

ラットの細胞内銅輸送タンパク質 Rah1p の 生化学的および物理化学的性質

其 田 学 士, 広 村 信, 桜 井 弘
(京都薬科大学・代謝分析学教室*)

Characterization of Intracellular Copper Trafficking Protein Rah1p of Rat

Takashi SONODA, Makoto HIROMURA and Hiromu SAKURAI
*Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry,
Kyoto Pharmaceutical University*

Copper trafficking proteins have been identified in yeast. Atx1p, one of cytosolic copper protein, transports copper(I) to Ccc2p in trans-golgi. Recent studies suggested that metal binding site (MTCXXC) is necessary for the interaction between Atx1p and Ccc2p. However, few detailed information on copper(I)-induced structural changes in these proteins were reported. Recently, we cloned Rah1p (Rat *Atx1* homologue protein) from rat. To know whether mutation in the metal binding site contributes to copper transportability and whether the copper binding changes the structure of Rah1p, we examined complement of *rah1* to a null *atx1* mutant strain in yeast and that CD (circular dichroism) spectra on the copper binding-induced structural changes of Rah1p and its mutant protein.

近年、銅の生体恒常性を保つとされるタンパク質群の同定が酵母を用いて行われている。酵母の細胞内銅輸送タンパク質 Atx1p は、Ccc2タンパク質に銅を輸送することが知られており¹⁾、Atx1p と Ccc2タンパク質との相互作用には金属結合部位 (MTCXXC) が必要であると報告されている²⁾。しかし、金属結合部位と銅との結合がおよぼす、タンパク質の立体構造への影響は明らかでない。一方、我々は銅の生体恒常性を保つタンパク質を研究し、ラットより細胞内銅輸送タンパク質、Rah1p (Rat *Atx1* homologue protein) をクローニングした³⁾。そこで次に、Rah1pの金属結合部位の変異体を作製し、細胞内銅輸送機能を *atx1* 欠損酵母株を用いて解析することとした。さらに、金属結合部位と銅(I)との結合による Rah1pの立体構造への影響を調べる目的で、Rah1p およびその変異タンパク質と銅(I)との結合が各タン

*所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

パク質の二次構造にどのような変化をもたらすかをCDスペクトルにより検討した。

実験方法

1) タンパク質の発現と精製

rah1 cDNAの翻訳領域をpGEX-2Tベクターに挿入し、宿主大腸菌 (BL21(DE3)pLysS) を形質転換した。融合タンパク質としてGST-Rah1pを発現させ、グルタチオンビーズを用いて精製した。精製した融合タンパク質をトロンピンを用いてGSTとRah1pとに切断し、ゲル濾過クロマトグラフィーによりRah1pを精製した。各画分のRah1pは4-20gradient SDS-PAGEにより同定した。

2) Rah1pへの銅の結合

Rah1pを1mM DTTを含むTBS緩衝液 (25mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH8.0) 中37℃で2時間インキュベーションした後、25 μ M CuCl₂を加え、更に25℃で4時間インキュベーションした⁴⁾。反応終了後、過剰の銅は透析して除去した。

3) CDスペクトルの測定

Rah1pとその変異タンパク質のCDスペクトルの測定は、JASCO J-720WIを用いてTBS緩衝液 (25mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH8.0) 中25℃で行った。

結果と考察

Rah1pの金属結合部位のアミノ酸配列の変化が、銅輸送能にどのような影響を与えるかを解析する目的のため、*atx1*欠損株を用いて鉄依存的相補性試験を行った (data not shown)。rah1の翻訳領域をpSCWベクターに組み込み (pSCW-rah1)、このプラスミドDNAを用いて*atx1*欠損株を形質転換した。変異体としては、pSCW-rah1-C12G, pSCW-rah1-C15G, pSCW-rah1-C12, 15GおよびpSCW-rah1-K60Gにより、*atx1*欠損株を形質転換した。鉄を含む培地において、野生株と*rah1*形質転換体および変異体の全てに関してコロニーの形成が認められたのに対し、鉄制限培地では、野生株と*rah1*形質転換体にコロニーの形成が認められ、rah1-C12, 15G形質転換体ではコロニーの形成が認められなかった。すなわち、細胞内銅輸送にはRah1pの12および15番目のCysが関与していることがわかった。そこで、銅結合によるRah1pの二次構造への影響は、Rah1p およびRah1p-C12, 15Gを用いて検討することとした。

MTCXXCへの銅の結合がもたらす、Rah1pの二次構造への影響はCDスペクトルにより検討した。Rah1pはGST-Rah1p融合タンパク質として発現、精製した。さらにトロンピン処理を行い、Rah1pはゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。得られたRah1pはSDS-PAGE (Fig. 1) から判断して、純度約95%、分子量7.3kDaであることが分かった。精製Rah1pを用いてCDスペクトルを測定したところ、Rah1pのMTCXXCと銅との結合は、CDスペクトルに著しい変化を与えなかった (Fig. 2A) すなわち、MTCXXCと銅との結合は、Rah1pの二次構造に著しい影響を与えないと考えた。一方、Wilson病タンパク質のMTCXXCと銅(I)とが結合すると、銅結合領域のタンパク質構造が変化することが報告されている⁵⁾。この知見と今回測定したRah1pのCDスペクトルの結果の違いは、Menkes/Wilson病タンパク質の金属結合部位が1分子内に6ヶ所存在するが、Rah1pではそれが1ヶ所であるという、結合部位数の差に

