

総 説

分裂酵母に誘導合成される重金属結合ペプチド：
Cadystin (Phytochelatin)
—生合成の機構，光反応性半導体製造への応用，
および重金属環境汚染検出への利用—

村杉 章

株式会社 明治 生産本部技術部

(2011年2月14日受付 2011年3月28日受理)

Heavy metal binding peptides, cadystin (phytochelatin), induced in *Schizosaccharomyces pombe*: Biosynthesis, fabrication of photoresponsive semiconductors, and detection of heavy metal environmental pollution —Review—

Akira Murasugi (Technology Department, Production Division, Meiji Co. Ltd., 1-2-10 Shin-suna, Koto-ku, Tokyo 136-8908) *Seibutsu-kogaku* **89**: 228–237, 2011.

The large amount of Cd-peptide complex was induced in *Schizosaccharomyces pombe* with the addition of Cd ions in the medium. The main complex contains Cd, small cystein-rich peptides, named as cadystin, and the acid labile sulphide. Cadystin and the acid-labile sulphide were discovered for the first time in this kind of complex. The chemical structures for the main components of cadystin, were determined to be γ -Glu-Cys- γ -Glu-Cys- γ -Glu-Cys-Gly, and γ -Glu-Cys- γ -Glu-Cys-Gly, respectively. In this yeast, the main component related to tolerance for Cd ions is cadystin, and is not metallothioneins. The CdS crystal is a semiconductor. The cadystin-Cd-sulphide complex induced in *Schizosaccharomyces pombe* by Cd ions in a certain condition was found to be nano-particle. It is made of CdS core and cadystin molecules that coat the core. The nano-particles are monodisperse. These particles will be used to fabricate the photodiode that absorbs the light of certain wavelength. On the other hand, the same peptides were found in many kinds of plant cells, and they were named as phytochelatin. The main component related to tolerance for heavy metals in many kinds of plant cells is also cadystin, not metallothionein. An enzyme that transfers the γ -Glu-Cys moiety of glutathione to an acceptor (γ -Glu-Cys)_n-Gly (n=1 or n>1) was found in a plant cell, and the enzyme was designated as cadystin synthetase. The molecular cloning of the gene was performed, and the enzyme kinetics was studied precisely using the enzyme expressed from the cloned gene. Cadystin, or the synthetase gene is found not only in yeasts and plants but also in bacteria (prokaryote) and lower animals. Cadystin is induced by many kinds of heavy metals. Therefore, the measurement of γ -Glu-Cys- γ -Glu-Cys-Gly in leaves of a plant reveals the heavy metal contaminations in subsurface water, and air. Cadystin may be a reliable biological marker for the contamination of environment.

[Key words: cadystin, phytochelatin, Cd, sulphide, *Schizosaccharomyces pombe*, biological indicator, environment]

動物のメタロチオネインは、重金属を結合すること、および重金属のホメオスタシスに重要な働きをする主要なタンパク質であることがよく知られている¹⁾。また、カドミウムのような重金属が動物体内に入り込むと、メタロチオネインが誘導合成され、カドミウムを結合して無毒化する。一方、カドミウムを含む培地で培養された分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) から、メタロチオネインとは明らかに異なり、重金属耐性に関する主要な成分としてカドミウム結合性のペプチドが初めて見いだされている¹⁻³⁾。このペプチドはcadystinと命名された⁴⁾。ここで発見されたカドミウムを含む複合体は、ある条件下のゲルろ過カラムクロマトグラフィーでははっきりと2種に分離され、Cd-BP1およびCd-BP2とされた。高分子量 (HMW) 複合体Cd-BP1 (見かけの分子量約4000) はcadystin, カドミウムイオン, および不安定硫黄で構成されており⁵⁾、低分子量 (LMW) 複合体Cd-BP2 (見かけの分子量約1800) はcadystin, およびカドミウムイオンで構成されている。分裂酵母においては、Cd耐性に関連する非常に重要な成分の一つはメタロチオネインではなくcadystinである⁶⁻⁸⁾。分裂酵母におけるcadystinの発見から4年後、種々の植物の培養細胞において、重金属耐性に主要な働きをする成分として同様のペプチドとカドミウムの複合体が見いだされ、このペプチドに対してphytochelatinという名称が提唱された⁹⁾。また、多くの植物においても種々の重金属耐性に関連する非常に重要な成分の一つはメタロチオネインではなくcadystinである^{8,10)}。Phytochelatinとcadystinは同一のペプチドである。ここでは基本的に、このペプチドの名称としてcadystinを用いる。Cadystin研究におけるいくつかの重要な論文をTable 1に示した。

植物におけるcadystinの発見から2年後、メタロチオ

ネインに関する命名委員会により、cadystinはメタロチオネインの新しいカテゴリー、メタロチオネインIIIに分類された¹¹⁾。その後、cadystinに関する研究論文は数多く出版され、これらのペプチドが他の酵母、他の植物、さらにある種の無脊椎動物にも存在することや、これらのペプチドの合成にかかわる酵素やこれをコードする遺伝子に関して報告された^{12,13)}。また、これらのペプチドの細胞内トランスポーター、およびCd-BP1の物理化学的構造に関する報告も報告されている^{14,15)}。植物に存在するこれらのペプチドに関する総説は数多く執筆されているので^{16,17)}、ここでは分裂酵母におけるcadystinの発見や、その後の研究の展開を中心に記述する。

Cadystinの発見

植物におけるカドミウム結合物の存在は1980年当時にも示唆されていたが、これらの複合体の実態については明らかでなかった^{18,19)}。筆者らは、分裂酵母 (*S. pombe*) および飼料酵母 (*Candida utilis*) にカドミウムイオンを与えたときどのような物質が生成されるか検討していた。これらの酵母を、1 mM塩化カドミウムを含む栄養培地で培養し、細胞中の可溶性成分をゲルろ過クロマトグラフィーで分析した。両酵母ともこの条件で良好に増殖し、クロマトグラム上には何らかの複合体と思われるカドミウムのピークが観察された^{1,2)}。これらのピーク部分の溶出液を集め同じカラムで再度分離した結果、分裂酵母の複合体がより安定と思われたため、以後はおもに分裂酵母の複合体の分析を行った^{2,5,20-22)}。分裂酵母では、ある条件下で取り込まれたカドミウムのうち少なくとも70%以上がCd-BP1と名づけた複合体に含まれていた。分裂酵母を³H]シスチンを添加した最小培地で30分標識培養したところ、これらの複合体に取り込まれた

Table 1. Research on cadystin.

