Cd-BP2 のピークはほとんど検出できなかつたが、Cd-BP1 の位置には、はっきりと³Hのピークが現われた。従つて、CdCl₂ の存在下で、分裂酵母は外から与えたシスチンを活発に取り込み、それを使って速やかに Cd-BP1 を作つていることがわかる。また、これは短時間標識なので、既存のタンパク質の分解などによつて作られるものではなく、アミノ酸から de novo に合成されていると考えられる。

(3) Cd-BP1 と Cd-BP2 の存在比

すでに(1)で述べたように、誘導後約10時間までは、細胞あたりの Cd-BPs の量は急激に増加するが、この時 Cd-BP1 と Cd-BP2 の割合も刻々と変化している(図5)。この現象を調べるために、培地中の CdCl₂ の濃度を 0.1 mM から 4 mM まで変えて、Cd-BPs を一定時間(17時間)誘導合成させた。図6に示すように、細胞あたりの Cd 取り込み量も、Cd-BP1 の量も、培地

中の $CdCl_2$ 濃度に応じて増加した。これに対し
て $Cd-BP2$ の量は、やや複雑な変化を示した。
しかし、 $Cd-BP1$ と $Cd-BP2$ の割合をプロットし
て見ると (図7)、図5と同様に、取り込んだ
 Cd 量と関係があると思われた。そこで、こ
の二つの図をまとめて、細胞あたりに取り込
まれた Cd 量に対して、 $Cd-BP1$ と $Cd-BP2$ の割合
をプロットすると、図8のように各点が分布
した。従って、 $Cd-BP1$ と $Cd-BP2$ の割合は、細
胞が取り込んだ Cd の量によって決められると
考えられる。また15時間、 $1\text{ mM } CdCl_2$ 中で培養
して、 $Cd-BPs$ を誘導し、その後培地から $CdCl_2$
を除いて培養すると、当然細胞中の Cd 濃度は、
徐々に減少するが、これにともなって、相対
的に $Cd-BP2$ の割合が高くなることも、上記の
考えを支持している。後で述べるように、 $Cd-$
 $BP1$ は単位となるペプチド (Cys_3, Glu_3, Gly_1)
4モルと Cd 6グラム原子からできっており、 $Cd-$
 $BP2$ は、同じペプチド2モルと Cd 2グラム原
子からできていると考えられ、単位ペプチド

あたりの Cd の結合量は、Cd-BP1 が Cd-BP2 の 1.5 倍である。従って細胞内に取り込んだ Cd の量が増加してきた時、Cd-BP1 の割合が増えることは、細胞にとって好都合であろう。

2 Cd-BP1 および Cd-BP2 の性質

(1) 一般的性質

精製した Cd-BP1 は、過ギ酸酸化後および還元 S-カルボキシメチル化後アミノ酸分析した (表 2、図 9 (a) (b))。未処理の Cd-BP1 のアミノ酸分析 (図 9 (a)) は、過ギ酸酸化したペプチドの分析の際のコントロールであり、もとのペプチドには、システイン酸がないことを示している。また、pCMB による SH 基の滴定結果から、Cd-BP1 にはシスチンが存在しないことがわかった。したがって Cd-BP1 を構成しているペプチドに含まれるアミノ酸は、システイン、グルタミン酸およびグリシンである。このペプチドを還元 S-アミノエチル化すれば、システインは当然 S-アミノエチルシステイン

になる (図 9 (c))。またアミノ酸はグルタミン酸 3 モルに対して、0.3 モル以下しか検出されないのぞ、グルタミンは存在しない。このペプチドに Ehrlich 試薬 (36) を作用させたが、発色せず、pH 2 における UV スペクトルからもトリプトファンは含まれていないことが明らかであった。

TNBS (2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸) を使ってアミノ基を定量すると (37)、単位ペプチドあたり 1 個という結果を得、ガンシル化法によつて (38) その唯一のアミノ基がグルタミン酸のものであることがわかった (N 末端)。

フェノール・硫酸法 (39) によつて全糖の検出をしたが、グルコースを標準として、ペプチド量のわずか 0.2% しかないのぞ、このペプチドの構成成分ではありえない。

さらにペプチドの純度を確かめるために、ろ紙電気泳動を行なった。Cd-BP1 を過キ酸酸化すると、アミノ酸分析の結果から予想され

る様に、負の電荷が非常に多くなるので、中性の pH においてシステイン酸よりも早く正極の方向に移動した (図 10)。S-アミノエチル化した Cd-BP1 は期待通り、電氣的に中和されて、中性の pH ではグリシンと同じように原点からほとんど動かなかった (図 11)。いずれの場合も、単位ペーパーが非常に純度の高いものであることを示した。

Cd 1 グラム原子あたりの SH 基の数は、pCMB で測定した結果からは約 2.2、アミノ酸分析の結果からは、2.3 となり、マウスの Cd-チオネインの約 3 とは違っている。

一方、Cd-BP2 についても、いくつかの分析を行なった。アミノ酸分析では、表 2 に示す通り、Cd-BP1 との差は見られず、N 末端も同じグルタミン酸であった。また過ギ酸酸化したペーパーのろ紙電気泳動でも Cd-BP1 と同じ移動度を示し、また均一であることも確かめられた。しかし、そのペーパー量から算出される、1 グラム原子の Cd あたりの SH 基の数は、

マウスの Cd-チオネインと同じように約 3 であった。

Sephadex G-50 を使ったゲルろ過によって得られた、native な状態での Cd-BP1 と Cd-BP2 の分子量は、それぞれ約 4,000 と 1,800 と推定された〔図 12 (a)〕(40)。また過キ酸酸化した Cd-BP1 と Cd-BP2 の分子量を、6 M グアニジン塩酸塩中で Bio-Gel P-4 を使って推定すると、ともに約 950 であった〔図 12 (b)〕。アミノ酸組成から得られる最低分子量は、771 であり、これを過キ酸酸化すれば、915 になるはずであるから、ここで得られた分子量は、この最低分子量と一致している。この単位ペプチドの分子量は、今まで調べられたメタロチオネインの中では最も小さいものである。

以上の結果から、Cd-BP1 は、4 モルの単位ペプチドと 6 グラム原子の Cd、Cd-BP2 は、2 モルのペプチドと 2 グラム原子の Cd からできていて、その単位となっているペプチドは、組成が、 Cys_3 、 Glu_3 、 Gly_1 と表わされる同一のも

のであると考えられる。

(2) U V および C D スペクトル

単位ペロチドと結合した Cd^{2+} は、pH を下げると水素イオンと競合することによって解離する。図 13 (a) (b) は、 $Cd-BP1$ と $Cd-BP2$ のスペクトルが、pH によって変化する様子を示したものである。 $Cd-BP2$ のスペクトル変化は、マウスの Cd -チオネインのもの (図 13 (c)) とよく似ているが、 $Cd-BP1$ の場合は複雑であり、 $Cd-BP1$ の Cd^{2+} とペロチドの間には、 $Cd-BP2$ における相互作用の他に何か別の相互作用があることを想像させる。

$Cd-BP1$ 、 $Cd-BP2$ 、 Cd -チオネインおよび Cd -グルタチオンについて、pH に対する A_{250} の相対的变化を図 14 に示す。 $Cd-BP1$ は、複雑な変化をするので、そのまま比較するのは少し無理があるが、他は問題はないと思われる。 Cd とペロチドの結合力をこれからみると、マウスの Cd -チオネインが最も強く、次に $Cd-BP2$ 、

最も弱いのが Cd-グルタチオンであった。

次に Cd-BP1、Cd-BP2 および Cd-チオネインの CD スペクトルを 図 15 に示す。Cd-BP1 と Cd-BP2 に見られる負の極値 (257 nm) と Cd-BP1 のみに見られる正の極値 (275 nm) は、pH を下げた Cd²⁺ を離してしまふと、どちらの極値も消失してしまふ。従つてこれらの Cotton 効果は、単位ペプチドと Cd²⁺ の非対称な相互作用によつて生じたものと考えられる。これらの比較的長波長領域での extrinsic な Cotton 効果は、Cd-BP1 と Cd-BP2 においても、マウス Cd-チオネインと同様に Cd²⁺ が特異的な場所に結合していることを示している (41)。一方、マウスなどの Cd-チオネインは、257 nm において、これらの Cd-BPs とは逆に正の極値が存在している (図 15) (6, 41, 42)。この正負の違いは、例えば、右手型と左手型のような違いが、Cd-メルカプトチド結合をとり囲む微小な環境に存在するためかも知れない。また、Cd-BP1 の 275 nm における正の極値は、Cd²⁺ とペ

ペプチドの相互作用を含めて、何か別の分子構造の存在を示唆している。インシュリンにおいて、グルタミン酸残基に配位されているZnは、Cdで置換しうること(43)、またグルタミン酸やグリシルグルタミン酸が、 Cd^{2+} と錯体を作りうることなど(44)から、Cd-BP1の場合も、ペプチド中のグルタミン酸残基が、 Cd^{2+} との結合、あるいはペプチドのoligomerizationに関与している可能性が考えられる。

(1)で述べた結果と合わせて考えると、単位となるペプチドは、Cd-BP1とCd-BP2で同じであるが、分子量、 SH/Cd 、UVおよびCDスペクトルが違っているため、Cdとの結合様式が違っていると考えられる。すなわち、同一のペプチドが、2種類の形でCd-結合物を作るということになる。この現象は、このペプチドに特徴的なものである。

