

セレン置換メタロチオネインの合成とその性質

老川典夫・杉本 学・江崎信芳
田中英彦・左右田健次
(京都大学化学研究所微生物化学部門*)

Synthesis of a Selenium Analogue of Metallothionein from *Neurospora crassa* and Its Properties

Tadao OIKAWA, Manabu SUGIMOTO, Nobuyoshi ESAKI
Hidehiko TANAKA and Kenji SODA
Institute for Chemical Research, Kyoto University

Metallothioneins (MTs) are cysteine-rich proteins with low molecular weight, and bind with metal ions such as Cd, Zn, Hg, and Cu. All cysteinyl residues are involved in metal binding. *N. crassa* Cu-MT is the smallest MT found so far. It consists of only 25 amino acids and binds 6 Cu ions to 7 cysteinyl residues. We are interested in examining whether the structure and properties of *N. crassa* MT are influenced by substituting selenium atoms for the sulfur ones. Thus, we have studied a synthetic method for a selenium-containing MT (selenometallothionein, SeMT), in which all the cysteinyl residues are replaced by selenocysteine residues, and its properties in comparison with those of MT synthesized in a similar manner.

SeMT was synthesized by the Merrifield method. *Se*-(*p*-Methylbenzyl)-*N*-*t*-Boc-selenocysteine was synthesized from selenocystine, which was prepared from disodium diselenide and β -chloroalanine described previously. MT was also synthesized in a similar manner. Both synthesized peptides were identified by amino acid analysis. Cu-SeMT prepared with Cu^{2+} contained 3g-atoms of Cu per mol of the peptide. The absorption spectrum of the Cu-SeMT was characterized by a very broad band displaying a shoulder around 270 nm.

セレンは、金属性と非金属性を合わせもつユニークな元素である。その化学的性質は、同族の硫黄に類似するが、金属との反応性は硫黄に比べてはるかに高く、多くの金属の生体内代謝や毒性に大きな影響を及ぼすことが知られている¹⁻⁴⁾。

*所在地：京都府宇治市五ヶ庄（〒611）

一方、メタロチオネイン (MT) は, Cd, Zn, Cu 等の種々の重金属を強固に結合することのできる誘導性低分子タンパク質である⁵⁾。その構成アミノ酸組成の約1/3はシステインであり, 芳香族アミノ酸及びヒスチジンを含まない点の特徴である。その生物学的機能については, 細胞内における重金属の解毒あるいは必須微量元素の貯留・運搬に関与するなど様々な推論がなされているが, その詳細は不明である⁶⁾。

本研究は, 同族の硫黄化合物に比べて優れた重金属解毒作用を持つセレンに着目し, 現在知られている MT の中で最小の分子量 (約2,200) を持つ *Neurospora crassa* の Cu-MT⁷⁾ を研究対象にしている。この Cu-MT の7個のシステイン残基をすべて, システインのセレンアナログであるセレノシステイン残基に置換したセレノメタロチオネイン (SeMT) を合成し, その分光学的性質ならびに金属結合能を明らかにすることを目的として研究を行った。

方 法

セレノシスチンは, β -クロロアラニンと Na_2Se_2 から合成した⁸⁾。セレノシスチンをエタノール中トリエチルアミン存在下, 水素化ホウ素ナトリウムで還元し, α -プロモ-*p*-キシレンでそのセレノール基