Research	Year	Reference (Number)
Discovery of cadystin in <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1981	Murasugi, A. <i>et al.</i> , <i>J. Biochem.</i> , 90 , 1561-1564. (2)
	1981	Murasugi, A. <i>et al.</i> , <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 103 , 1021-1028. (20)
Discovery of labile sulfide in Cd-cadystin complex	1983	Murasugi, A. <i>et al.</i> , <i>J. Biochem.</i> , 93 , 661-664. (5)
	1984	Murasugi, A. <i>et al.</i> , <i>J. Biochem.</i> , 96 , 1375-1379. (21)
Chemical structure determination for cadystin	1984	Kondo, N. <i>et al.</i> , <i>Tetrahedron Lett.</i> , 25 , 3869-3872. (22)
Discovery of cadystin in plant cells	1985	Grill, E. <i>et al.</i> , <i>Science</i> , 230 , 674-676. (9)
Physical characters of Cd-cadystin complex	1989	Dameron, C. T. <i>et al.</i> , <i>Nature</i> , 338 , 596-597. (15)
Discovery of cadystin synthetase	1989	Grill, E. <i>et al.</i> , <i>Proc Natl. Acad. Sci. U S A</i> , 86 , 6838-6842. (12)
Origine of labile sulfide in Cd-cadystin in cells	1993	Juang, R. H. <i>et al.</i> , <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 304 , 392-401. (43)
Path of Cd, cadystin, and Cd-cadystin complex in cells	1995	Ortiz, D. F. <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , 270 , 4721-4728. (14)
Cadystin as a biological indicator for environmental pollution	1996	Gawel, J. E. <i>et al.</i> , <i>Nature</i> , 381 , 64-65. (76)
Cloning of genes for synthetases of cadystin	1999	Ha, S. B. <i>et al.</i> , <i>Plant Cell</i> , 11 , 1153-1163. (13)
3D structure of cadystin synthetase	2005	Vivares, D. <i>et al.</i> , <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 102 , 18848-18853. (58)
Suggested mechanism for the control of cadystin synthetase activity	2009	Wang, H.-C. <i>et al.</i> , <i>J. Agric. Food Chem.</i> , 57 , 7348-7355. (40)

標識量は、クロマトグラムの最初に現れる他のほぼすべての可溶性タンパク質を含むピークの標識量と同程度であったので、cadystinの合成速度は非常に大きいと考えられた²⁾。非標識の実験において1 mMの塩化カドミウムを含む栄養培地で種々の時間培養し、それぞれCd-BP1およびCd-BP2量を観察した結果から、まず、硫黄を含まないCd-BP2が合成されるが、培養時間が増加するにしたがって、また、細胞内へのカドミウムの取り込み量の増加に伴ってCd-BP1量が増加しており、Cd-BP2はCd-BP1の前駆体であることが示唆された。Cd-BP1およびCd-BP2に含まれるペプチドについてアミノ酸分析を行ったところ、グルタミン酸、システインおよびグリシンのみが検出され、これらの比は約3:3:1であった。Cd-BP1におけるペプチドあたりのカドミウム量は、哺乳類のカドミウムチオネインの約2倍であり、メタロチオネイン関連物質でこれまで知られている最大の値である。また、システインあたりのカドミウム量もカドミウムチオネインの約1.5倍であった。これらの事実は、Cd-BP1におけるカドミウム結合様式は、メタロチオネインの結合様式とは異なっていることを意味している^{1,2)}。

Cd-BP1およびCd-BP2が精製され、性質が詳細に分析された。これらはそれぞれ特徴的なUVスペクトルおよびCDスペクトルを示した^{20,23)}。湿重量48 gの分裂酵母から約20 mgのcadystinが精製されたが、これは、全可溶性タンパク質の5%以上にあたる。精製されたcadystin量から換算すると、約20時間、1 mM塩化カドミウムを含む栄養培地で培養した分裂酵母細胞、湿重量1 kgあたりの複合体量は500 mg以上となる。植物培養細胞の場合⁹⁾と比較すると、時間あたりの生成量は20倍にもなり、いかに効率よく複合体が合成されているかが分かる。分裂酵母の実験系は、cadystin合成酵素の精製、この合成酵素遺伝子の取得、およびこれらのカドミウム複合体の物理化学的分析の材料として、また広い意味でのカドミウムによる誘導機構の解明、さらには耐性機構の解明のための重要な系となると考えられた。

カドミウム複合体であるカドミウムチオネイン、Cd-BP1、Cd-BP2、およびカドミウムグルタチオンの安定性は、溶液pHを中性から酸性に変化させることにより推定した。複合体の50%が解離するpHは、それぞれ3.1、3.5、4.5および6.3であった²³⁾。硫黄を含むCd-BP1は、Cd-BP2よりも明らかに安定であった。したがってCd-BP1は、Cd-BP2よりもより多くのカドミウムイオンをより強く捕捉していることになる。

飼料酵母 (*C. utilis*) から精製されたロイシル-tRNA合成酵素²⁴⁾の酵素活性は、ある条件下ではわずか8.3 μ Mの塩化カドミウムにより約60%阻害されるが、酵素

を加える前に約16 μ Mのcadystinを反応液に添加しておく、この阻害は観察されなかった。これはcadystinが細胞内で重金属に対する強い無毒化作用を示すことを示唆している²³⁾。また、分裂酵母 (*S. pombe*) を1.3 μ g/mlという低濃度の塩化カドミウムを含有する栄養培地で24時間培養したところ、培地中に残った塩化カドミウムの濃度は0.05 μ g/mlにまで低下した²³⁾。この酵母は汚染された排水からカドミウムや他の重金属を除去するために使用できる可能性がある^{23,25)}。Cadystinは、生物による環境修復 (bioremediation) に対する役割についても議論されている^{10,17)}。

カドミウム-cadystin複合体中の不安定硫黄の発見

Cd-BP1、Cd-BP2ともにカドミウムイオンとcadystinの複合体であるが、これらはゲルろ過やイオン交換クロマトグラフィーにおける溶出位置、複合体の安定性、UVおよびCDスペクトル、およびペプチドあたりのカドミウム含有量などが異なる。Cd-BP1の第三の成分である不安定硫黄の発見により、これらの違いを説明できるようになった。

精製したCd-BP1の再構成実験を行おうとした際のことである。カドミウムとcadystinを解離させるため、Cd-BP1溶液のpHを低下させたところ、硫化水素の臭いが確認された。そこでこのカドミウム-cadystin複合物に新たな成分として不安定硫黄が含まれることを化学的に確認した⁵⁾。これは、メタロチオネインおよび関連するペプチドの領域における初めての発見である。

Cd-BP1のペプチドあたりのカドミウム結合量は、Cd-チオネインの約2倍である。分裂酵母を1 mM塩化カドミウム培地中で培養した際の細胞内不安定硫黄の発生は、カドミウムを含まない培地で培養した場合の数倍に増加することが確認された²¹⁾。4年後には、カドミウム含有培地でやはりカドミウム-不安定硫黄-cadystin複合体を生成する *Candida glabrata* においても同様の事実が確認され²⁶⁾、*S. pombe* や *C. glabrata* におけるカドミウム耐性と不安定無機硫黄の細胞内発生との密接な関連が示唆された。分裂酵母では、細胞内不安定硫黄の発生を促すといわれるシスチンやグルタミン酸²⁷⁾を、カドミウム含有最少合成培地に添加して培養すると、Cd-BP2に対するCd-BP1の合成量が相対的に増加した²³⁾。また、細胞内不安定硫黄の発生を抑制するといわれるメチオニン^{27,28)}を上記培地へ添加して培養すると、相対的にCd-BP1の合成量が減少した²³⁾。したがって、培地へのシスチンの添加は分裂酵母のカドミウム耐性を増強し、メチオニンの添加はカドミウム耐性を弱めると考えられた。