(3) Cd^{2+} との分離および再結合

Cd-BP1 溶液を pH 2 にするとペプチドは、

Cd^{2+} を放出し (図 16)、pH を中性にもどすと再び Cd^{2+} と結合する。また $Cd-BP1$ を還元剤で処理すると CD の極値は消失するが、その後還元剤を除けば、257 nm の極値は再び現われる。しかし 275 nm における正の極値は現われない。この時、みかけの分子量は、約 1,800 に変化し、UV および CD スペクトル (図 17、図 15 (a))、そして Cd 含量も $Cd-BP2$ と酷似していた。また Cd^{2+} を再結合した $Cd-BP1$ は、溶液の pH を下げると、そのスペクトル変化も、 A_{250} が pH 7.6 の値の 50% になる pH も $Cd-BP2$ と非常によく似ていた。以上のことは、 $Cd-BP1$ から $Cd-BP2$ への変換を示唆していると共に、同じペプチドが異なる結合様式で Cd と結合するという (2) における結論を支持している。

これまで述べてきた結果から、次のことが明らかになった。分裂酵母 (*S. pombe*) は、 Cd^{2+} にさらされると、 Cd^{2+} を細胞内に取り込み、同時に小さなペプチド (Cys_3 , Glu_3 , Gly_1)

を大量に合成する。このペプチドは、 $Cd-BP1$ (このペプチド4モルと Cd 6グラム原子を含む)と $Cd-BP2$ (このペプチド2モルと Cd 2グラム原子を含む)という2つの異なった形で Cd^{2+} と結合し、 $Cd-BP1$ の割合は、取り込んだ Cd の細胞内濃度が高くなるに従って大きくなる。

このペプチドが、細胞内で Cd^{2+} を捕捉し、酵素タンパク質などに対する Cd^{2+} の毒性をなくすることは容易に想像できる。確かに、トル酵母から精製したロイシル-tRNA合成酵素(35)は、非常に低濃度の Cd^{2+} でもその活性は阻害されるが(図18)、 Cd^{2+} を除いた $Cd-BP1$ (図16)を加えることによつて、阻害を受けなくなる(表3)。 $Cd-BPs$ は、このような機能の面からも、またペプチドの化学的な面からも、従来のいわゆるメタロチオンインと呼ぶにふさわしいものではあるが、また逆に違つていふ点も少なくない。従つて、このペプチドがどのように位置づけられるかは、他の

種々の生物におけるメタロチオネインや、重金属に対する防御機構の幅広い検討の結果をまとめるべきであろう。

この Cd-BP1 と Cd-BP2 に関しては、比較生化学的、重金属耐性、重金属との結合などの観点から、化学構造はもとより、生合成機構、Cd との結合様式に大きな興味を持たれるので、これらについて、研究を続行中である。

謝辞

この研究を始め、また進めるにあたって、終始激励し、ご指導下さいました、愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所の林幸正博士と、実験を手伝って下さった和田千玲さんに、お礼を申し上げます。

文 献

1. Murasugi, A., Wada, C. and Hayashi, Y. (1981) *J. Biochem.* 90, 1561-1564.
2. Margoshes, M. and Vallee, B.L. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813-4814.
3. Kägi, J.H.R. and Vallee, B.L. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 3460-3465.
4. Kägi, J.H.R. and Vallee, B.L. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 2435-2442.
5. Pulido, P., Kägi, J.H.R. and Vallee, B.L. (1966) *Biochemistry*, 5, 1766-1777.
6. Weser, U., Rupp, H., Donay, F., Linnemann, F., Voelter, W., Voetsch, W. and Jung, G. (1973) *Eur. J. Biochem.* 39, 127-140.
7. Kägi, J.H.R., Himmelhoch, S.R., Whanger, P.D., Bethune, J.L. and Vallee, B.L. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 3537-3542.
8. Buhler, R.H.O. and Kägi, J.H.R. (1974) *FEBS Lett.* 39, 229-234.
9. Prinz, R. and Weser, U. (1975) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356, 767-776.
10. Kojima, Y., Berger, C., Vallee, B.L. and Kägi, J.H.R. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3413-3417.
11. Naiki, N. and Yamagata, S. (1976) *Plant and Cell Physiol.* 17, 1281-1295.
12. Huang, I., Yoshida, A., Tsunoo, H. and Nakajima, H. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 8217-8221.
13. Kissling, M.M. and Kägi, J.H.R. (1977) *FEBS Lett.* 82, 247-250.
14. Ryden, L. and Deutsch, H.F. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 519-524.
15. Tsunoo, H., Kino, K., Nakajima, H., Hata, A., Huang, I. and Yoshida, A. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 4172-4174.
16. Kimura, M., Otaki, N. and Imano, M. (1979) in: *Metallothionein* (Kägi, J.H.R. and Nordberg, M., eds.) pp.163-168, Birkhäuser, Basel.
17. Lerch, K. (1980) *Nature* 284, 368-370.
18. Lerch, K., Ammer, D. and Olafson, R.W. (1981) *FEBS Lett.* 126, 165-168.
19. Huang, I., Kimura, M., Hata, A., Tsunoo, H. and Yoshida, A. (1981) *J. Biochem.* 89, 1839-1845.
20. Wiśniewska-Knyple, J.M. and Jabłońska, J. (1970) *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Biol.* 18, 321-327.
21. Hayashi, Y. and Mikami, E. (1981) *FEBS Lett.* 123, 265-268.
22. Friberg, L., Piscator, M., Nordberg, G.F. and Kjellstrom, T. (1974) *Cadmium in the Environment*, 2nd Ed, CRC Press, Cleveland, Ohio.
23. Udom, A.O. and Brady, F.O. (1980) *Biochem. J.* 187, 329-335.
24. Li, T.-Y., Kraber, A.J., Shaw III, G.F. and Petering, P.H. (1980) *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA 77, 6334-6338.
25. Durnam, D.M. and Palmiter, R.D. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5712-5716.
 26. Mayo, K.E. and Palmiter, R.D. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 2621-2624.
 27. Beach, L.R. and Palmiter, R.D. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2110-2114.
 28. Compere, S.J. and Palmiter, R.D. (1981) *Cell* 25, 233-240.
 29. Moor, S. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 235-237.
 30. Dulbecco, R. and Vogt, M. (1954) *J. Exp. Med.* 99, 167-182.
 31. Riordan, J.F. and Vallee, B.L. (1972) in: *Methods in Enzymology* (Hirs, C. H.W. and Timasheff, S.N., eds.) Vol.25, pp.449-456, Academic Press, New York.
 32. Hirs, C.H.W. (1967) in: *Methods in Enzymology* (Hirs, C.H.W. and Timasheff, S.N., eds.) Vol.11, pp.199-203, Academic Press, New York.
 33. Cole, R.D. (1967) in: *Methods in Enzymology* (Hirs, C.H.W. and Timasheff, S.N., eds.) Vol.11, pp.315-317, Academic Press, New York.
 34. Murasugi, A., Wada, C. and Hayashi, Y. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103, 1021-1028.
 35. Murasugi, A. and Hayashi, H. (1975) *Eur. J. Biochem.* 57, 169-175.
 36. Bennet, J.C. (1967) in: *Methods in Enzymology* (Hirs, C.H.W. and Timasheff, S.N., eds.) Vol.11, pp.330-339, Academic Press, New York.
 37. Fields, R. (1972) in: *Methods in Enzymology* (Hirs, C.H.W. and Timasheff, S.N., eds.) Vol.25, pp.464-468, Academic Press, New York.
 38. Gray, W.R. (1972) in: *Methods in Enzymology* (Hirs, C.H.W. and Timasheff, S.N., eds.) Vol.25, pp.121-138, Academic Press, New York.
 39. Dubois, M., Gilles, R.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) *Anal. Chem.* 28, 350-356.
 40. Andrews, P. (1964) *Biochem. J.* 91, 222-233.
 41. Rupp, H. and Weser, U. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 533, 209-226.
 42. Lam, A.Y.C. and Stillman, M.J. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94, 138-143.
 43. Sudmeier, J.L., Bell, S.J., Storm, M.C. and Dunn, M.F. (1981) *Science* 212, 560-562.
 44. Aylett, B.J. (1979) in: *The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium* (Webb, M., ed.) pp.26-43, Elsevier, Amsterdam, New York and Oxford.
 45. Vallee, B.L. (1979) in: *Metallothionein* (Kägi, J.H.R. and Nordberg, M., eds.) pp.19-40, Birkhäuser, Basel.

表 1. 湿重量 47g の *S. pombe* からの Cd-BP1 と Cd-BP2 の精製

精製段階	ペフチド量 ^a (mg)	Cd ^b ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ ペフチド)
粗抽出液	422	0.13
78,000g 上清	382	0.15
DEAE-セルロースカラム 溶出液		
Cd-BP1	32.8	1.22
Sephadex G-50カラム 溶出液		
Cd-BP1	19.3 ^c , 20.3 ^d	1.68 ^c , 1.60 ^d
Cd-BP2	3.5 ^e	0.94 ^e

a) ペフチド量は、c) d) を除いて、マイクロビウレット法で測定した。

b) 精製の最終段階での Cu と Zn は Cd 量 (w/w) の 1% に満たなかった。

c) ペフチド量は、Kjeldahl - Nessler 法で測定した。

d) ペフチド量は、定量的アミノ酸分析で測定した。

e) Cd-BP2 は、最終的な量のみを示した。

TABLE 2. Amino acid composition of Cd-BP1 and -BP2.

Amino Acid	Relative molar quantities ^a		
	Oxidized BP1 ^b	S-Carboxy- methylated BP1 ^b	Oxidized BP2 ^c
Glu ^d	3.0	3.0	3.0
Cys	2.8	2.7	2.7
Gly	0.9	1.0	1.2

^a Relative molar quantities of other amino acids are less than 0.1. NH₂-terminal amino acids Glu in both BPs, determined by the dancylation procedure. ^b The values represent the average of samples hydrolyzed for 24h and 72h. ^c The samples were hydrolyzed for 24h. ^d Ammonia detected was only 0.3 mol per 3 mol Glu. This table is reproduced with permission of Oxford University Press from reference 1: Cadmium-binding peptide induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*.