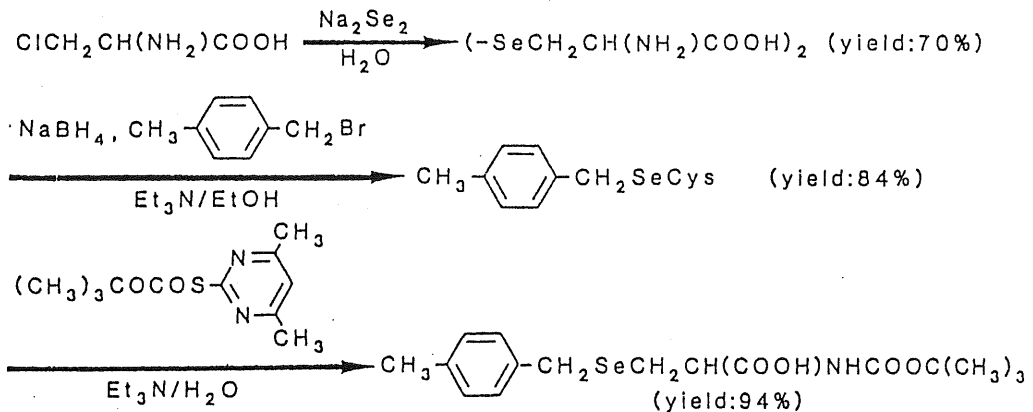


Fig. 1. Synthesis of *Se-(p-methylbenzyl)-N-t-Boc-L-selenocysteine*.

Table 1. Analytical data for *Se-(p-methylbenzyl)-N-t-Boc-L-selenocysteine*

Elemental analysis (%)	Found: C, 51.83; H, 6.18; N, 3.82%
for $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_4\text{Se}$	Calcd: C, 52.62; H, 6.23; N, 3.76%
$^1\text{H-NMR}$ (δ)	7.07~7.20 (4H, m, Ar)
in CDCl_3	4.58 (1H, d, $\text{C}^\alpha\text{-H}$)
	3.80 (2H, s, $-\text{CH}_2^-$)
	2.94 (2H, d, $\text{C}^\beta\text{-H}$)
	2.33 (3H, s, Ar- CH_3)
	1.47 (9H, s, $(\text{CH}_3)_3^-$)

を保護後、*s-t*-Boc-4,6-ジメチル-2-チオピリジンを用いた混合カルボナート法により、*t*-Boc 誘導体化した (Fig. 1)。最終合成物は、元素分析, NMR, 質量分析により目的物であることを確認した (Table 1)。SeMT 及び MT は、Merrifield 法により合成した。合成 SeMT と MT は、無水フッ化水素による脱レジンを脱保護後、酢酸抽出し、その凍結乾燥粉末を、嫌気条件下水素化ホウ素ナトリウムで還元し、逆相高速液体クロマトグラフィーで精製した。得られた標品を用いて銅結合セレノメタロチオネイン (Cu-SeMT) 及び銅結合メタロチオネイン (Cu-MT) を調製した。すべての溶液は使用前に減圧下脱気し、調製はすべて嫌気グローブボックス (酸素濃度10ppm 以下) 中に行った。アポ SeMT (800 μ g, 312nmol) を20mM Tris-HCl, pH8.6中、2-メルカプトエタノールにより還元後、硫酸銅 (3.74 μ mol) を加え37°C で30分間インキュベートした後、Asahipak GS-220 HPLC により、過剰の試薬を除くとともに、Cu-SeMT を分取した。Cu-MT も同様の方法により調製した。