高濃度の硫化水素は毒性が強いが、適度な濃度の硫化水素は、動物細胞におけるシグナル物質であると考えられるようになり、異なる面でもその重要性が認識されてきた²⁹⁾。硫化水素は γ -グルタミルシステイン合成酵素の活性を促進してグルタチオンレベルを上昇させることが知られており、これは硫化水素が細胞の酸化ストレスに対する防御物質として作用することを示唆している³⁰⁾。植物においても、葉から取り込まれた硫化水素はシステイン、 γ -グルタミルシステイン、およびグルタチオン濃度を増大させるという³¹⁾。以上のことから、分裂酵母において、カドミウムイオンは細胞内硫化水素の発生を促し、硫化水素はグルタチオンやcadystinの合成を促進すると考えられる。また高分子量複合体、Cd-BP1に硫黄が含まれていたという報告^{5,21)}は、Cd-BP1が光反応性半導体ナノ粒子であること示した研究の端緒となったと考えられる¹⁵⁾。

Cadystinの化学構造

Cadystinのアミノ末端アミノ酸は、ダンシル化法によりグルタミン酸と決定され、カルボキシル末端はヒドラジン分解法によりグリシンと決定された²³⁾。

詳細な検討の結果、Cd-BP1とCd-BP2には主として2種のペプチドcadystin Aとcadystin Bが含まれていることが分かった (Fig. 1)²²⁾。

Cadystin Aには、 γ -グルタミルシステイン残基の繰り返し回数が3回あり、cadystin Bは、この繰り返し回数が2回である。Cadystin Aとcadystin BをカルボキシペプチダーゼPにより分解すると、グリシンと γ -グルタミルシステインのみが生じる。これらのペプチドの構造は、十分な時間をかけて完全に決定され^{4,22)}、さらにcadystin Aおよびcadystin Bが化学的に完全合成されて、これらの構造が再確認された³²⁾。Cadystinには γ -グルタミルシステイン残基の繰り返し回数より大きいペプチドも含まれ

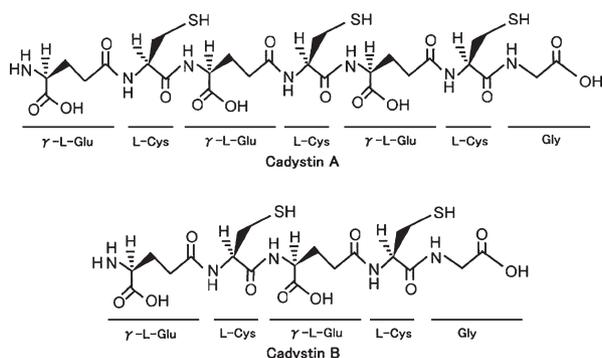


Fig. 1. Chemical structures of cadystin A and cadystin B. Cadystin A and B are the main components in Cd-labile sulfide-cadystin complex induced in *Schizosaccharomyces pombe*.

ているので、cadystinの一般構造は $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$ と表される ($n=2$ または $n>2$)。

分裂酵母 cadystin の確認およびその分類

*S. pombe*のCd-BP1, Cd-BP2, これらに含まれるcadystinや不安定硫黄などの発見に関しては、他の多くの研究者によって同一の実験系で繰り返し確認の実験が行われ、再現性が証明された。筆者らの発見の後、*S. pombe*のCd-BP1, Cd-BP2に関する最初の報告は、1986年にヨーロッパの研究者Grillらによって行われた³³⁾。ここでは、カドミウムのみでなく、他の重金属やヒ酸塩によってもcadystin合成が誘導されること、およびカドミウムにより、より重合度の高いcadystin ($n=4-8$)も合成されることが述べられている。米国のReeseらおよびReeseとWingeの2つの論文では、形成されるカドミウム-cadystin複合体は硫黄含量に関して不均一であり、そのため安定性も一定ではないと述べられている^{34,35)}。PlockeとKägiは、1992年に同様の対象についての結果を報告している³⁶⁾。彼らは改めて、分裂酵母において、カドミウムによりカドミウム複合体形成が誘導され、一般式で $n=2-4$ で表されるcadystin分子がこの複合体に存在することを示した。ここで再び複合体の特徴的なUVおよびCDスペクトルが示された。また、分画された複合体中のカドミウム、cadystin、および硫黄の比率が再度報告された。

メタロチオネインの分類法の検討は1978年、メタロチオネインおよび他の低分子量金属結合タンパク質に関する第1回国際会議で行われた。この分類法は1985年に開催された第2回国際会議で改訂された。ここで、メタロチオネインはウマ腎臓メタロチオネインといくつかの共通点をもつポリペプチドと定義された。メタロチオネインとして3つのクラスが提唱され、cadystinは第3のクラスに分類された¹¹⁾。このクラスにはcadystin, phyto-metallothionein, またはphytochelatinなどの変則的で非翻訳的に合成され、メタルチオレート結合を形成するポリペプチドが含まれる。

Cadystinとカドミウムおよび無機硫黄との複合体形成

分裂酵母におけるカドミウム-不安定硫黄-cadystin複合体形成に関する全体像をFig. 2に示した (Akira Murasugi; Cadystin (phytochelatin) synthesis induced by cadmium and resulted formation of cadmium sulphide nanoparticles in *Schizosaccharomyces pombe*, *Current Topics in Biotechnology*, 4, 70 (2008)³⁷⁾ から、Research Trendsの許可を得て転載)。

細胞内に取り込まれたカドミウムイオンは、cadystin

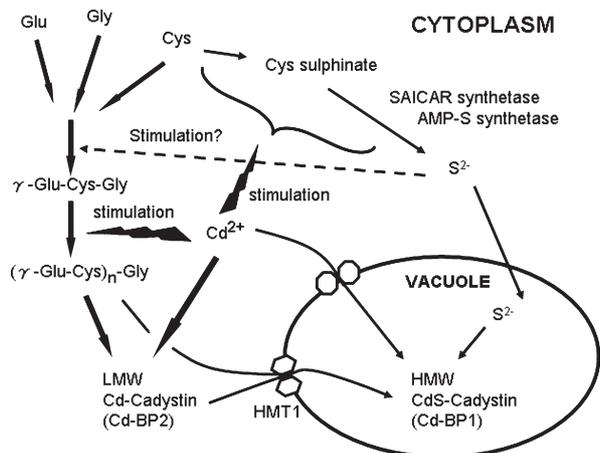


Fig. 2. Model of Cd-sulphide-cadystin formation in fission yeast. Cadmium ions induce production of cadystin peptides, which bind cadmium ions to form LMW Cd-cadystin complex (Cd-BP2). LMW Cd-cadystin complex and also apo-cadystin are sequestered into the vacuoles by the ABC-type transporter HMT1. In the vacuole, LMW Cd-cadystin complex binds more cadmium ions and sulphide to form more stable complex, HMW Cd-sulphide-cadystin complex (Cd-BP1). The sulphide is from the purine biosynthesis pathway. The figure is reproduced from Ref. 37 with permission by Research Trends.

