

rCTR1p (rat Copper Transport Protein) cDNA の クローニングと組織内発現

地野晴美, 広村 信, 安井裕之, 桜井 弘
(京都薬科大学, 代謝分析学教室*)

Cloning of rCTR1p (rat Copper Transport Protein) cDNA and its tissue distribution

Harumi CHINO, MAKOTO Hiromura, Hiroyuki YASUI and Hiromu SAKURAI

*Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry,
Kyoto Pharmaceutical University*

Copper is an essential trace metal involved in the active centers of various metalloenzymes such as cytochrome c oxidase, superoxide dismutase, and tyrosinase. However, copper produces free radicals by unspecific oxidation reactions, when it exists in free forms in cells. Therefore, strict regulations both quantity and chemical forms of copper in cells are essential. CTR1 (Copper Transport Protein 1), which is a membrane protein that controls the intracellular copper transport, has been identified in *Saccharomyces cerevisiae* and human. However, the functions have not been revealed. Therefore, to clarify the mechanism for the copper transport systems on the cell membranes, we did cDNA cloning of the cell membrane copper transport protein of Wistar rat, which is homologous to CTR1. rCTR1p consisting of 187 amino acids showed 91% homology to human CTR1p, and found to distribute in various tissues from the results on the expression of mRNA.

銅は生体必須元素の一つであり、恒常性に維持されなければならない。銅はシトクロムcオキシダーゼや、スーパーオキシドジスムターゼ、チロシナーゼなど種々の酵素の活性中心を構成する金属元素である¹⁾が、遊離した状態では非特異的に酸化還元反応を触媒しフリーラジカルを産生するため、生体に毒性を示すことがある²⁾。この毒性発現を回避するためには、生体内の銅の量と化学形は厳密に制御される必要がある。

細胞膜上で銅の細胞内輸送を制御しているタンパク質にはCTR1 (Copper Transport Protein 1) が知ら

* 所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

れ、すでに *Saccharomyces cerevisiae*³⁾ やヒト⁴⁾ において同定されている。しかし、その機能についてはまだ明らかにされていないことが多い。一方、近年銅代謝異常モデル動物として知られている LEC (Long-Evans Cinnamon) ラット⁵⁾ を用いた細胞内銅輸送システムに関する様々な研究が行われている⁶⁻⁷⁾。

そこで我々は、細胞膜上での銅輸送機構を解明する目的で、CTR1に相同性のある Wistar ラットの細胞膜銅輸送タンパク質の cDNA クローニングを行うとともに、各臓器における mRNA の発現量についても検討した。

実験材料

M細胞 (rat hepatocyte cell line) は 10% FBS (fetal bovine serum), Penicillin G (10 units/ml), Streptomycin (10 μ g/ml) および Gentamicin (10 μ g/ml) を含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 中で培養した。ラット脳ライブラリーからのスクリーニングには XL 1-Blue MRF' strain と SOLR strain (STRATAGENE 社) を使用した。

実験方法

1. cDNA クローニング

1-1 PCR クローニング

M-cell から AGPC 法により total RNA を抽出し、OligotexTM-dT30 <super> (TaKaRa) により mRNA を精製した。1 μ g の mRNA を鋳型に、First-Strand cDNA Synthesis KIT (Amersham Pharmacia Biotech 社) を用いて Oligo (dT)₁₈ primer により 1 本鎖 DNA を合成した。作成した cDNA を鎖型として RT-PCR を行い、この反応で得られた PCR 産物を鎖型として nested primer を用いた PCR を行った。Nested PCR により得られた予想される 354bp のバンドは、pGEM-T vector (Promega 社) にクローニングし、シークエンスした。

1-2 スクリーニング

PCR クローニングで得られた 354bp の DNA 断片をランダムプライム法により、[α -³²P]dCTP (9.25 MBq; Amersham Pharmacia Biotech 社) でラベル化し、これをプローブとして、ラット脳 cDNA ライブラリー (Stratagene 社) からスクリーニングした。

1-3 シークエンス

サンプルは、ABI PRISM BigDyeTM Terminator cycle sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 社) を用いて蛍光標識し、ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer により解析した。

2. 各組織における rCTR1 の mRNA 発現量

2-1 Northern blot 法

Wistar 雄性ラット (12 週令) の各臓器 (脳, 心臓, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 小腸, 精巣) から AGPC 法により抽出した total RNA 10 μ g をホルムアルデヒドで変性した 1.5% アガロースゲルで電気泳動をした後、ナイロンメンブランにトランスファーした。

このメンブランに³²Pで放射化ラベルしたDNAプローブ (rCTR1 coding region) でハイブリダイズさせ、X線フィルムに露光した。

2-2 RT-PCR法

Wistar雄性ラット (12週令) の各臓器からAGPC法により抽出したtotal RNA 2 μ gから1本鎖cDNAを合成し、合成反応量 (15 μ l) の1/10量をテンプレートとしてPCRを行った。反応終了後、15%アガロース電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。