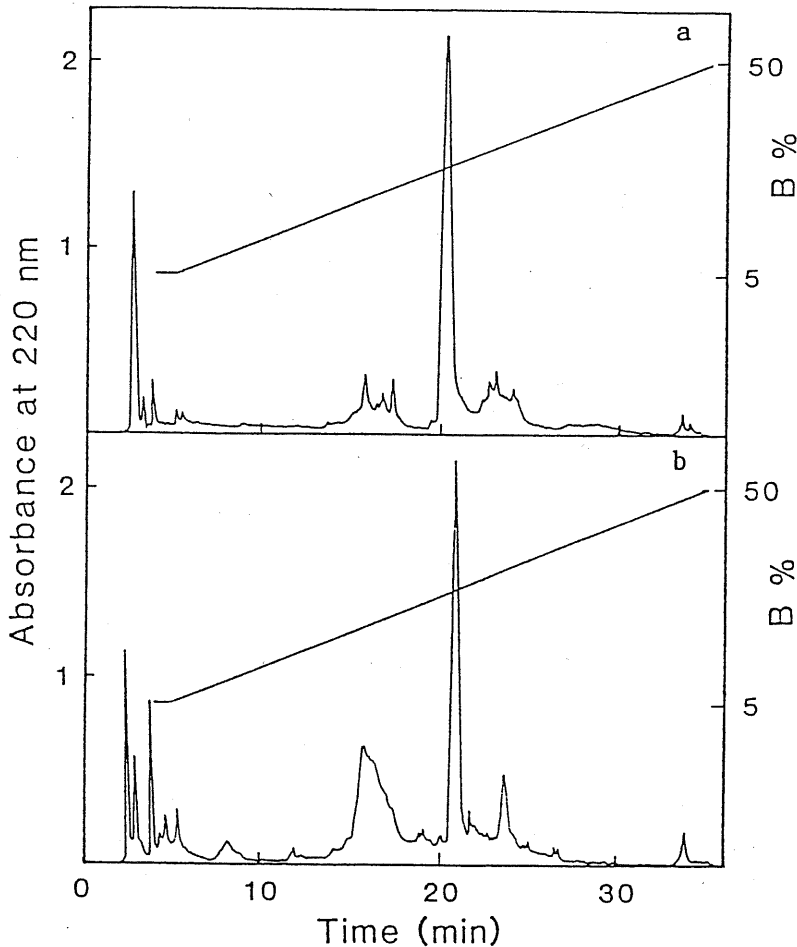


Fig.2. Reverse-phase HPLC profiles of MT (a) and SeMT(b).

Crude peptides were reduced with NaBH_4 and applied to an Ultron N- C_{18} column (4.6 \times 150mm). After washing with 0.1% (v/v) TFA, a linear gradient between 0% and 50% acetonitrile (v/v) in 0.1% TFA was carried out at a flow rate of 0.8ml/min.

結果と考察

逆相高速液体クロマトグラフィーの結果、SeMTは、保持時間21分に、またMTは20分にそれぞれシャープなピークとして溶出された (Fig. 2)。両ピークを分取し、アミノ酸分析を行った結果、両者はそれぞれの目的物であることが確認された (Table 2)。原子吸光分析の結果、Cu-MTは1モルあたり3グラム原子の銅を結合していることが確認された (Table 3)。これは、*N. crassa* Cu-MTの2価金属置換体と同数であり¹¹⁾これらの2価金属置換体が同じ結合様式をとっていることから *in vitro* で調製したCu-MTは、Cuを2価の状態では結合していると考えられる。その結果、結合銅含量がCuを1価の状態では結合している *N. crassa* Cu-MTの1/2になったと考えられる。またCu-SeMTも1モルあたり3グラム原子の銅を結合しており (Table 3)、SeMTはMTと等価な金属結合能を持つことが示唆された。Cu-SeMTは、270nm付近に吸収肩を持つ特徴的な吸収スペクトルを呈した (Fig. 3)。メルカプトエタノールのセレンアナログであるセレノメルカプトエタノールを合成し対照実験を行ったところ、この吸収は、Cu-Se結合に由来することが確認された。

本研究結果をもとに、Cu-SeMTの金属結合様式、原子価について今後さらに詳細な検討を加えてい

Table 2. Amino acid analysis of SeMT and MT

Amino acid	Number of residues		
	Syn. MT	Syn. SeMT	<i>N. crassa</i> MT
Asx	2.7	2.4	3
Ser	7.2	6.6	7
Gly	6.2	6.0	6
Ala	1.0	1.0	1
Cys	6.7	—	7
SeCys	—	7.1	—
Lys	0.8	0.7	1

Cysteine was determined as cysteic acid after performate oxidation of the sample according to the procedure of Hirs⁹⁾ and selenocysteine as *Se*-carboxyamidomethyl selenocysteine after carboxyamidomethylation of the sample with monoiodoacetamide¹⁰⁾.