合成酵素を直接活性化されるといわれる^{12,38,39}。カドミウムイオンは、また無機硫黄の発生を促進する^{21,26}。Cadystin合成酵素については、*in vitro*でリン酸化されることによって活性化されるとも報告されている⁴⁰。カドミウムイオンは、細胞質中のcadystinと結合してカドミウム-cadystin複合体 (Cd-BP2) を形成する。遊離のカドミウムイオンは液胞に取り込まれる。また、遊離のcadystinまたはCd-BP2についても、HMT1 (heavy metal tolerance 1) タンパク質を介して液胞に取り込まれると考えられた¹⁴。液胞の中では、さらにカドミウムイオン、cadystin、および無機硫黄がカドミウム-cadystin複合体 (Cd-BP2) に取り込まれ、カドミウム-硫黄-cadystin複合体 (Cd-BP1) を形成すると考えられる。γ-グルタミルシステイン合成酵素活性は、細胞内の無機硫黄により促進され、このためcadystin合成酵素の基質であるグルタチオンの濃度が増加すると考えられる³¹。

分裂酵母の *hmt1* 遺伝子は、カドミウム耐性に必須と考えられたABC (ATP-binding cassette)-型のトランスポータータンパク質をコードしている¹⁴。HMT1ポリペプチドは、液胞の膜に埋め込まれている。このトランスポーターは、アポcadystinおよびCd-BP2を液胞に取り入れるといわれていた。これらの結果は、生体外物質の無毒化に関する酵母液胞の重要性を示唆していた。しかし最近、このトランスポーターは少なくとも液胞を利用したカドミウムの除去に必須ではないという実験結果

も得られており、確認が必要である⁴¹。

カドミウム耐性に必須と思われるカドミウム-硫黄-cadystin複合体 (Cd-BP1) の生成に欠陥のある、分裂酵母のカドミウム感受性突然変異の一つでは、プリン生合成系の遺伝子に変異のあることが明らかになった⁴²。アデニココハク酸 (AMP-S) 合成酵素、およびコハク酸アミノイミダゾールカルボキサミドリボヌクレオチド (SAICAR) 合成酵素とともに、細胞中で低分子量カドミウム-cadystin複合体 (Cd-BP2) を高分子量カドミウム-硫黄-cadystin複合体 (Cd-BP1) に変換するために必要である⁴³。このため、これらの遺伝子に欠陥があるとカドミウムイオンに対する耐性は弱くなる。この結果から、細胞内の硫化水素の発生は、分裂酵母のカドミウム耐性に密接に関連していると考えられる。

分裂酵母などの生物における、カドミウムイオン耐性に関与する主たる成分は明らかとなってきた。しかしながら、cadystin合成酵素活性の調節機構などについては不明確な部分も残っており、これを含めたカドミウム耐性に関する全体の機構を明らかにする必要がある。

光反応性半導体としての硫化カドミウム結晶ナノ粒子

大きな硫化カドミウム結晶は、光反応性の半導体であり、太陽光を広い波長に渡って吸収する。しかし、直径が10 nmより小さい半導体粒子は、その粒子の大きさに依存した光吸収帯を持つようになる (量子サイズ効果)。理論的には、粒子の大きさを制御することによって、ある特定の波長の光を吸収できるように調整することもできるだろう⁴⁴。

一般に、粒子サイズをそろえたナノメートルスケールの結晶を調製する際の主な問題は、小さな結晶が、より大きな結晶よりも熱力学的に不安定であるため、結晶が大きくなりやすいということである (オストワルド成長)。

Dameronらは、カドミウムイオンによって分裂酵母やカンジダ (*C. glabrata*) に誘導合成されるカドミウム-硫黄-cadystin複合体は、ナノメートルスケールの硫化カドミウム結晶コアが、それを被覆するcadystinによって安定化されたものであることを報告した¹⁵。

Fig. 3には、このカドミウム-硫黄-cadystin複合体を模式的に示した (Akira Murasugi; Cadystin (phytochelatin) synthesis induced by cadmium and resulted formation of cadmium sulphide nanoparticles in *Schizosaccharomyces pombe*, *Current Topics in Biotechnology*, 4, 71 (2008)³⁷), から Research Trends の許可を得て転載)。Cadystinは直径1~2 nmの硫化カドミウムの核化と成長を制御している。この粒子は、化学的に調製されるものに比べて均一性に優れ、粒子の核となっている硫化カドミウムの結晶

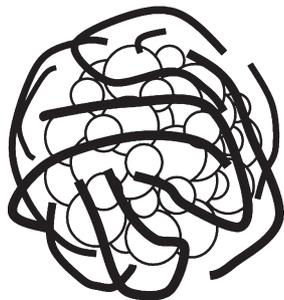


Fig. 3. Schematic representation of Cd-sulphide-cadystin complex nanoparticles. Diameter 1-2 nm Cd-sulphide core shown as the aggregate of small spheres is covered with cadystin molecules (thick curved lines). The complex is closed. The figure is reproduced from Ref. 37 with permission by Research Trends.

構造は、高圧下でのみ人工的に生成される硫化カドミウムの塩化ナトリウム型結晶構造と類似しているという⁴⁵⁾。また、Dameronらは別の論文の中で、*C. glabrata*においても同様のナノ粒子が生成するものの、このナノ粒子は、おもにcadystin Aで被覆された分裂酵母のものとなり、主としてより短いcadystin Bで構成されているため、分裂酵母のナノ粒子よりも結晶が成長しやすいなどと報告している⁴⁵⁾。これは分裂酵母に生成される半導体ナノ粒子の大きな有用性を示唆している。この結晶の構造についてはDanceとGizachewによっても議論されている⁴⁶⁾。彼らはこの粒子の核となる硫化カドミウム結晶構造に対して斜方立方八面体モデルを提唱している。

硫化カドミウム半導体量子ドットを得るために、分裂酵母の培養条件が検討された⁴⁷⁾。半導体硫化カドミウムナノ粒子の生成、この性質の解明、およびこれらを使用した理想的な半導体ダイオードの製造についての結果が報告されている⁴⁸⁾。また、このナノ粒子を効率よく得るために、さらに分裂酵母の培養条件の検討が行われている⁴⁹⁾。最近では、半導体量子ドットは、より高効率の太陽電池を製作するための素材候補として議論されている。

近年、ピキア酵母 (*Pichia*属) の高密度培養法を用いた、酵素タンパク質などの高効率発現が行われるようになってきている^{50,51)}。上記のナノ粒子を効率よく得られるようにするには、まず分裂酵母の高密度培養が必要となるだろう。さらに多量のナノ粒子を得るため、またはナノ粒子の品質を制御するためには、分裂酵母に対して何らかの遺伝子工学的変更が必要となるだろう。分裂酵母の宿主-ベクター系があれば、cadystin合成酵素や他の必要なタンパク質を過剰に発現させることは容易である。高品質のナノ粒子を工業的に製造するためには、このような方法を使用する必要があるだろう。