結果と考察

PCRクローニングにより得られた354bpのDNA断片はヒトCTR1と高い相同性を示した。これをプローブとしてラット脳cDNAライブラリーからスクリーニングを行った結果、1423bpのcDNAクローンが得られた。塩基配列をもとに予想されるアミノ酸配列は187分子のアミノ酸からなるタンパク質であり、ヒトCTR1pと91%の相同性を示すことが分かった (Fig. 1)。したがって、このcDNAをrCTR1 (rat Copper Transport), タンパク質をrCTR1p (rat Copper Transport protein) と命名した。

rCTR1pの配列からN末端 (1-64) 領域にはメチオニンおよびヒスチジンが多く含まれていることが分かった。またコンピュータによる疎水性解析から、rCTR1pには3カ所のmembrane domain (amino acid 66-84, 130-151, 155-172) が存在することが示唆された。メチオニンおよびヒスチジンが銅へのリガンドとして知られていること⁴⁾、およびhCTR1をはじめとする銅輸送膜タンパク質のN末端領域が細胞外に存在するとされていること⁴⁾を考慮すると、この領域が銅を捕捉する部分であると推定した。

Northern blot法 (data not shown) およびRT-PCR (Fig. 2) の結果、rCTR1のmRNAは量的に差はあるが、ラットの各臓器に発現していることが分かった。特に肝臓、小腸や精巣での発現量が高く、心臓や脾臓では相対的に低い結果が得られた。肝臓でアルブミンやセルロプラスミンのような全身へ銅を輸送しているタンパク質が生合成されていることなどから、これらの臓器では銅の需要が高くなっていることが示唆された。

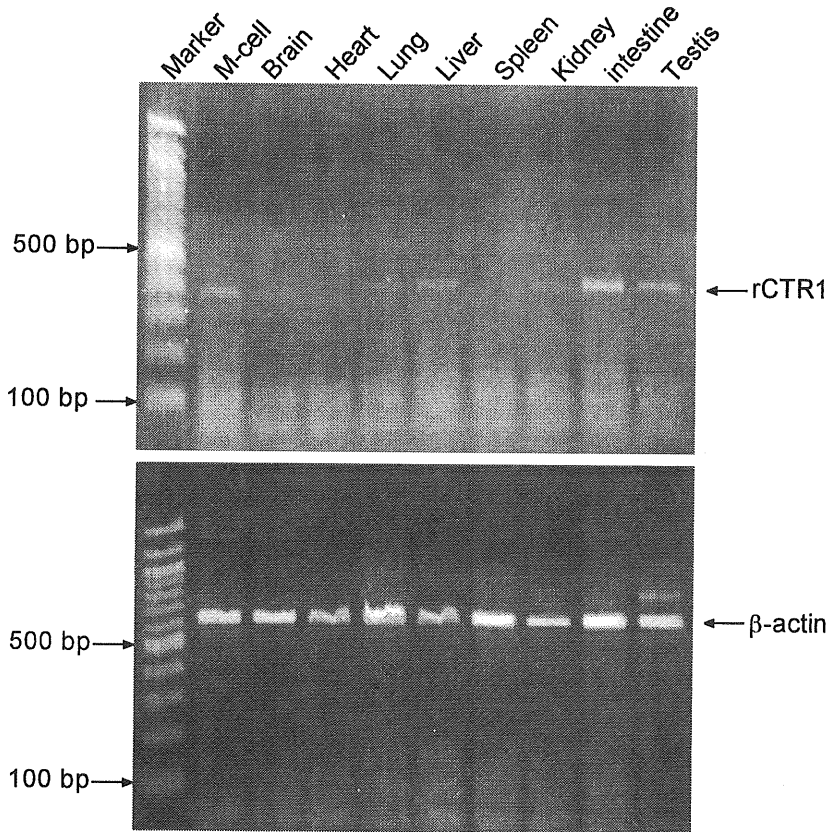


Fig. 2 Expression of rCTR1 in the tissues of rat

Marker : 100bp DNA ladder

rCTR1 : 384bp

β -actin : 650bp

文 献

- 1) Linder, M.C. (1991). Introduction and overview of copper as an element essential for life. In *Biochemistry of Copper*, M.C. Linder, ed. (New York : Plenum Press), pp. 1-13.
- 2) Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1998) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clearendon Press, Oxford.
- 3) Dancis, A., Yuan, D.S., Haile, D., Askwith, C., Eide, D., Moehle, C., Kaplan, J. and Klausner, R.D. (1994) The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in iron transport. *Cell*, 76, 393-402.
- 4) Zhou, B. and Gitschier, J. (1997) hCTR1 : A human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 7481-7486.

- 5) LI, Y. Togashi, Y. Sato, S. Emoto, T. Kang, J, H. Takeichi, N. Kobayashi, H. Kojima, Y. Une, Y. Uchino, J. (1991) Spontaneous hepatic copper accumulation in LEC rats with hereditary hepatitis : A model of Wilson's disease. *J. Clin. Invest.* 87, 1858-1861.
- 6) Wu, J. Forbes, JR. Chen, HS. Cox, DW. (1994) The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nature Genet.* 7, 541-545.
- 7) Yamaguchi, Y. Heiny, ME. Shimizu, N. Aoki, T. and Glitlin, JD. (1994) Expression of the Wilson disease gene is deficient in the Long-Evans cinnamon rats. *Biochem. J.* 301, 1-4. 6