

## システインジオキシゲナーゼの構造と遺伝子発現の臓器特異性

細川 優<sup>1)</sup>, 坪山 宜代<sup>2)</sup>, 東條 仁美<sup>3)</sup>, 戸谷 誠之<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>国立健康栄養研究所\*, (<sup>2)</sup>高知医科大学\*\*, (<sup>3)</sup>神奈川県立栄養短大\*\*\*)

### Primary Structure and Functional Expression of the Cysteine Dioxygenase (CDO) cDNA

Yu HOSOKAWA<sup>1)</sup>, Nobuyo TSUBOYAMA<sup>2)</sup>, Hitomi TOJO<sup>3)</sup>, and Masayuki TOTANI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>The National Institute of Health and Nutrition <sup>2)</sup>Kochi Medical University

<sup>3)</sup>Kanagawa Prefectural Junior College of Nutrition

cDNA clones, rCDO-39 and hCDO - 1, were isolated and characterized. rCDO-39, encoding the rat liver CDO contained a 1,458 b insert. hCDO-1, encoding the human liver CDO contained a 1,516 b insert. Both cDNAs encoded the polypeptides of 200 amino acids. Sequence comparison revealed a 91% homology in the amino acids between rat and human CDO. A potential iron binding domain was observed in the amino acid sequences of rat and human CDO. Significant expression of CDO gene was observed in liver, kidney, lung and brain but not in heart and skeletal muscle.

システインジオキシゲナーゼ (CDO) はシステインのチオール基に分子状の酸素を添加してシステインスルフィン酸を生成する反応を触媒する。CDO は補欠分子として非ヘム鉄を含む22.5kDa の金属酵素で、肝臓に高い活性が認められる<sup>1)</sup>。 [<sup>14</sup>C]-システインあるいは [<sup>35</sup>S]-システインを用いたトレーサー実験の結果から、CDO により調節される CDO 経路がタウリン合成の主経路であることが報告されている<sup>2,3)</sup>。我々はこれまで、タウリン合成に影響する食餌因子の検討を行い、食餌タンパクのアミノ酸バランスと含硫アミノ酸濃度との相互作用により調節される機序を推定した<sup>4,5)</sup>。一方、ヒトのタウリン代謝はこれまで不明な点が多かった。ヒトの体内では生合成能が低く、主として食事から供給されると考えられていた<sup>6)</sup>。しかし、完全中心静脈栄養患者の輸液中にシステインの前駆体であるグルタチオンを添加すると、尿中タウリン排泄量の著しい増加が認められる<sup>7)</sup>。この結果から、ヒトにもかなり高いタウリン合成活性が存在し、ラットと同様に含硫アミノ酸濃度にレスポンスすると考えられた。

---

\*所在地：東京都新宿区戸山1-23-1 (〒162)

\*\*所在地：高知県南国市岡豊町小連 (〒783)

\*\*\*所在地：神奈川県横浜市保土ヶ谷区桜ヶ丘2-43-7 (〒240)

本研究では、ラットおよびヒト肝臓 CDO 由来の cDNA をクローニングし、ヒトにもラットと同じタイプの CDO が存在することを明らかにするとともに、CDO 遺伝子の発現の臓器特異性を検討した。

## 実験方法

### 1. cDNA の構造解析

ラットの cDNA (rCDO-39) は、 $\lambda$ gt11 をベクターとした肝臓の cDNA ライブラリーからイムノスクリーニングとプラークハイブリダイゼーションで単離した。ヒト cDNA (hCDO-1) は、 $\lambda$ gt10 をベクターとした肝臓の cDNA ライブラリーから rCDO-39 の挿入 DNA をプローブに用いて単離した。cDNA から挿入 DNA を精製し、pUC18 にサブクローニング後、ジデオキシ法<sup>8)</sup>でシークエンスした。

### 2. ノーザンプロット解析

グアニジンチオシアネート-フェノールクロロフォルム法<sup>9)</sup>で粗 RNA を分離した。ポリ (A)<sup>+</sup> RNA は、粗 RNA からオリゴテックス-dT30 (第一化学) で精製した。20  $\mu$ g の粗 RNA あるいは 1  $\mu$ g のポリ (A)<sup>+</sup> RNA をサンプルとして、ホルムアルデヒドを含む 1 % アガロースゲルで電気泳動後、ナイロンフィルターに転写した。ハイブリダイゼーションは以前の報告と同様に行った<sup>10)</sup>。プローブには rCDO-39 の EcoRI 断片を用いた。

## 結果と考察

ラット肝臓 CDO 由来の cDNA クローン (rCDO-39) とヒト肝臓 CDO 由来の cDNA クローン (hCDO-1) の構造を解析した。図-1 に制限酵素地図を示した。白抜きボックスは読み取り枠を表して