表 3. ロイシル-tRNA 合成酵素活性の保護

反応系に 加えた物質	活 性	
	leu-tRNA formed (pmol/10 min)	%
対 照	23.6	100
CdCl ₂ (8.3 μM)	9.6	43.1
BP ^a (0.7 μg) ^b	24.6	103.8
CdCl ₂ (8.3 μM) + BP ^c (0.7 μg) ^b	25.1	106.2

a) Cd²⁺ を除いた Cd-BP1 (図 1b)。

b) 単位ペナキド 0.7 μg は、約 15 μM である。

c) 反応系に酵素を加える前に BP を加えた。

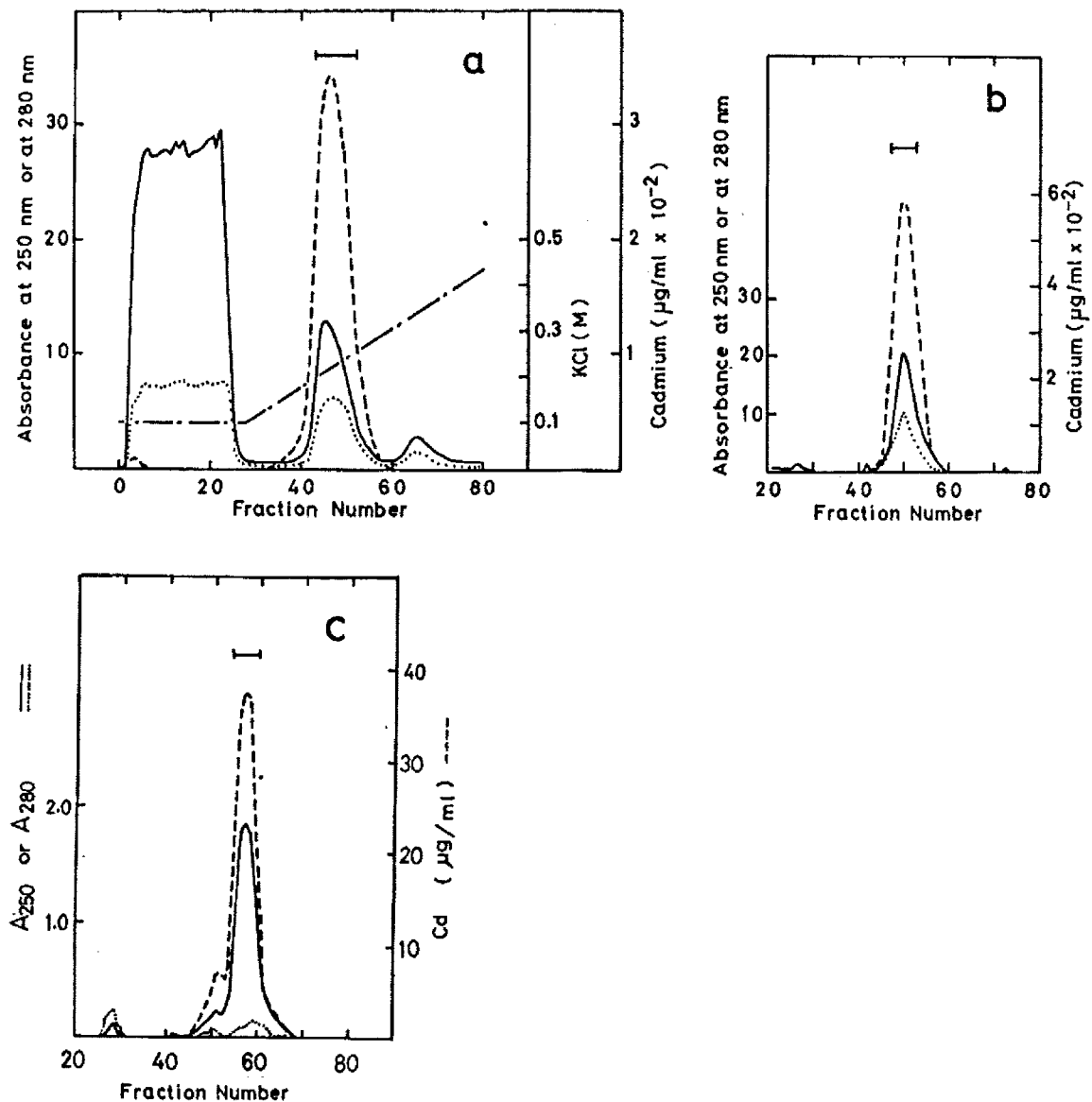


Figure 1. Purification of Cd-BP1 and Cd-BP2

Purification of Cd-BP1. (a) DEAE-cellulose column chromatography of 78 000 g supernatant. (b) Sephadex G-50 column chromatography of the collected fractions eluted from DEAE-cellulose. Absorbance at 250 nm (—); absorbance at 280 nm (-----); Cd concentration (---); KCl concentration (---); collected fractions (|—|). Figures (a) and (b) are

reproduced with permission of Elsevier from reference 34:
Purification and unique properties in UV and CD spectra of
Cd-binding peptide 1 from *Schizosaccharomyces pombe*.

Purification of Cd-BP2. (c) Sephadex G-50 column
chromatography of the eluate from DEAE-cellulose [fractions No.
41 and No. 42 in (a)]. Absorbance at 250 nm (———);
absorbance at 280 nm (- - - - -); Cd concentration (---);
collected fractions (┆┆).

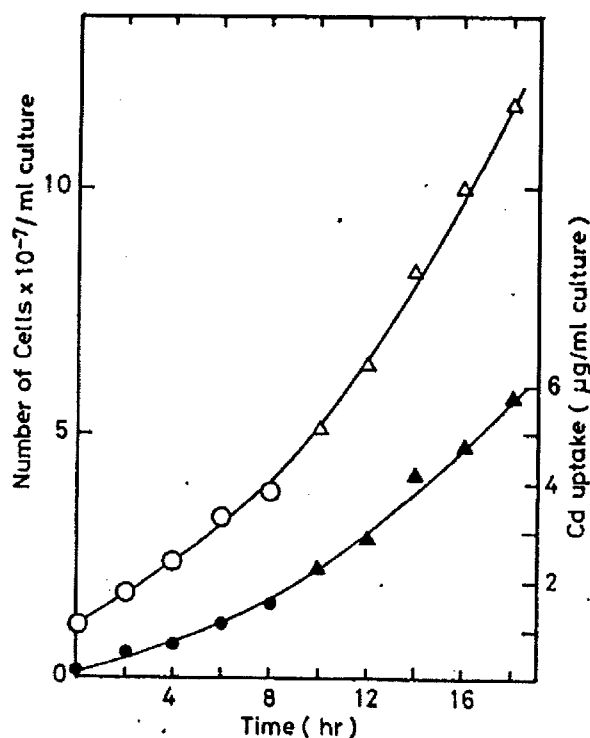


Figure 2. Cell growth in the presence of Cd^{2+} and cellular Cd uptake. Two 500 ml cell cultures in 3 liter-flasks were started at 1.7 A_{660} in the presence of 1 mM CdCl_2 and at two-hour intervals absorbance at 660 nm was read (A_{660} was converted into cells/ml) (\circ , \triangle) and cellular Cd uptake (\bullet , \blacktriangle) was determined. Circles and triangles indicate different culture flasks. This figure is reproduced with permission of Oxford University Press from reference 1: Cadmium-binding peptide induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*.

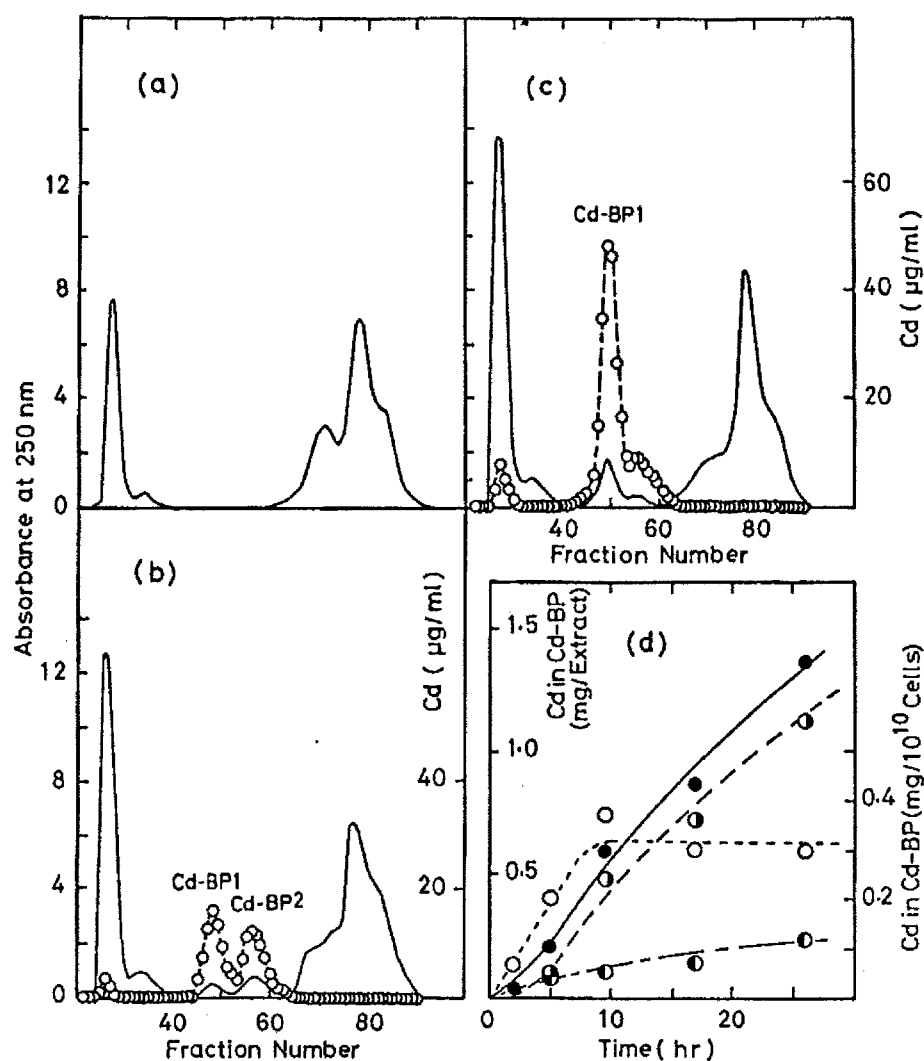


Figure 3. Induction of Cd-BPs analyzed by Sephadex gel filtration. Extracts of the fission yeast grown in Cd-medium were analyzed on a Sephadex G-50 (superfine) column (1.6 x 53 cm). Each fraction contained 1.5 ml of eluate. Extracts were obtained from cells of 500 ml cultures (a) without Cd²⁺, (b) with Cd²⁺ for 5 h and (c) with Cd²⁺ for 9.5 h. Absorbance at 250 nm (—) and Cd²⁺ concentration (○) in each fraction were determined and expressed as normalized values per 10¹⁰ cells.