カゼインホスホペプチド-非結晶リン酸カルシウム

(CPP-ACP) は、カドミウム-硫黄-cadystin複合体同様のナノ粒子である。これは、虫歯の始まりである脱灰を抑制し、再石灰化を促進するため⁵²⁾、特定保健用食品であるガムおよび乳飲料の関与成分として使用されている。最近、このCPP-ACPの効果をヒトで確認するため、いくつかの臨床試験が行われている⁵³⁻⁵⁵⁾。このナノ粒子は、リン酸カルシウム結晶がコアとなっており、これをカゼインホスホペプチドが被覆して、この小さな結晶を安定化している。したがって、およその構造はカドミウム-硫黄-cadystin複合体とよく似ている⁵⁶⁾。しかし、CPP-ACPの場合は、必要なリン酸、カルシウム、およびホスホペプチドを用意し、人工的に製造されたものである。高い品質のナノ粒子硫化カドミウム半導体を得るためのもう一つの方法は、精製したcadystin、カドミウムイオン、および硫黄イオンなどを準備し、最適の条件で人工的にこれらを混合し、必要とされるナノ粒子を得ることであろう。

Cadystin合成酵素

Cadystin, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$ の合成を触媒する酵素は、シラタマソウ (*Silene cucubalus*) の細胞に見いだされた¹²⁾。ReaらはFig. 4の例に示されるこの酵素の反応機構を提唱した。この酵素はまず、グルタチオンなどの γ -グルタミルシステイン残基供与体から γ -グルタミルシステイン残基を受け取ってアシル化された中間体となり(反応1)、その後、その γ -グルタミルシステイン残基を、受容体であるグルタチオンに転移して(反応2) cadystin Bを生成する。この例では、 γ -グルタミルシステイン残基の供与体も受容体もグルタチオンであるが、受容体をcadystin Bとすれば、より大きなcadystin A分子が合成される⁵⁷⁾。

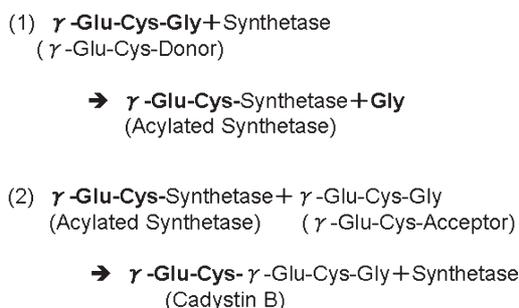


Fig. 4. Cadystin B synthesis. Reaction (1): Intermediate acylated enzyme formation. Reaction (2): Transfer of γ -glutamyl-cysteinyll moiety. The cysteinyl residue of 56th amino acid from N-terminus in the synthetase from *Arabidopsis thaliana* is one of the acylation site by γ -glutamyl-cysteinyll moiety⁵⁹⁾. In the cadystin B synthesis, glutathione is the donor and also the acceptor molecule for a γ -glutamyl-cysteinyll moiety, but in general, the acceptor molecule is $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n=1$ or $n>1$).

この酵素はカドミウムイオンまたはリン酸化により活性化されると考えられる^{12,38,40}。また、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の葉、および根の細胞では、カドミウムが存在するか否かはこの合成酵素の転写に影響を与えないので、この合成酵素は構成的に合成されていると考えられる¹³。この酵素の分子量は約95,000で、4つのサブユニットから成るといわれ、基質であるグルタチオンに対する K_m (半飽和定数) は6.7 mMである¹²。酵素活性を促進するカドミウムイオンは、この酵素により合成された反応物により捕捉され、その結果酵素活性は減弱すると考えられる³⁸。また、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) の合成酵素は、アミノ酸番号49番のスレオニンのリン酸化により活性が増大すると言われる⁴⁰。今後、これらの調節機構により活性が変化する際の酵素の構造変化が研究されるだろう。これら cadystin 合成酵素の活性調節のメカニズムについての全体像が明らかにされることが望まれる。

この合成酵素をコードする遺伝子は、分裂酵母からもクローニングされた¹³。この遺伝子を使用して大腸菌中で発現された酵素は、反応液中のグルタチオンに依存して $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$ を合成した。この酵素は一定濃度のカドミウムイオンによってその活性が促進されることが示された。

Cadystin 合成酵素は、藍色細菌 (シアノバクテリア) *Nostoc* から精製された。精製酵素はX線結晶解析法により分析され、三次元構造が決定された⁵⁸。しかし、この酵素のペプチド結合形成活性は非常に弱い。したがって、より強い合成活性を持つ酵素について三次元構造が決定され、種々の活性調節による酵素自体の構造の変化が確認されることが望まれる。

他の生物における cadystin および その合成酵素遺伝子の存在

Cadystin 発見後数年の間に、植物のカドミウム結合物について、いくつかの報告が行われているが、その時点においてもこれら複合体の詳細な分析は行われていない^{59,60}。

カドミウムイオン添加培地で培養したインド蛇木 (*Rauvolfia serpentina*) の培養細胞中に、分裂酵母以外で初めて cadystin の存在が確認され、ヨーロッパの研究者 Grillらにより1985年に報告された⁹。このペプチドは、カドミウムイオンを始めとして銅イオン、水銀イオン、鉛イオンおよび亜鉛イオンなどによっても誘導合成されることが示され、phytochelatinと命名された。この植物培養細胞はカドミウムを含む培地で6日間培養され、細胞湿重量1 kgから約160 mgのカドミウム-ペプチド

複合体が得られたという。この複合体量は、分裂酵母からの収量の約3分の1であり、培養時間あたりの量では約20分の1となる。この論文でGrillらにより、カドミウム-ペプチド複合体のUVおよびCDスペクトルの特徴やペプチドの化学構造などが述べられているが、スペクトルは、筆者らがこの論文発表の4年前に発表した cadystin に関する論文中に掲載したものとほとんど同一であり²⁰、また、ペプチドの化学構造も、筆者らが1年前に発表した論文²²で記載した構造と基本的に同一である。したがって、植物に存在することが確認された phytochelatin は、すでに分裂酵母において発見されていた cadystin そのものである。この事実は、Thurman と Hardwick⁶¹、Lauro と Plocke⁶²、Owら⁶³、Prasad⁶⁴、Inoue¹⁶、Shawら¹⁷、Murasugi³⁷ など多くの研究者により確認されている。また Grillらは、複合体に含まれると思われる不安定硫黄については一切触れていない。彼らは、イヌバラ (*Rosa canina*)、シラタマソウ (*S. cucubalus*)、ヤム (*Discorea composita*) など多くの種類の植物培養細胞でも同様な結果を得たと報告した。これとは別に、cadystin は1986年、選択されたトマト培養細胞においても確認された⁶⁵。また1992年には、低濃度のカドミウムイオン存在下で生育させたトマト植物体のカドミウム複合体から、不安定硫黄も発見されている⁶⁶。1987年、cadystin および不安定硫黄は、ユーグレナ (*Euglena gracilis*) のカドミウム複合体においても発見された⁶⁷。この複合体については、さらに詳細に研究されている⁶⁸。ユーグレナにおいては、蓄積したカドミウム複合体は主として葉緑体に分布していた。また海洋性の緑藻、ドナリエラ的一种 (*Dunaliella tertiolecta*) においても、カドミウムによる誘導により多量の cadystin の合成が観察されている⁶⁹。一方、*C. glabrata* の場合には、銅イオンを含む培地で培養すると2種のメタロチオネン様のポリペプチド合成が促進されるが、前述のように、この酵母をカドミウムイオンが含まれる培地で培養すると cadystin が合成され、カドミウムイオンおよび不安定硫黄と複合体を形成する²⁶。さらには、無脊椎動物である線虫 (*Caenorhabditis elegans*) においても、cadystin 合成酵素をコードする遺伝子の塩基配列が、染色体DNAの配列中に発見され、cadystin 合成酵素がカドミウム耐性に必要とされることが明らかにされた⁷⁰。また他に、住血吸虫 (*Schistosoma mancons*, *Schistosoma mansoni*, および *Schistosoma japonicum*) や回虫 (*Parascaris univalens*) などの染色体DNAにもこの合成酵素遺伝子の塩基配列の存在が明らかにされている^{71,72}。ミミズ (*Eisenia fetida*) では、cadystin 合成酵素遺伝子がクローニングされ、カドミウムイオンによるこの遺伝子の転写