よるのではないかと考えた。このことから、Wilson病タンパク質と比べRah1pでは、アポ体とホロ体のCDスペクトルの違いがほとんど見られなかったのではないかと考えた。また、銅結合部位の変異体であるRah1p-C12, 15Gは、銅を加えてもCDスペクトルに変化を与えなかった (Fig. 2B)。一方、原子吸光度法により銅を加えたRah1pおよびRah1p-C12, 15Gの銅含有量を測定し、両タンパク質と銅との結合を調べた。その結果、Rah1pには銅が結合していることが分かった (data not shown)。以上の結果から、Rah1pの銅輸送には12および15番目のCysが重要であり、銅結合部位へ銅が結合した際、二次構造に著しい変化を起こすことなく標的タンパク質へ銅を輸送するのではないかと考えた。

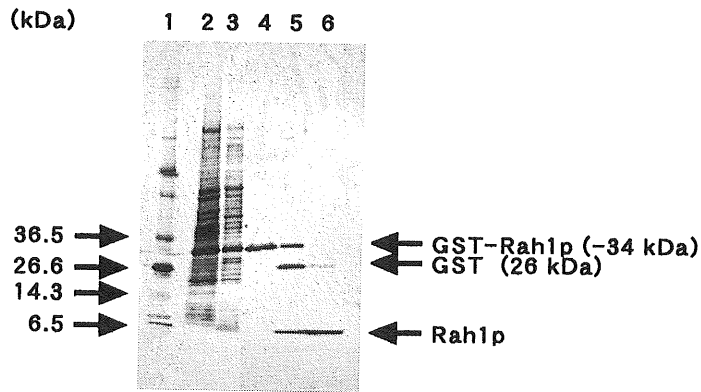


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the purified Rah1p. Lane 1, protein marker ; lane 2, total cell lysate ; lane 3, supernatant after centrifugation ; lane 4, GST-Rah1p ; lane 5, digested with thrombin ; lane 6, Rah1p. Two μg protein per lane were loaded. Proteins were stained with silver staining.

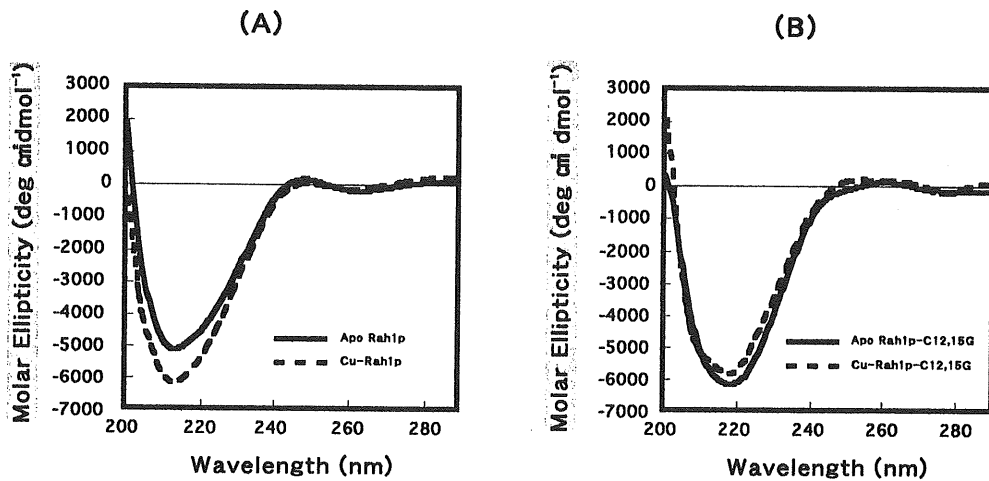


Fig. 2 CD spectra of Rah1p(A) and Rah1p-C12,15G(B). Spectra were recorded in 25mM Tris-HCl buffer (pH8.0) containing 150mM NaCl at 25 °C

参 考 文 献

- 1) Lin, S.-J., Pufahl, R. A., Dancis, A., O'Halloran, T. V. and Culotta, V. C. (1997) *J. Biol. Chem.* 272 : 9215
- 2) Pufahl, R. A., Singer, C. P., Peariso, K. L., Lin, S.-J., Schmidt, P. J., Fahrni, C. J., Culotta, V. C. and Penner-Hahn, J. E. (1997) *Science* 278 : 853
- 3) Hiramura, M. and Sakurai, H. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265 : 509
- 4) Larin, D., Mekios, C., Das, K., Ross, B., Yang, A.-S. and Gilliam, T. C. (1999) *J. Biol. Chem.* 274 : 28497
- 5) DiDonato, M., Hsu, H.-F., Narindrasorasak, S., Que, L., Jr., and Sarkar, B. (2000) *Biochemistry* 39 : 1890