Increases of Cd-BPs in extracts from 500 ml culture cells with time (d) were expressed as their Cd amounts. Cd-BPs in the total extract (●); Cd-BP1 in the total cell extract (◐); Cd-BP2 in the total cell extract (◑); Cd-BPs per 10^{10} cells (○). These figures are reproduced with permission of Oxford University Press from reference 1: Cadmium-binding peptide induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*.

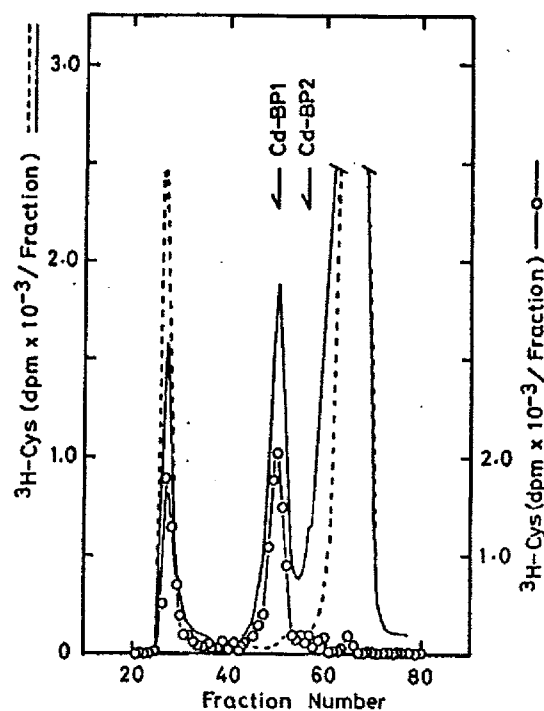


Figure 4. Incorporation of $[^3\text{H}]$ cysteine into Cd-BP. Cells were exposed to 1mM CdCl_2 for 6 h, then labeled for 30 min with $[^3\text{H}]$ cysteine ($5 \mu\text{Ci/ml}$). The extract was analyzed on a Sephadex G-50 column ($1.6 \times 53 \text{ cm}$). Each fraction contained 1.5 ml of eluate. Control cells were not exposed to CdCl_2 . Radioactivity of the extract from control cells (- - - -); radioactivity of the extract from Cd^{2+} -induced cells (———); DE-52 bound radioactivity of the extract from Cd^{2+} -induced cells (\circ). This figure is reproduced with permission of Oxford University Press from reference 1: Cadmium-binding peptide induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*.

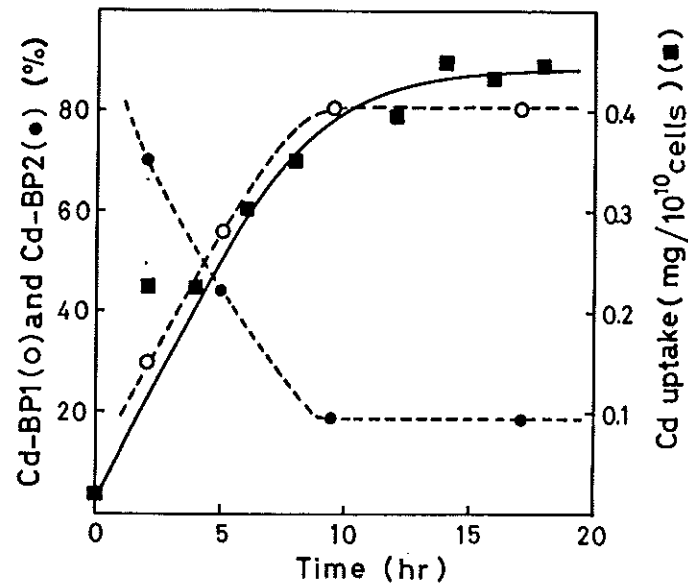


図 5. 誘導時間による Cd-BP1 と Cd-BP2 の割合の変化

細胞あたりに取り込まれた Cd 量は、図 2 のデータから、また時間によって変化する Cd-BP1 と Cd-BP2 の割合は、図 3 (d) から計算してプロットした。

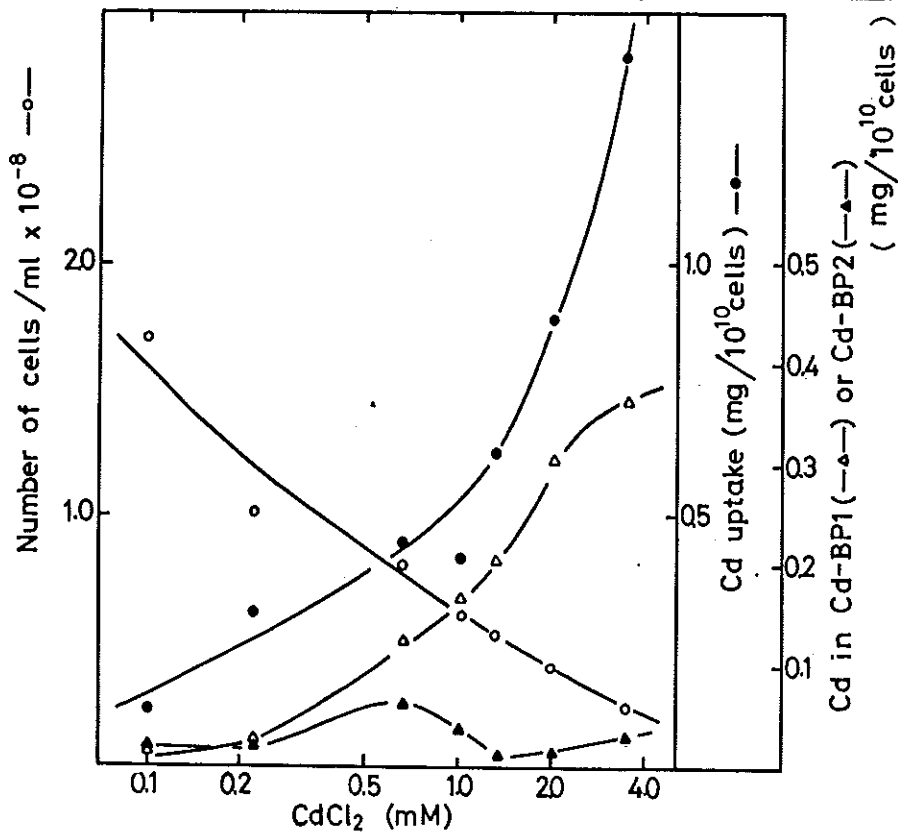


図6. 細胞へのCd取り込み量とCd-BP1、Cd-BP2の量に対する培地中のCd²⁺濃度の影響。培養は約 1.3×10^7 細胞/mlの濃度で始めた。Cd-BP1 (△)、Cd-BP2 (▲)、細胞中へのCdの取り込み量 (●)、および細胞濃度 (○)を示した。