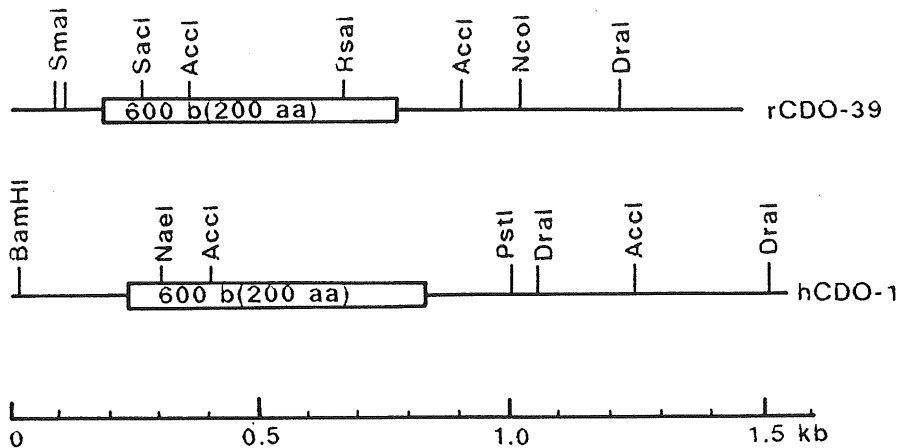


Fig. 1. Restriction map of cDNAs to rat and human CDO mRNAs. Boxes represent the coding region.

いる。rCDO-39は1,458bで、読み取り枠は翻訳開始コドンのメチオニンを含めて200アミノ酸のポリペプチドをコードしていた。5'および3'非翻訳領域はそれぞれ189bと669bで、3'非翻訳領域の2ヵ所にポリ (A) の付加シグナル (AATAAA) が認められた。hCDO-1は1,516bで、rCDO-39と同じく読み取り枠は200アミノ酸のポリペプチドをコードしていた。しかし、hCDO-1では、rCDO-39とは異なり二番目の ATG が翻訳開始コドンに使われていた。5'および3'非翻訳領域はそれぞれ229bと730bであった。3'非翻訳領域にはポリ (A) の付加シグナルが2ヵ所に認められ、hCDO-1では3'側の付加シグナルから15b下流に30bのポリ (A) が付加されていた。

rCDO-39とhCDO-1の塩基配列からラットとヒトCDOのアミノ酸配列を推定した。アミノ酸組成から計算したラットとヒトCDOの分子量は、それぞれ23,025と22,941であった。図-2ではラットとヒトCDOのアミノ酸配列のホモロジーを示した。rCDO-39とhCDO-1の読み取り枠は、塩基レベルで88%のホモロジーが認められた。5'と3'非翻訳領域には50%以上のホモロジーはなかった。アミノ酸レベルでは91%のホモロジウムが認められた。とくに、50番 Tyr から89番 Thr までの領域と146番 Serから190番 Pro までの領域では、約40アミノ酸にわたってホモロジーがあり、高度に保存されていた。さらに、76番 Cys から92番 His までの領域では、Cys と His が1～4個のアミノ酸を間にはさんで5個存在

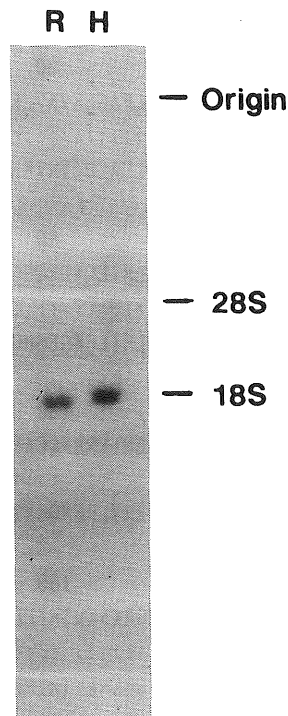
	1	10	20	30	40	50
Rat	MERT	ELLKP	RTLAD	LIRIL	HELF	FAGDEV
	EVV	EVQAV	LEAY	ESNP	AEWALY	
	::	::	::	::	::	::
Human	MEQT	EVLKP	RTLAD	LIRIL	HQLF	FAGDEV
	EVQAI	MEAY	ESDP	TEWAMY		
	60	70	80	90	100	
Rat	AKFD	QRYTR	NLVD	QNGK	FNLML	CWGE
	GHGSS	IHDHT	DSHC	FLKLL	QGG	
	::	::	::	::	::	::
Human	AKFD	QRYTR	NLVD	QNGK	FNLML	CWGE
	GHGSS	IHDHT	NSHC	FLKML	QGG	
	110	120	130	140	150	
Rat	NLKET	LFDP	DKKSN	EIKK	SERT	LRNQ
	CAYI	ND	IGL	HR	VENS	HTEP
	::	::	::	::	::	::
Human	NLKET	LFAR	PKKSN	EMVKK	SERV	LRNQ
	CAYI	ND	IGL	HR	VENS	HTEP
	160	170	180	190	200	
Rat	AVSL	HLYSP	PFDT	CHAF	DQRT	GHKN
	KVT	MTF	HSK	FGIR	TPFT	TSGS
	LENN					
	::	::	::	::	::	::
Human	AVSL	HLYSP	PFDT	CHAF	DQRT	GHKN
	KVT	MTF	HSK	FGIR	TPN	TSGS
	LENN					