制御に関する結果が、同様に存在するメタロチオネイン遺伝子のカドミウムイオンによる転写制御に関する結果とともに報告された⁷³⁾。また一方では、原核生物シアノバクテリアにおいても cadystin 合成酵素が発見されている⁵⁸⁾。Cadystin は、これらの生物においても重金属を無毒化するために重要と考えられている。また、*C. elegans* には、分裂酵母と同様にカドミウムイオン無毒化のための ABC 型のトランスポーターの存在が報告されている⁷⁴⁾。以上のことから、cadystin は植物から分離されたとき、植物にちなんで phytochelatin と命名されたが、このペプチドは当初考えられていたより広く生物界に存在していることが明らかになってきた。また、既知の cadystin 合成酵素に共通するドメインのアミノ酸配列を使用した発現タンパク質の検索では、多くの原核生物に類似タンパク質が見いだされ、この酵素遺伝子の塩基配列を使用した cDNA 塩基配列の検索では、より多くの真核生物の cDNA に類似の塩基配列が確認されている⁷²⁾。したがって、cadystin は生物界において広く存在しており、重金属耐性などに関して大きな役割を果たしていると考えられる。

一方、これだけ多くの生物に存在すると思われる cadystin は、カドミウムや他の重金属などの無毒化のためだけに生成されるのだろうか？ ドナリエラでは cadystin が亜鉛によっても効率よく誘導合成されることや⁶⁹⁾、シロイヌナズナでは cadystin が合成されない場合極端に亜鉛に対して抵抗性を失うことなどから cadystin もメタロチオネインと同様に、生体に必要とされる金属のホメオスタシスに対する役割について議論されている⁷⁵⁾。また cadystin 合成酵素の進化などの観点からこのペプチドの存在意義についてより幅広い議論が行われている⁷²⁾。

生物学的環境指標としての使用

ヨーロッパ諸国や米国を含め各国において森林の減少が報告されている。工業地帯から排出される酸やオキシダントによる大気汚染がその原因の一つと考えられる。一方、有害重金属の地域的分布は、森林の減少区域と関連しているため、各地域の重金属汚染も森林減少の原因とも考えられるが、これまで生理学的な因果関係を示す直接的な証拠は得られていなかった。Gawel らは、ニューヨーク州のホワイトフェイス山のアカトウヒ (*Red spruce, Picea rubens*) とバルサムモミ (*Balsam fir, Abies balsamea*) の若い葉に含まれる cadystin B [(γ -Glu-Cys)₂-Gly] を測定し、森林の減衰との関連を調査した⁷⁶⁾。

成長期を含む期間中に経時的に若葉の cadystin B 含量を測定したところ、減衰が確認されているアカトウヒに関しては、ちょうどその成長時に cadystin B 含量の明ら

かな増加が観察された。これに対して、減衰が確認されていないバルサムモミでは、同様な測定を行ってもわずかな増加しか観察されなかった。この結果は、cadystin B 含量と樹木の減衰との関連を示すものと考えられる。また、成長時に cadystin B が増加している現象は、動物細胞におけるメタロチオネインの発現が細胞増殖や細胞分化に影響を与える現象と類似している可能性もある^{77,78)}。

ホワイトフェイス山では標高が高くなるほどアカトウヒの立ち枯れが増加していたが、それぞれの区域の健康な木の若葉に含まれる cadystin B の量をその成長時に測定したところ、標高が高くなるほど cadystin B が増加することがわかり、この結果からも樹木の立ち枯れと cadystin B 含量との関連が示唆された。このような測定を、標高を 1000 m に固定して 9 つの山について行い、これらの値をその区域の立ち枯れの割合に対してプロットしたところ、これらは有意に関連しているため、アカトウヒの葉に含まれる cadystin B 量増加は森林に対する重金属の害の強さを示すものと考えられる。

Gawel らは、次に、大気汚染に関連して種々の樹木の葉に含まれる cadystin B の測定について報告している⁷⁹⁾。INCO (International Nickel Company Limited) は、1972 年、銅の精錬所に 381 m の巨大な煙突を設置した。この煙突から飛散したニッケルと銅を、種々の地点に置いた鉢に植えられた泥炭ゴケ (peat moss) に蓄積された量として測定したところ、煙突から 10~40 km の地点で、これらの金属濃度の増加が確認された (1995 年)。それぞれの地点に自生するアメリカシラカバ (*Betula papyrifera*) の成長期である春の測定では、若葉 cadystin B 含量は、30 km 地点にピークが見られた (1993 年)。成長期でない秋に測定しても差はみられなかった。翌年、同様に種々の地点に自生するアメリカシラカバ、バルサムモミ、およびアメリカヤマナラシ (*Populus tremuloides*) について同様の測定をしたところ、同様な結果が得られている。また、地中に含まれる金属類の影響を排除するため、それぞれの地点で、土の表面を泥炭ゴケで覆った鉢でアメリカシラカバを生育させ、この若葉の cadystin B 含量を測定したところ、煙突から 25 km 地点における cadystin B 含量のピークがより明白に示された (1994 年)。したがって、特定の樹木の若葉に含まれる cadystin B の量は、大気汚染の生物学的環境指標となりうるだろう。

さらに Gawel と Hemond は、マサチューセッツ州工業地帯における地下水のヒ素による汚染についても、種々の区域の植物の葉に含まれる cadystin B 量との関連を調査した⁸⁰⁾。以前から行われている地下水の汚染の調査はサンプリング用の井戸を掘る必要があり多くの資金と時間が必要である。一方、その区域の生物に含有され

る汚染物の測定は、必ずしも土壌や地下水の汚染の程度を示さないという問題がある。ヒ素汚染の可能性のある地域において、浅い地下帯水層に沿って、今回初めてノルウェーカエデ (*Acer platanoides*)、カバ (*Betula populifolia*) およびセイヨウイソノキ (*Rhamnus frangula*) の葉の cadystin B 量を測定したところ、知られている地下水の汚染の状態をよく反映しており、また第二の汚染地下水の地域をも示している。これは EPA [アメリカ合衆国環境保護庁 (Environmental Protection Agency)] の環境リスクアセスメントの結果とも一致していた。したがって、樹木の葉の cadystin B 含量は、地下水の重金属汚染に関しても良い指標となると考えられる。