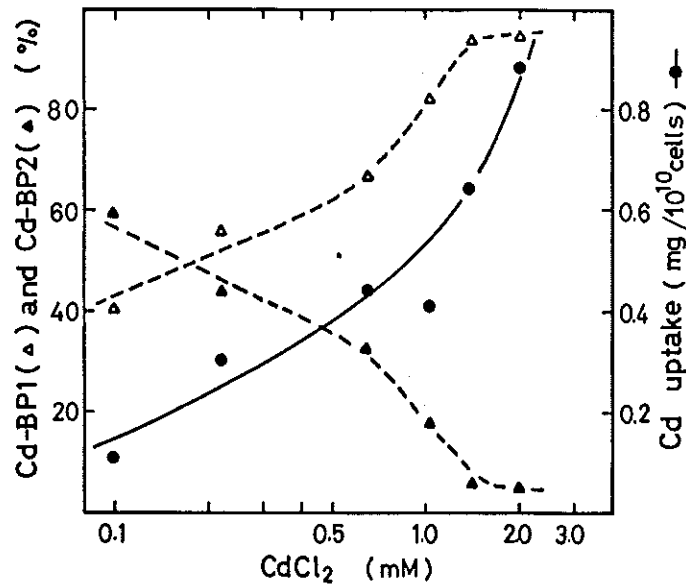


図7. Cd-BP1 と Cd-BP2 の割合に対する培地中の Cd^{2+} 濃度の影響。

図6の値から Cd-BP1 と Cd-BP2 の割合を計算し、細胞あたりに取り込まれた Cd 量とともにプロットした。

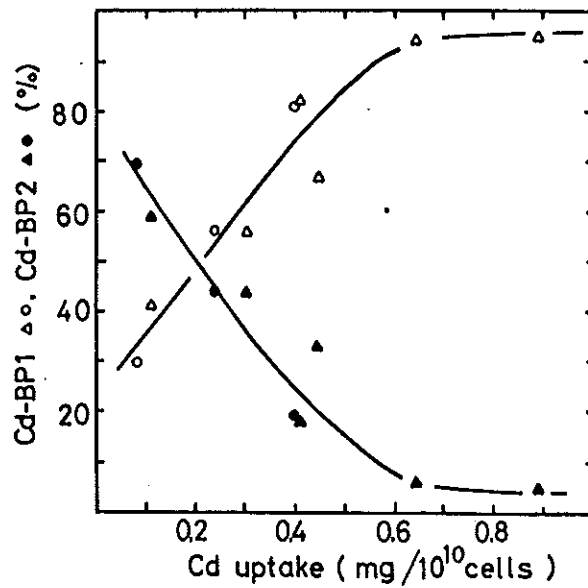
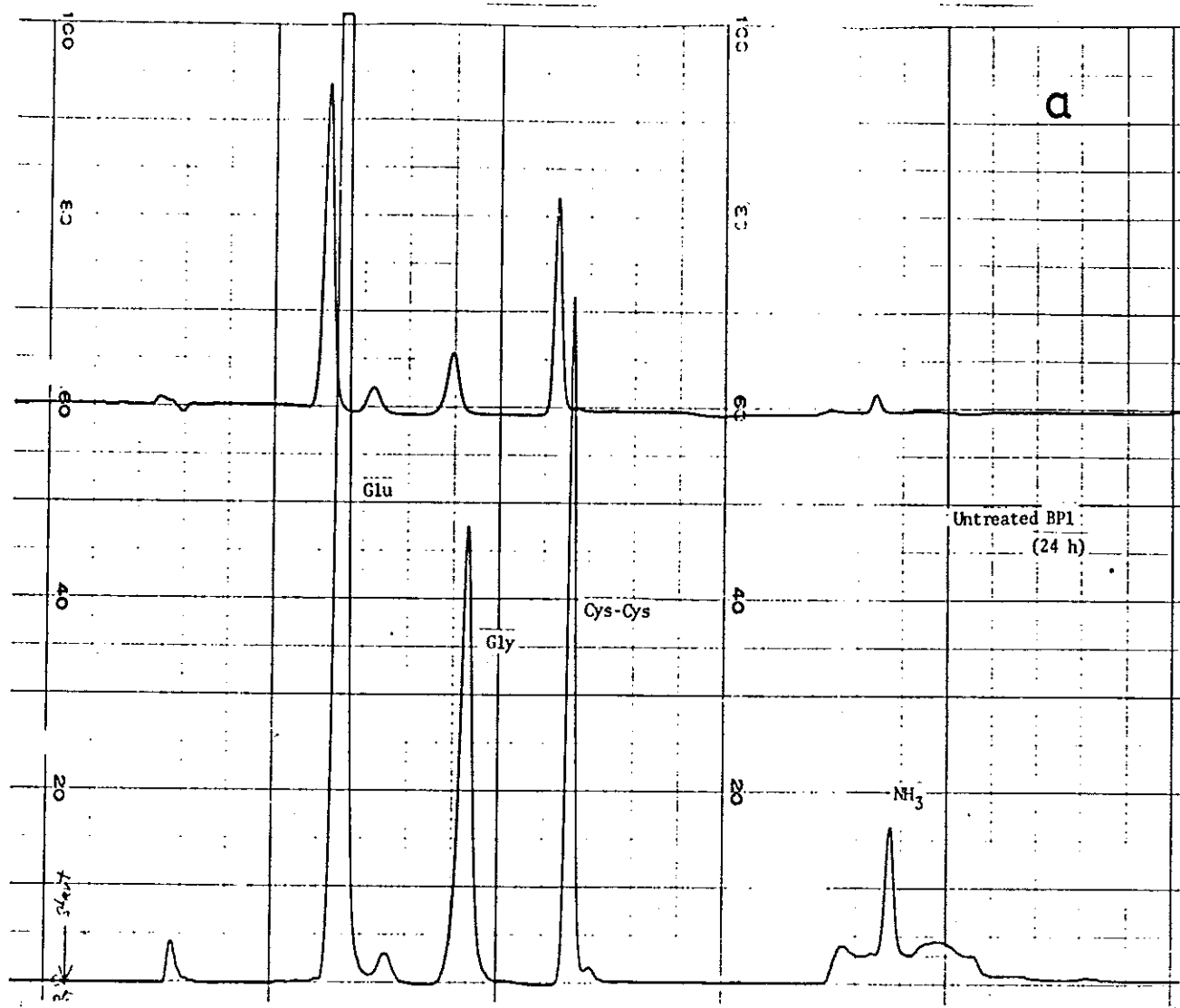


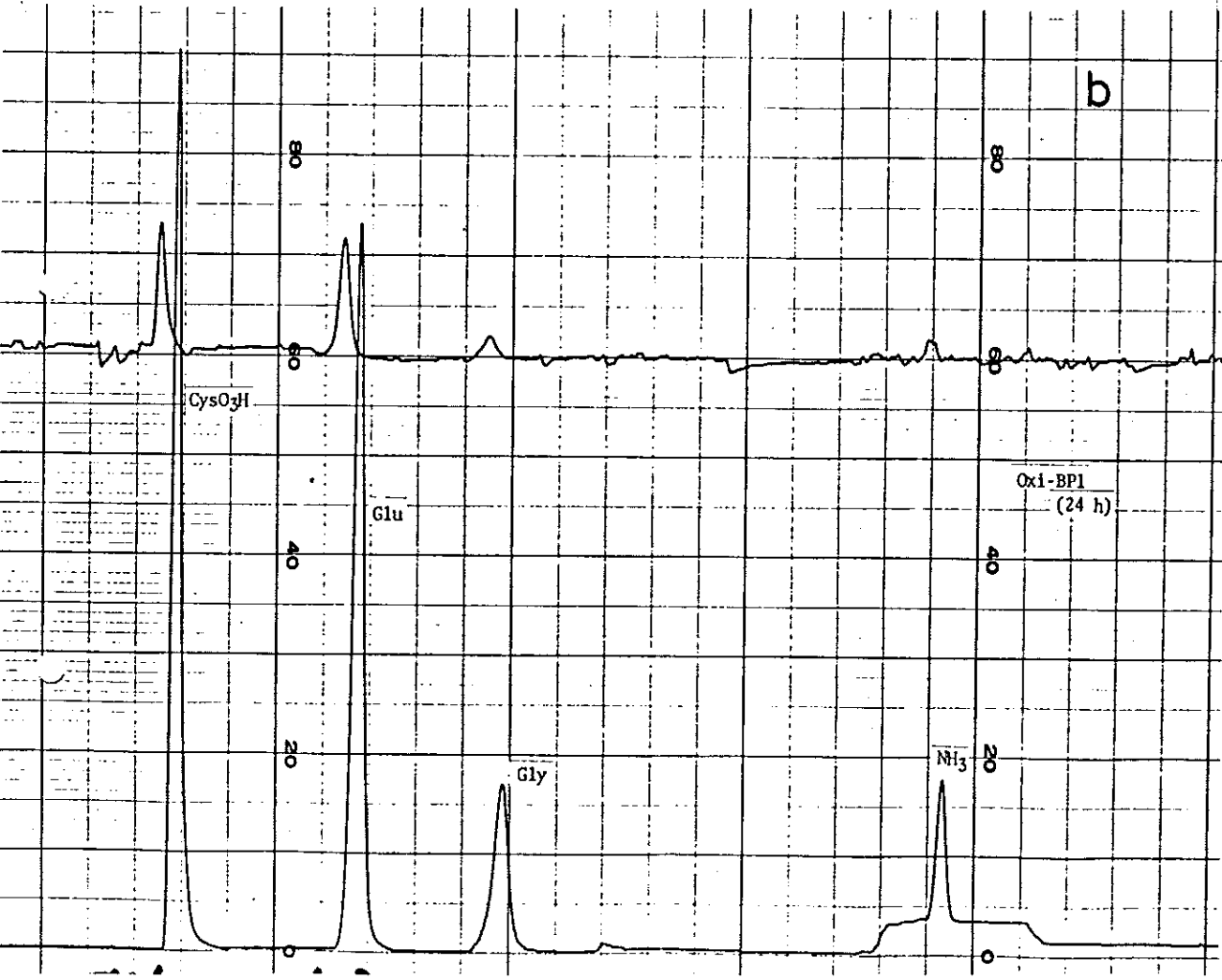
図 8. Cd-BP1 と Cd-BP2 の割合に対する細胞内に取り込まれた Cd 量の効果