Fig. 2. Comparison of the amino acid sequences of the rat and human CDO. Potential iron binding domain is underlined

する。x線解析されている含金属タンパク質の金属結合領域には、CysあるいはHisが2～4個のアミノ酸を間にはさんで存在することが報告されている<sup>11)</sup>。これに該当する領域は、上記の76番Cysから92番Hisまでの領域以外はCDO中に認められない。したがってこの領域が鉄の結合部位である可能性が高い。以上の結果から、ヒト肝臓にもラット肝臓から精製されているCDOと同じタイプの酵素が存在すると考えられる。

図-3では、ラットとヒト肝臓から分離精製したポリ(A)<sup>+</sup>RNAをサンプルとしたノーザンブロット解析の結果を示した。ラットでは18SrRNAのやや下方に単一バンドが認められ、サイズは約1.7kbと計算された。rCDO-39は1,458bであるので完全鎖cDNAに近いサイズであることが確かめられた。ヒトでは、ラットよりわずかに大きなサイズに単一バンドが認められた。

最後に、ラット各臓器のCDO mRNAレベルを測定した(図-4)。肝臓以外では、腎臓、肺および脳でmRNAが検出された。脳では中枢神経機能調節因子としてのタウリンの役割が注目されている。低いながらも脳でCDO遺伝子の発現が認められることは、タウリンの機能との関連から興味ぶかい。一方、タウリン濃度が高い心臓、骨格筋にはmRNAが認められなかった。これらの臓器では食餌由来あるいは他臓器で合成されたタウリンを取り込んで蓄積していると考えられる。



**Fig. 3.** RNA blot analysis of rat and human CDO mRNA. Poly (A)<sup>+</sup>RNA (1  $\mu$ g each) from rat (lane R) and human (lane H) liver was electrophoresed.

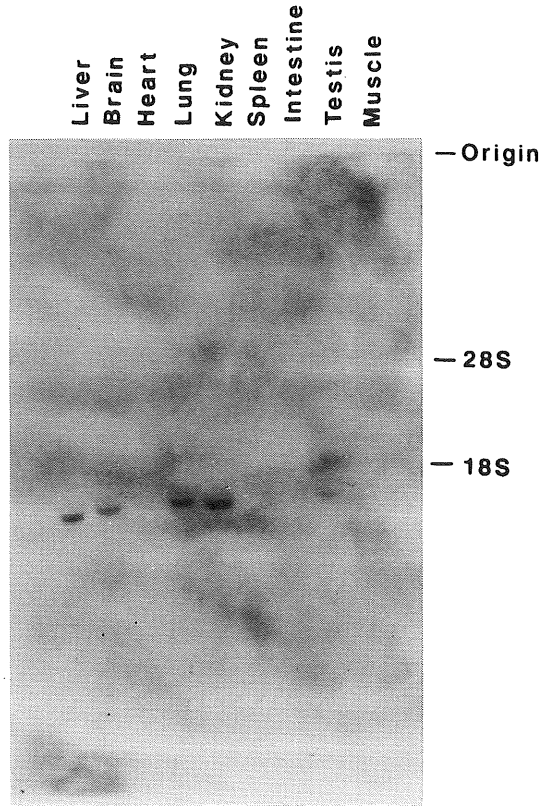


Fig. 4. Tissue distribution of rat CDO mRNA. Total RNA (20  $\mu$ g each) from indicated tissues was electrophoresed.

## 文 献

- 1) YAMAGUCHI, K., Y. HOSOKAWA, N. KOHASHI, Y. KORI, S. SAKAKIBARA and I. UEDA (1978) *J. Biochem.* 83 : 479.
- 2) YAMAGUCHI, K., S. SAKAKIBARA, J. ASAMIZU and I. UEDA (1973) *Biochem. Biophys. Acta* 297 : 48.
- 3) STIPANUK, M. H. (1979) *J. Nutr.* 109 : 2126.
- 4) KOHASHI, N., K. YAMAGUCHI, Y. HOSOKAWA, Y. KORI, O. FUJII and I. UEDA (1978) *J. Biochem.* 84 : 159.
- 5) HOSOKAWA, Y., S. NIIZEKI, H. TOJO, I. SATO and K. YAMAGUCHI (1988) *J. Nutr.* 118 : 456.
- 6) THOMPSON, D. E. and V. M. VIVIAN (1977) *J. Nutr.* 107 : 673.
- 7) HOSOKAWA, Y., I. SATO, A. MURAOKA, S. NIIZEKI, H. TOJO, YOSHIHARA, K. HASEGAWA and K. YAMAGUCHI (1988) *Trace Nutr. Res.* 4 : 191.
- 8) SANGER, F., S. NICKLEN and A. COULSON (1977) *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 5463.

- 9) CHOMCZYNSKI, P. and N. SACCHI (1987) *Anal. Biochem.* 162 : 156.
- 10) HOSOKAWA, Y., A. MATSUMOTO, J. OKA, H. ITAKURA and K. YAMAGUCHI (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168 : 473.
- 11) BERG, J. M. (1986) *Science* 232 : 485.