要 約

分裂酵母をカドミウムイオンに暴露すると多量のカドミウム-ペプチド複合体が誘導合成される。主要な複合体はカドミウム、cadystin と名づけられたペプチド、および酸不安定硫黄で構成されている。Cadystin および酸不安定硫黄は、この種の複合体中に見いだされたのは初めてである。Cadystin の主要成分の化学構造は、 γ -Glu-Cys- γ -Glu-Cys- γ -Glu-Cys-Gly、および γ -Glu-Cys- γ -Glu-Cys-Gly と決定された。分裂酵母では、カドミウム耐性に関連する主要な成分はメタロチオネインではなく cadystin である。硫化カドミウム結晶は半導体である。分裂酵母に誘導される cadystin-カドミウム-硫黄複合体は、ナノ粒子を形成していることがわかった。この粒子は、硫化カドミウムの核とこれを覆う cadystin から成っており均一である。この粒子は、特定波長を吸収する光反応性半導体材料として有用であろう。一方、cadystin と同一のペプチドは多くの種類の植物細胞でも見いだされ、phytochelatin と名づけられた。多くの植物においても、カドミウム耐性に関連する主要な成分はメタロチオネインではなく cadystin である。グルタチオンの γ -Glu-Cys 残基を、受容体である別のグルタチオンに転移する酵素が植物細胞に見いだされ、cadystin 合成酵素と名づけられた。この酵素の遺伝子がクローン化され、クローン化された遺伝子から発現された酵素を使用して酵素反応の解析が行われた。Cadystin や合成酵素遺伝子は、ある種の酵母や多くの植物だけでなく、前核細胞である細菌類や下等動物にも存在している。Cadystin は多くの種類の重金属によって誘導合成されるので、特定の植物の葉に含まれる γ -Glu-Cys- γ -Glu-Cys-Gly 量を測定することで、地下水および大気中の重金属汚染の状態を把握することができる。Cadystin は、環境汚染に関する信頼性の高い生物学的指標である可能性がある。

文 献

- 1) 木村正巳: タンパク質 核酸 酵素 (別冊 26 号), p.307-319, 共立出版, 東京 (1983).
- 2) Murasugi, A., Wada, C., and Hayashi, Y.: *J. Biochem.*, **90**, 1561-1564 (1981).
- 3) 藤田政之: 化学と生物, **23**, 553-555 (1985).
- 4) Kondo, N., Isobe, M., Imai, K., Goto, T., Murasugi, A., and Hayashi, Y.: *Tetrahedron Lett.*, **24**, 925-928 (1983).
- 5) Murasugi, A., Wada, C., and Hayashi, Y.: *J. Biochem.*, **93**, 661-664 (1983).
- 6) Clemens, S., Kim, E. J., Neumann, D., and Schroeder, J. I.: *EMBO J.*, **18**, 3325-3333 (1999).
- 7) Ow, D. W.: *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.*, **29**, 213-219 (1993).
- 8) Clemens, S.: *Biochimie*, **88**, 1707-1719 (2006).
- 9) Grill, E., Winnacker, E.-L., and Zenk, M. H.: *Science*, **230**, 674-676 (1985).
- 10) Grill, E., Mishra, S., Srivastava, S., and Tripathi, R. D.: *Environmental Bioremediation Technologies*, (Singh, S. N. and Tripathi, R. D.), p.101-146, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (2007).
- 11) Fowler, B. A., Hildebrand, C. E., Kojima, Y., and Webb, M.: *Experientia Suppl.*, **52**, 19-22 (1987).
- 12) Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.-L., and Zenk, M. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6838-6842 (1989).
- 13) Ha, S. B., Smith, A. P., Howden, R., Dietrich, W. M., Bugg, S., O'Connell, M. J., Goldsbrough, P. B., and Cobbett, C. S.: *Plant Cell*, **11**, 1153-1163 (1999).
- 14) Ortiz, D. F., Ruscitti, T., McCue, K. F., and Ow, D. W.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 4721-4728 (1995).
- 15) Dameron, C. T., Reese, R. N., Mehra, R. K., Kortan, A. R., Carroll, P. J., Steigerwald, M. L., Brus, L. E., and Winge, D. R.: *Nature*, **338**, 596-597 (1989).
- 16) Inouhe, M.: *Braz. J. Plant Physiol.*, **17**, 65-78 (2005).
- 17) Shaw, B. P., Prasad, M. N. V., Jha, V. K., and Sahu, B. B.: *Trace Elements in the Environment: Biogeochemistry, Biotechnology, and Bioremediation*, (Prasad, M. N. V., Sajwan, K. S., and Naidu, R.), p.291-324, CRC, Boca Raton (2006).
- 18) Rauser, W. E. and Curvetto, N. R.: *Nature*, **287**, 563-564 (1980).
- 19) Weigel, H. J. and Jäger, H. J.: *Plant Physiol.*, **65**, 480-482 (1980).
- 20) Murasugi, A., Wada, C., and Hayashi, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 1021-1028 (1981).
- 21) Murasugi, A., Wada-Nakagawa, C., and Hayashi, Y.: *J. Biochem.*, **96**, 1375-1379 (1984).
- 22) Kondo, N., Imai, K., Isobe, M., Goto, T., Murasugi, A., Wada-Nakagawa, C., and Hayashi, Y.: *Tetrahedron Lett.*, **25**, 3869-3872 (1984).
- 23) 村杉 章: 生化学, **58**, 182-187 (1986).
- 24) Murasugi, A. and Hayashi, H.: *Eur. J. Biochem.*, **57**, 169-175 (1975).
- 25) Jackson, P. J., Delhaize, E., Robinson, N. J., Unkefer, C. J., and Furlong, C.: US Patent 4909944 (1990).
- 26) Mehra, R. K., Tarbet, E. B., Gray, W. R., and Winge, D. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8815-8819 (1988).
- 27) Pavlenko, N. M. and Sen'kina, Z. E.: *Pishch. Prom-st.*