Table 3. Metal content

	(g-atoms/mol)
Syn. Cu-MT	3
Syn. Cu-SeMT	3
from <i>N. crassa</i>	
Cu-MT (native)	6
Cd-substituted MT	3
Zn-substituted MT	3
Hg-substituted MT	3

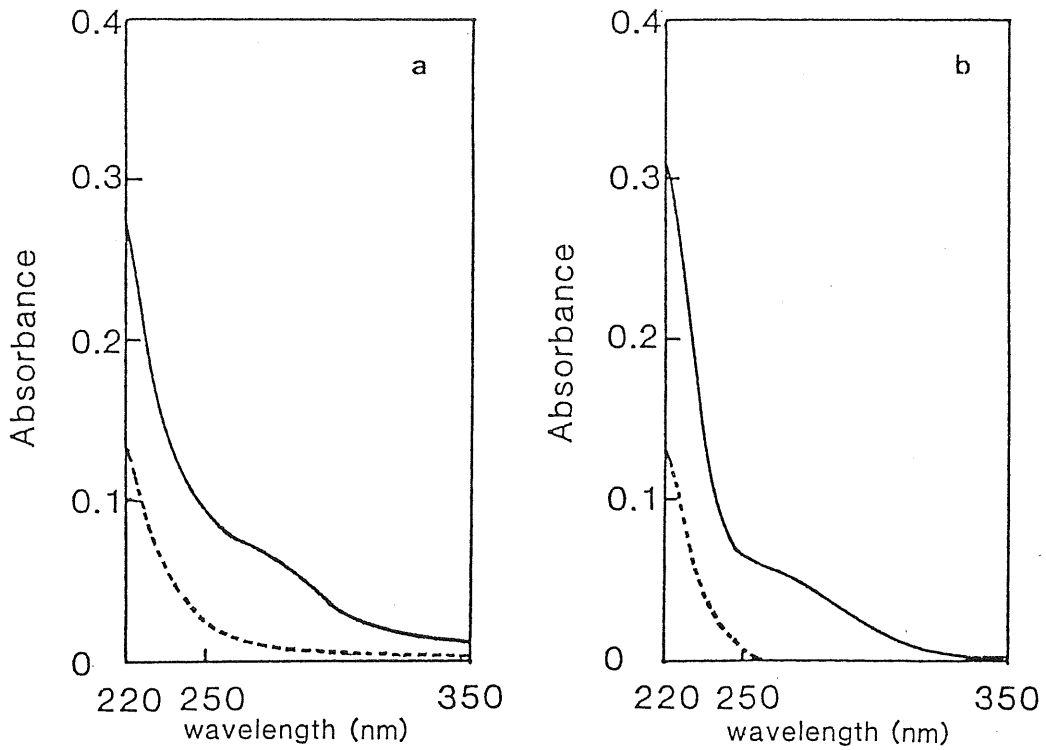


Fig.3. Absorption spectra of Cu-SeMT (a) and Cu-MT (b).

—; Cu bound form (in 20 mM Tris-HCl, pH 8.6).

- - -; Apo form (in 50 mM HCl).

きたいと考えている。

文 献

1. KAR, A. B., R. P. DAS and B. MUKENJI (1960) Proc. Natl. Inst. Sci. India. Part B 26 : 40
2. PARIZEK, J. and I. OSTADALOVA (1967) Experientia 23 : 142
3. GANTHER, H. E., C. GOUDIE, M. L. SUNDE, M. J. KOPECKY, P. Wagner and W. G. Hoestra (1972) Science 175 : 1122
4. NAGANUMA, A., T. TANAKA, K. MAEDA, R. MATSUDA, J. TABATA and N. IMURA (1983) Toxicology 29 : 77
5. MARGOSHES, M. and B. L. VALLEE (1957) J. Am. Chem. Soc 79 : 4913
6. TERAQ, T. and C. A. OWEN (1973) Am. J. Physiol 224 : 682
7. LERCH, K. (1980) Nature 284 : 368
8. KLAYMAN, D. J. and S. T. GRIFFIN (1973) J. Amer. Chem. Soc. 95 : 197
9. HIRS, C. H. W. (1967) Methods Enzymol. 11 : 197
10. WAXDALL, M. J., W. H. KONIGSBERG, W. H. HONEY and G. M. EDELMAN (1968) Biochemistry 7 : 1959
11. BELTRAMINI, M. and K. LERCH (1983) Biochemistry 22 : 2043