図 5 と 図 7 をまとめたものである。Cd-BP1 (○)、Cd-BP2 (●) は図 5 からのデータであり、Cd-BP1 (Δ)、Cd-BP2 (▲) は図 7 からのものである。

a



b



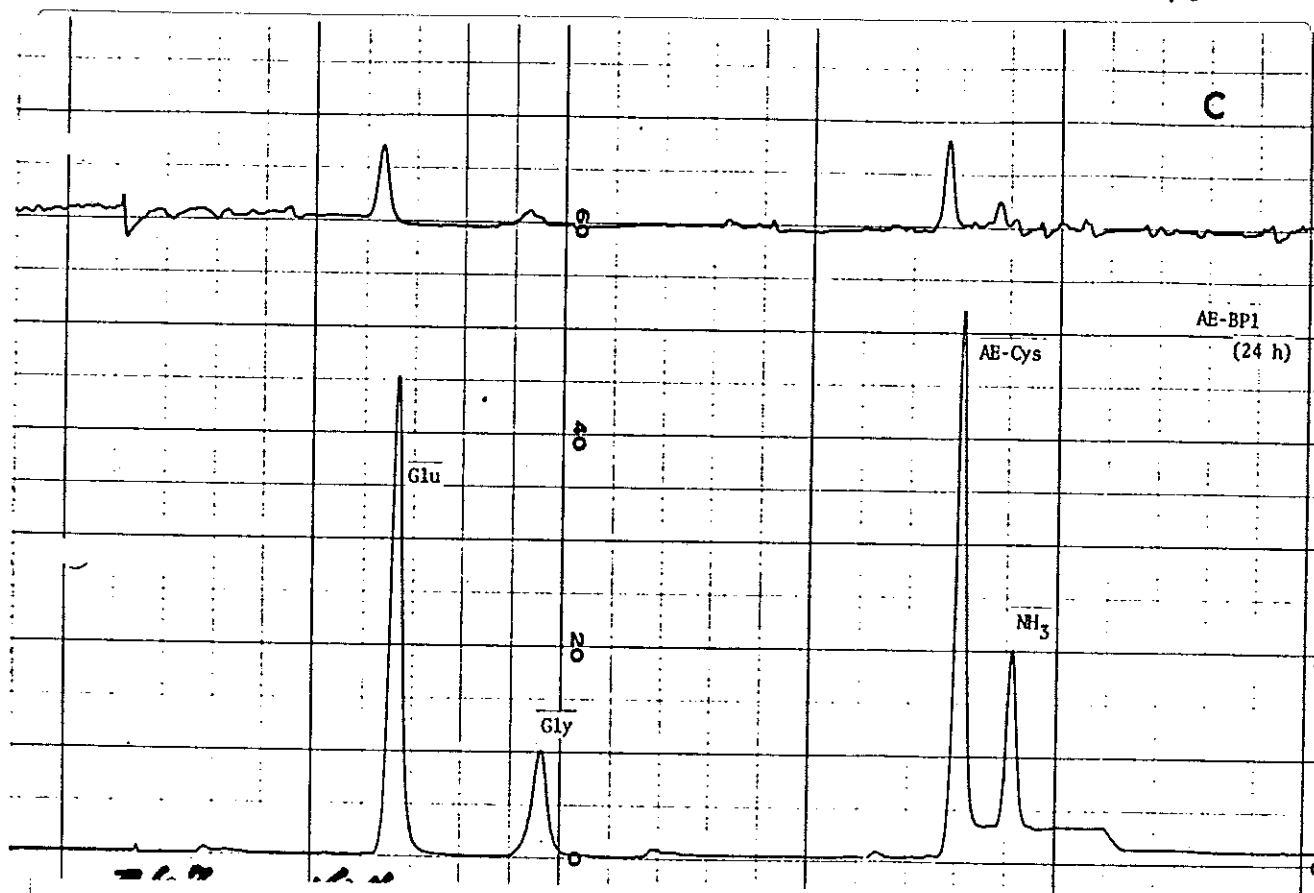


図 9. Cd-BP1 のアミノ酸分析

(a) 未処理の Cd-BP1

(b) 過キ酸酸化した Cd-BP1

(c) S-P アミノ化した Cd-BP1

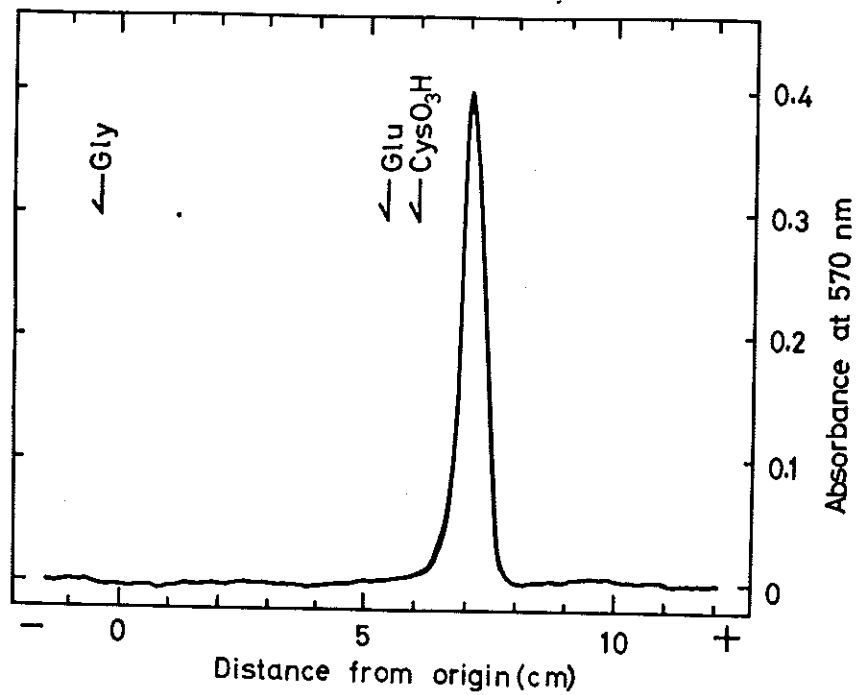


図 10. 過キ酸酸化した Cd-BP1 のろ紙電気泳動
 過キ酸酸化した Cd-BP1 (100 μ g) を pH 6.5 で泳動
 ($t = 30$ V/cm)。酸化 Cd-BP1 はニンヒドリン
 で発色させ、570 nm でスキャンした。

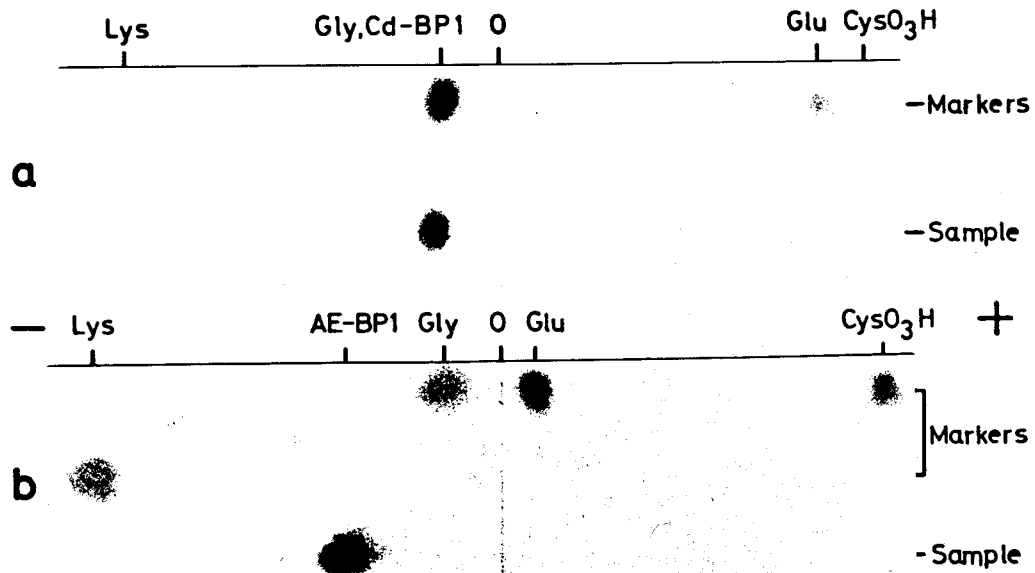


Figure 11. Paper electrophoresis of aminoethylated Cd-BP1 (AE-BP1) at pH 7.0 (a) and at pH 3.6 (b). AE-BP1 (50 μ g each) was spotted on a Whatman No.1 paper and electrophoresed at 30 V/cm for 60 min. The buffer for pH 3.6 was pyridine, acetic acid, and H₂O (1 : 10 : 89, V/V) and for pH 7.0 was collidine, 1N acetic acid, and H₂O (36.3 : 185 : 3 860, V/V). AE-BP1 and marker amino acid were stained with ninhydrin. This figure is reproduced with permission of Elsevier from reference 34: Purification and unique properties in UV and CD spectra of Cd-binding peptide 1 from *Schizosaccharomyces pombe*.

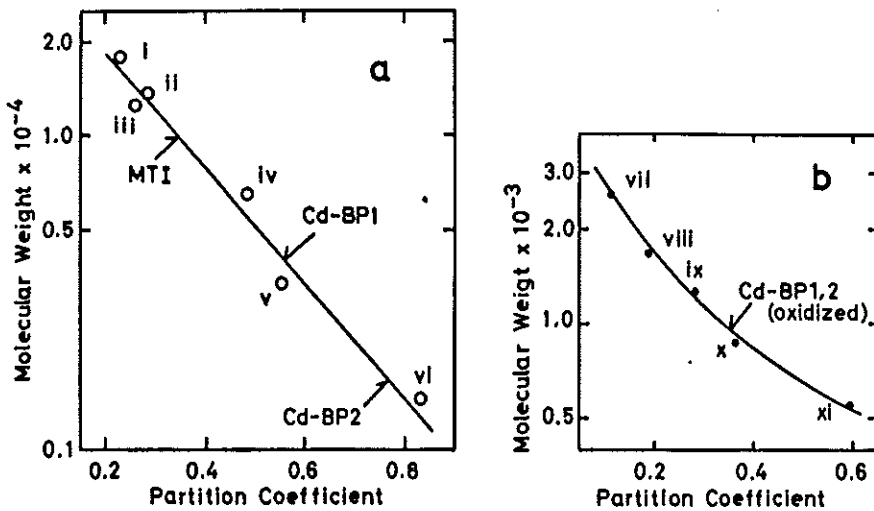


図 12. Cd-BP1 と Cd-BP2 の分子量の推定

(a) Sephadex G-50 のゲルろ過による分子量の推定。

カラム ($1.6 \times 53 \text{ cm}$) は、緩衝液 A で平衡化し、溶出した。1.5 ml ずつ分画した。

(b) 6 M グアニジン塩酸塩中の Bio-Gel P-4 によるゲルろ過。

カラム ($0.9 \times 57 \text{ cm}$) は、6 M グアニジン塩酸塩 (pH 7) で平衡化し、溶出した。

約 0.7 ml ずつ分画した。

MTI は、マウスの Cd-チオネインである。

Cd-BP1, 2 (oxidized) は過キ酸酸化された Cd-

BP1 および Cd-BP2 である。マーカーは、(i) ミ

オグロビン ($M_r 17,000$) (ii) RNase A ($M_r 13,700$) (iii)