- Ser.*, **1**, 27–30 (1979).
- 28) Flavin, M.: *Metabolic Pathways*, (Greenberg, D. M.), Vol. VII, p.457–503, Academic Press, New York (1975).
 - 29) Szabó, C.: *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**, 917–935 (2007).
 - 30) Kimura, Y. and Kimura, H.: *FASEB J.*, **18**, 1165–1167 (2004).
 - 31) Herschbach, C., van der Zalm, E., Schneider, A., Jouanin, L., De Kok, L. J., and Rennenberg, H.: *Plant Physiol.*, **124**, 461–473 (2000).
 - 32) Kondo, N., Isobe, M., Imai, K., and Goto, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 71–83 (1985).
 - 33) Grill, E., Winnacker, E. L., and Zenk, M. H.: *FEBS Lett.*, **197**, 115–120 (1986).
 - 34) Reese, R. N., Mehra, R. K., Tarbet, E. B., and Winge, D. R.: *J. Biol. Chem.*, **263**, 4186–4192 (1988).
 - 35) Reese, R. N. and Winge, D. R.: *J. Biol. Chem.*, **263**, 12832–12835 (1988).
 - 36) Plocke, D. J. and Kägi, J. H. R.: *Eur. J. Biochem.*, **207**, 201–205 (1992).
 - 37) Murasugi, A.: *Current Topics Biotechnol.*, **4**, 65–73 (2008).
 - 38) Loeffler, S., Hochberger, A., Grill, E., Winnacker, E.-L., and Zenk, M. H.: *FEBS Lett.*, **258**, 42–46 (1989).
 - 39) Rea, P. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 507–508 (2006).
 - 40) Wang, H.-C., Wu, J.-S., Chia, J.-C., Yang, C.-C., Wu, Y.-J., and Juang, R.-H.: *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 7348–7355 (2009).
 - 41) Sooksa-Nguan, T., Yakubov, B., Kozlovskyy, V. I., Barkume, C. M., Howe, K. J., Thannhauser, T. W., Rutzke, M. A., Hart, J. J., Kochian, L. V., Rea, P. A., and Vatamaniuk, O. K.: *J. Biol. Chem.*, **284**, 354–362 (2009).
 - 42) Speiser, D. M., Ortiz, D. F., Kreppel, L., Scheel, G., McDonald, G., and Ow, D. W.: *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5301–5310 (1992).
 - 43) Juang, R. H., McCue, K. F., and Ow, D. W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **304**, 392–401 (1993).
 - 44) Dameron, C. T., and Dance, I. G.: *Biomimetic Materials Chemistry*, (Mann, S.), p.69–90, John Wiley and Sons, New York (1996).
 - 45) Dameron, C. T. and Winge, D. R.: *Trends Biotechnol.*, **8**, 3–6 (1990).
 - 46) Dance, I. and Gizachew, D.: *J. Inorg. Biochem.*, **51**, 491 (1993).
 - 47) Williams, P., Keshavarz-Moore, E., and Dunnill, P.: *Enzyme Microb. Technol.*, **30**, 354–362 (2002).
 - 48) Kowshik, M., Deshmukh, N., Vogel, W., Urban, J., Kulkarni, S. K., and Paknikar, K. M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **78**, 583–588 (2002).
 - 49) Krumov, N., Oder, S., Perner-Nochta, I., Angelov, A., and Posten, C.: *J. Biotechnol.*, **132**, 481–486 (2007).
 - 50) Higgins, D. R. and Cregg, J. M.: *Methods in Molecular Biology, Pichia Protocols*, (Higgins, D. R. and Cregg, J. M.), p.1–15, Humana Press, Totowa, NJ (1998).
 - 51) Murasugi, A.: *Recent Pat. Biotechnol.*, **4**, 153–166 (2010).
 - 52) 村杉 章 : *Food Style 21*, **13**, 40–41 (2009).
 - 53) Shen, P., Cai, F., Nowicki, A., Vincent, J., and Reynolds, E. C.: *J. Dent. Res.*, **80**, 2066–2070 (2001).
 - 54) Walker, G. D., Cai, F., Shen, P., Bailey, D. L., Yuan, Y., Cochrane, N. J., Reynolds, C., and Reynolds, E. C.: *Aust. Dent. J.*, **54**, 245–249 (2009).
 - 55) Morgan, M. V., Adams, G. G., Bailey, D. L., Tsao, C. E., Fischman, S. L., and Reynolds, E. C.: *Caries Res.*, **42**, 171–184 (2008).
 - 56) Cross, K. J., Huq, N. L., and Reynolds, E. C.: *Curr. Pharm. Des.*, **13**, 793–800 (2007).
 - 57) Rea, P. A., Vatamaniuk, O. K., and Rigden, D. J.: *Plant Physiol.*, **136**, 2463–2474 (2004).
 - 58) Vivares, D., Arnoux, P., and Pignol, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 18848–18853 (2005).
 - 59) Wagner, G. J. and Trotter, M. M.: *Plant Physiol.*, **69**, 804–809 (1982).
 - 60) Wagner, G. J.: *Plant Physiol.*, **76**, 797–805 (1984).
 - 61) Thurman, D. and Hardwick, K.: *New Scientist*, **10**, 44–45 (1988).
 - 62) Lauro, M. M. and Plocke, D. J.: *Metallothionein IV*, (Klaassen, C. D.) p.195–199, Birkhäuser Verlag, Basel (1999).
 - 63) Ow, D. W., Ortiz, D. F., Speiser, D. M., and McCue, K. F.: *Metal Ions in Fungi*, (Winkelmann, G. and Winge, D. R.), p.339–359, Marcel Dekker, New York (1994).
 - 64) Prasad, M. N. V.: *Heavy Metal Stress in Plants from Molecules to Ecosystems*, (Prasad, M. N. V.), 2nd Edition, p.47–83, Springer-Verlag, Heidelberg (2004).
 - 65) Steffens, J. C., Hunt, D. F., and Williams, B. G.: *J. Biol. Chem.*, **261**, 13879–13882 (1986).
 - 66) Reese, R. N., White, C. A., and Winge, D. R.: *Plant Physiol.*, **98**, 225–229 (1992).
 - 67) Weber, D. N., Shaw, C. F. III., and Petering, D. H.: *J. Biol. Chem.*, **262**, 6962–6964 (1987).
 - 68) Mendoza-Cózatl, D. G., Rodríguez-Zavala, J. S., Rodríguez-Enríquez, S., Mendoza-Hernandez, G., Briones-Gallardo, R., and Moreno-Sánchez, R.: *FEBS J.*, **273**, 5703–5713 (2006).
 - 69) Hirata, K., Tsujimoto, Y., Namba, T., Ohta, T., Hirayanagi, N., Miyasaka, H., Zenk, M. H., and Miyamoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 24–29 (2001).
 - 70) Vatamaniuk, O. K., Bucher, E. A., Ward, J. T., and Rea, P. A.: *J. Biol. Chem.*, **276**, 20817–20820 (2001).
 - 71) Vatamaniuk, O. K., Bucher, E. A., Ward, J. T., and Rea, P. A.: *Trends Biotechnol.*, **20**, 61–64 (2002).
 - 72) Clemens, S.: *J. Plant Physiol.*, **163**, 319–332 (2006).
 - 73) Brulle, F., Cocquerelle, C., Wamalah, A. N., Morgan, A. J., Kille, P., Leprêtre, A., and Vandenbulcke, F.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **71**, 47–55 (2008).
 - 74) Vatamaniuk, O. K., Bucher, E. A., Sundaram, M. V., and Rea, P. A.: *J. Biol. Chem.*, **280**, 23684–23690 (2005).
 - 75) Tennstedt, P., Peisker, D., Böttcher, C., Trampczynska, A., and Clemens, S.: *Plant Physiol.*, **149**, 938–948 (2009).
 - 76) Gawel, J. E., Ahner, B. A., Friedland, A. J., and Morel, F. M. M.: *Nature*, **381**, 64–65 (1996).
 - 77) 高野康夫 : *ファルマシア*, **33**, 61–62 (1997).
 - 78) Davis, S. R. and Cousins, R. J.: *J. Nutr.*, **130**, 1085–1088 (2000).
 - 79) Gawel, J. E., Trick, C. G., and Morel, F. M. M.: *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 2108–2113 (2001).
 - 80) Gawel, J. E. and Hemond, H. F.: *Environ. Pollut.*, **131**, 125–135 (2004).