チトクロム C ($M_r 12,400$) (iv) すい臓のトリゴシ

ンインヒビター (Mr 6,520) (v) カルシトニン (Mr 3,400) (vi) バシトラシン (Mr 1,422) (vii) インシユリン A 鎖 (Mr 2,531) (viii) ニューロテンシン (Mr 1,673) (ix) ファイサレミン (Mr 1,265) (x) 血清胸腺因子 (Mr 859) (xi) ロイシン-エンケファリン (Mr 557) である。

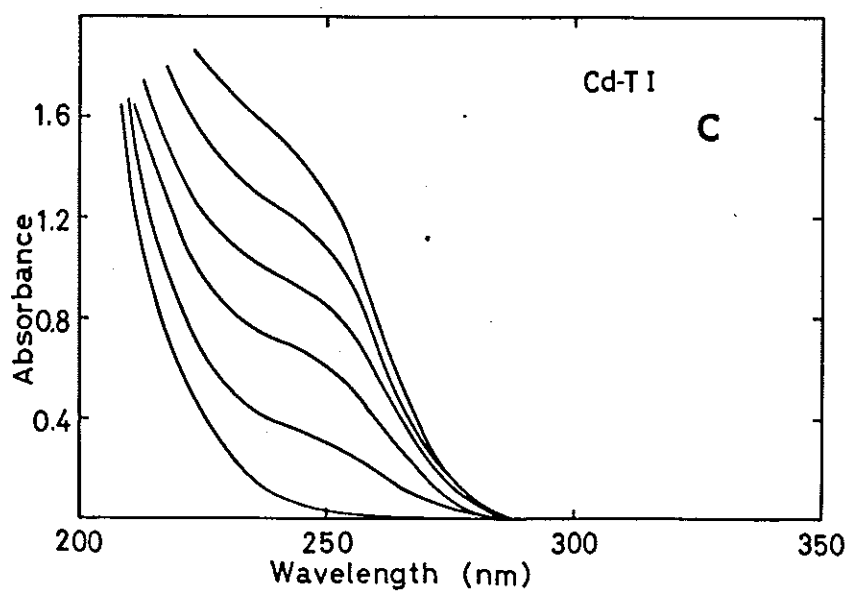
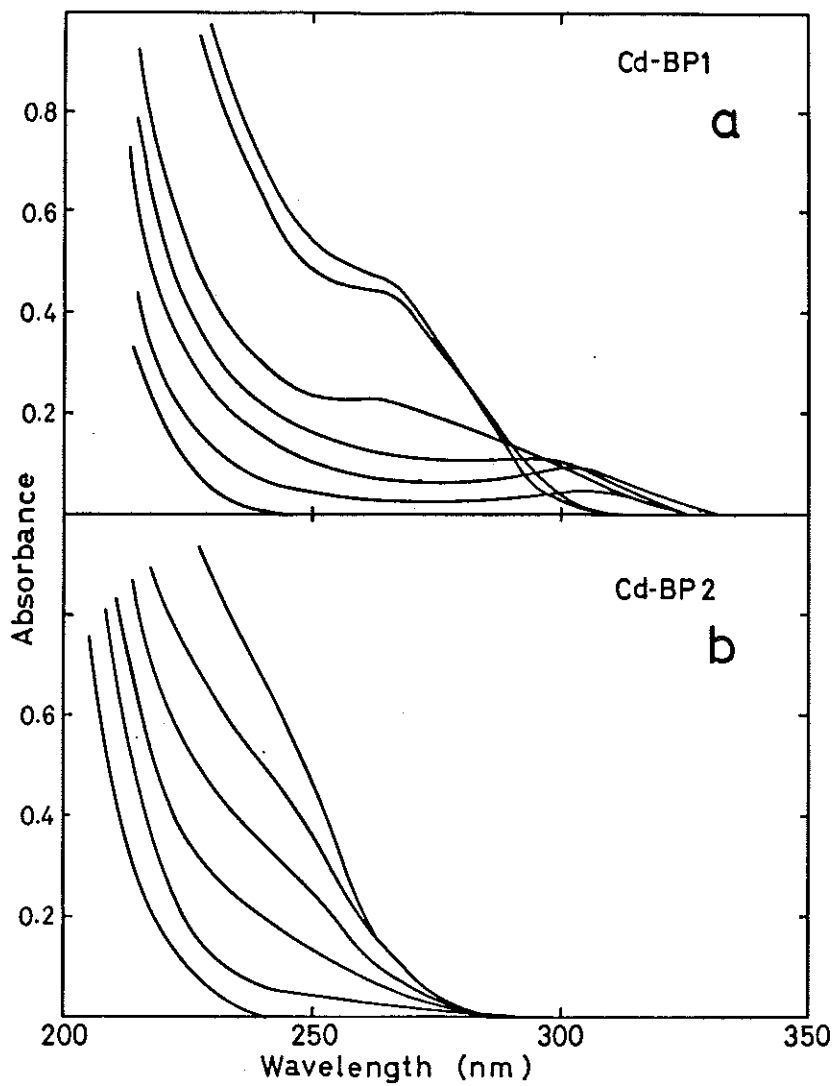


図 13. pH による紫外吸収スペクトルの変化

(a) Cd-BP1。濃度は、4 mM KCl を含む 2 mM Tris-Cl 緩衝液 (pH 7.6) 中 0.077 mg/ml であった。各スペクトルは、 A_{250} の値の大きいものから、溶液の pH が 7.5, 6.8, 3.4, 3.2, 2.8, 2.3 および 2.0 のときのものである。(b) Cd-BP2。濃度は、4 mM KCl を含む 2 mM Tris-Cl 緩衝液 (pH 7.6) 中 0.064 mg/ml であった。各スペクトルは、 A_{250} の値の大きいものから、溶液の pH が 7.3, 5.4, 4.6, 4.1, 3.8 および 2.0 のときのものである。(c) Cd-チオネイン (マウス)。濃度は、2.5 mM KCl を含む 1.25 mM Tris-Cl 緩衝液 (pH 7.6) 中 0.09 mg/ml であった。各スペクトルは、 A_{250} の値の大きいものから、溶液の pH が 7.5, 3.8, 3.5, 3.0, 2.7 および 2.0 のときのものである。マウスの Cd-チオネインは、1 mM DTT (ジチオスレイトール) で還元し、pH 2 でゲルろ過して、一度 Cd^{2+} を除き、その後改めて十分量の Cd^{2+} を加えて pH を 7.6 にし、 Cd^{2+} を付加した。Cd-チオネインのタンパク量は、250 nm における、1 μ

ラム原子のCdあたりの分子吸光係数を14,500とし(45)、1モルのCd-チオネインに7グラムラム原子のCdが含まれるとして算出した。Cd-BP1、Cd-BP2の分子吸光係数は、単位ペブチドあたり、それぞれ6,200および5,700であった。

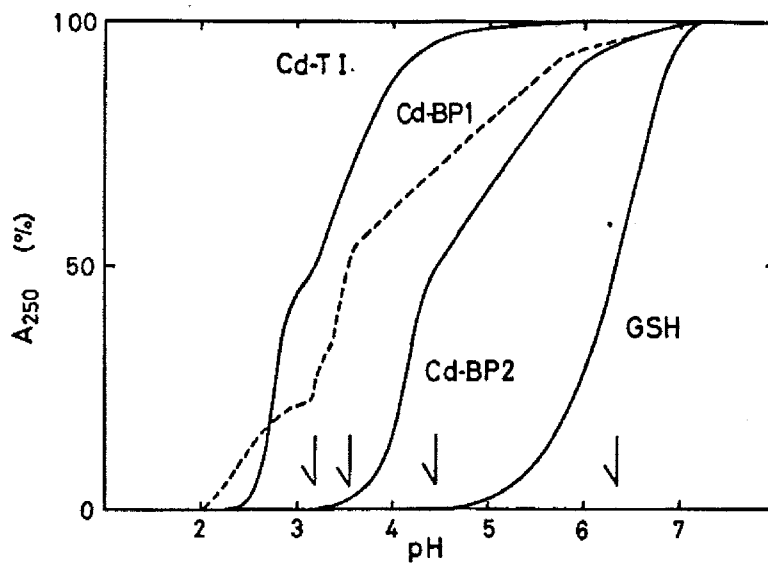


図 14. 250 nm における吸収の pH による変化
 Cd-BP1、Cd-BP2 および Cd-チオネインは、図
 13 の A_{250} の相対値を pH に対してプロットした。
 各物質のシステイン残基の濃度は、Cd-BP1
 0.3 meq.、Cd-BP2 0.25 meq.、Cd-チオネイン 0.26
 meq.、グルタチオン 0.26 meq. であった。また
 グルタチオンは、20 mM KCl を含む 10 mM Tris-Cl
 緩衝液 (pH 7.6) に溶解し、これに $CdCl_2$ を 0.3 mM
 とするように加えた。矢印は、 A_{250} が pH 7.6 の
 値の 50% になる pH を示す。GSH は、還元型グ
 ルタチオン、Cd-TI は、マウスの Cd-チオネイ
 ン I である。

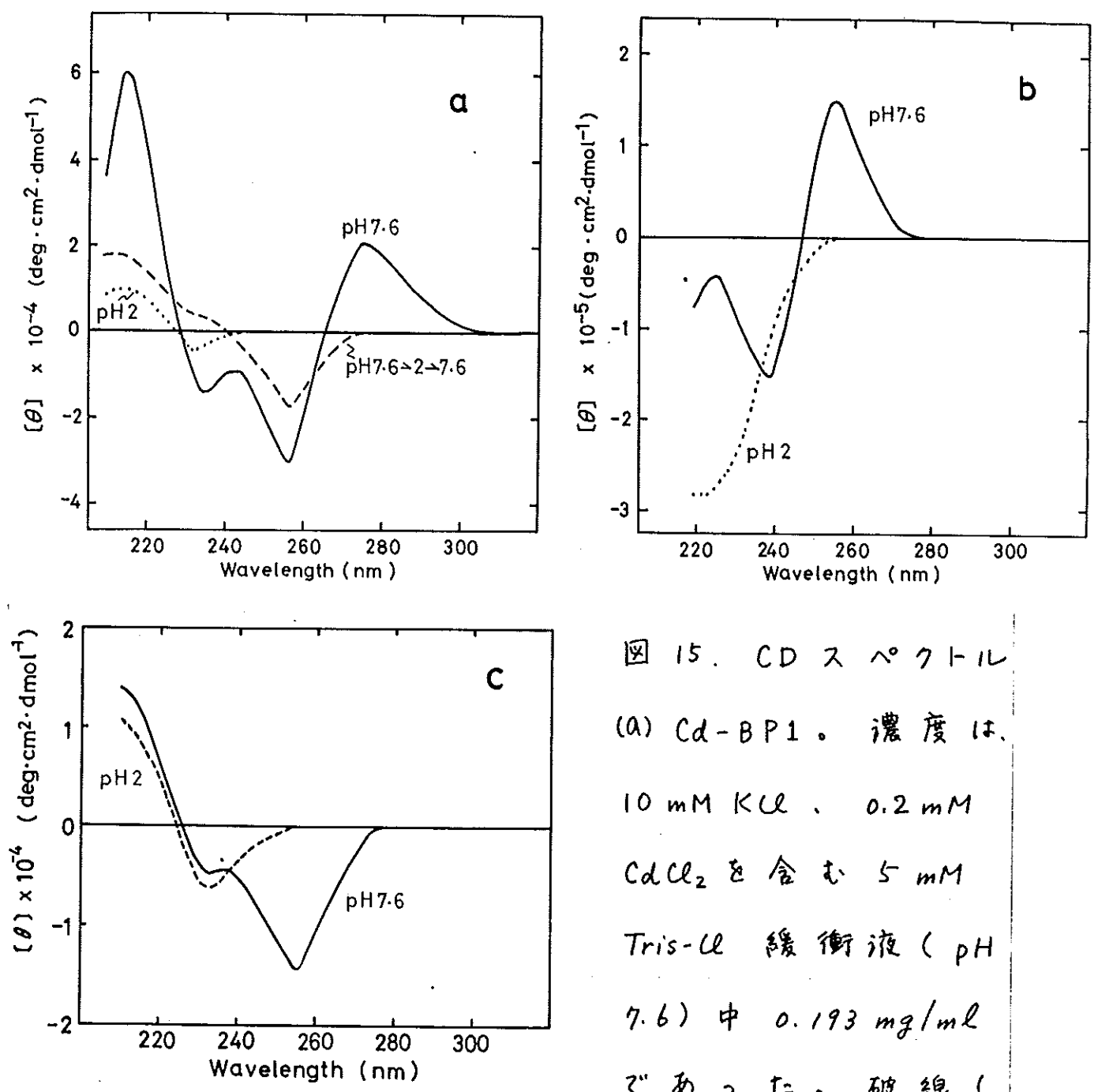


図 15. CD スペクトル
 (a) Cd-BP1。濃度は、
 10 mM KCl、0.2 mM
 CdCl₂ を含む 5 mM
 Tris-Cl 緩衝液 (pH
 7.6) 中 0.193 mg/ml
 であった。破線 (

-----) は、溶液の pH を 2 まで一度下げ、再び
 7.6 に戻した時の CD スペクトルである。

(b) Cd-チオネイン (マウス)。濃度は、10 mM
 KCl、0.2 mM CdCl₂ を含む 5 mM Tris-Cl 緩衝液 (pH

7.6) 中 0.148 mg/ml であつた。 (C) Cd-BP2。濃度は、 100 mM KCl 、 0.2 mM CdCl_2 を含む 50 mM Tris-Cl 緩衝液 (pH 7.6) 中 0.166 mg/ml であつた。 [θ] は分子た円率であるが、Cd-BP1 および Cd-BP2 においては、単位ペプチドあたり、Cd-チオネインの場合もペプチド鎖あたりの値である。

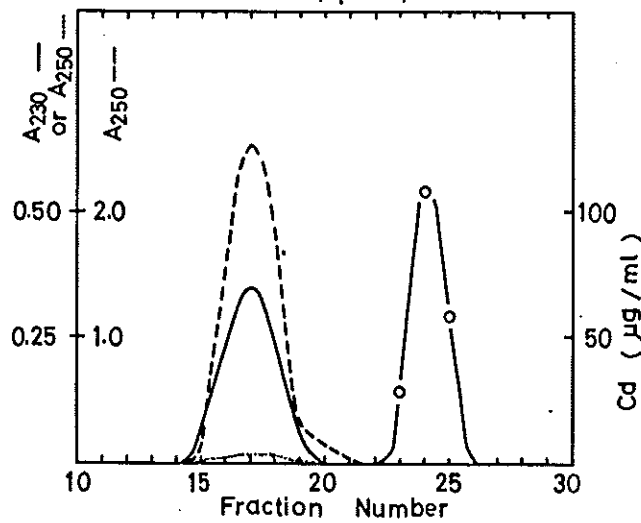


図 16. Cd-BP1 における Cd^{2+} とペクチンの分離。
 0.9 mg の Cd-BP1 を pH 2 とし、0.01 N HCl、0.5 M NaCl で平衡化した Bio-Gel p-2 カラム (1 x 25 cm) にのせて同じ溶液で溶出し、1 ml ずつ分画した。230 nm における吸収 (——)、250 nm における吸収 (.....)、Cd 量 (—○—)。各画分から 50 μl とり、これに 0.1 M CdCl_2 10 μl と 0.5 M Tris-Cl (pH 7.6) 0.1 ml を加えて、蒸留水で最終容積 1 ml とし、250 nm における吸収を測定した (-----)。A₂₅₀ は計算上もとの値の約 80% であった。

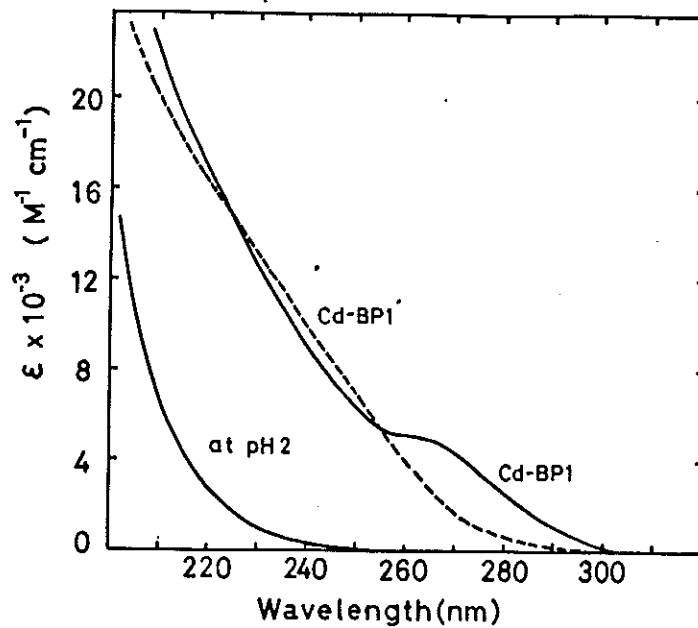


図 17. Cd-BP1 の紫外吸収スペクトル

Cd-BP1 は、10 mM KCl、0.2 mM CdCl₂ を含む 5 mM Tris-Cl 緩衝液 (pH 7.6) 中 0.097 mg/ml の濃度であった。Cd-BP1' は、Cd-BP1 を 1 度 pH 2 にしたあと、再び pH 7.6 にしたものである。

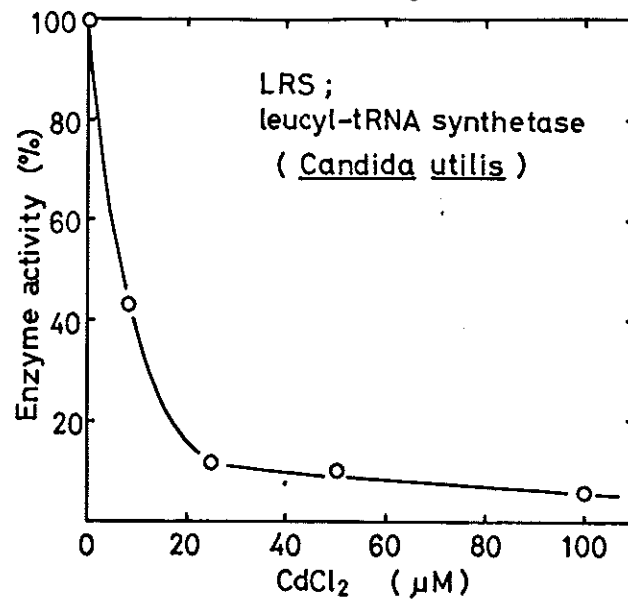


図 18. Cd^{2+} によるロイシル-tRNA 合成酵素の阻害

酵素活性の測定は、文献 (35) に述べた通りである。