

Title	Copper Trafficking in <i>Caenorhabditis elegans</i> : Copper Chaperone and Copper Transporting ATPase
Author(s)	若林, 篤光
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3155169">https://doi.org/10.11501/3155169</a>
DOI	10.11501/3155169
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	わかばやしとくみつ 若林篤光
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 14416 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Copper Trafficking in <i>Caenorhabditis elegans</i> : Copper Chaperone and Copper Transporting ATPase (線虫 <i>C. elegans</i> の銅シャペロン, 銅 ATPase の機能と細胞特異的発現)
論文審査委員	(主査) 教授 二井 将光  (副査) 教授 金澤 浩 教授 谷澤 克行 助教授 和田 洋

### 論文内容の要旨

銅 (Cu) は、多くの酸化還元酵素の活性中心に存在することが知られており、このため生物にとって必須である。一方、過剰に蓄積された銅は、高い酸化力のために細胞内に非常に反応性の高いラジカルを生じ、生物にとって有害である。したがって、細胞内の銅イオンの濃度は、厳密に調節されている必要があり、その調節機構は大変に興味深い問題である。1993年、ヒトの銅代謝異常で知られる遺伝性疾患 Menkes 病, Wilson 病の原因遺伝子が同定され、これらがいずれも、重金属を輸送すると考えられる P タイプ ATPase 様のタンパク質をコードしていることが明らかになった。また、酵母の遺伝学的な解析からも類似の ATPase 様タンパク質が細胞内の銅イオン輸送に関与することが示唆された。しかしながら、それらが実際に銅イオンを輸送する ATPase であるのかなどの分子レベルでの機能や、多細胞生物においてどのような細胞に発現しているのかなど不明な点が多い。本研究では、線虫 (*C. elegans*) をモデル生物として用い、銅 ATPase 様タンパク質の機能と多細胞生物における銅イオン恒常性維持の機構を知る目的で、銅イオン濃度の調節に関わっていると考えられる 2 つの分子、銅イオン輸送性 ATPase と銅シャペロンについて、以下の解析を行った。

ヒトの遺伝性疾患の原因遺伝子に対応する線虫の銅 ATPase 様タンパク質をコードする cDNA を単離した (CUA-1)。CUA-1 タンパク質の機能を解析する目的で、酵母の相同遺伝子の欠損株  $\Delta ccc2$  を構築し、CUA-1 タンパク質を発現させたところ、その表現型を相補した。さらに、保存性の高い DKTG 配列, CPC 配列に変異を導入したところ、相補は見られなかった。以上の結果は、CUA-1 が銅イオンを輸送する P タイプ ATPase として機能していることを強く示唆していた。

また、本研究の過程で構築した酵母発現系を用いてヒトの Wilson 病原因遺伝子産物についても同様の解析を行ったところ、患者の病気の程度とよく一致する結果が得られ、本発現系がヒトの疾患遺伝子の機能解析にも有用であることを示すことができた。

酵母において銅 ATPase 様タンパク質に銅イオンを供給する分子として見いだされ、銅シャペロンと呼ばれる ATX1 遺伝子産物の、線虫における相同分子 CUC-1 の cDNA を単離した。69 アミノ酸から成る CUC-1 タンパク質は、酵母の ATX1 遺伝子破壊株の表現型を相補することのできる細胞質タンパク質であった。

CUA-1, CUC-1 の 2 つのタンパク質が 1 つの銅イオン輸送経路を構成するならば、これら 2 つの遺伝子は同じ細胞で発現している可能性が高いと考えられる。*cua-1*, *cuc-1* それぞれの遺伝子上流と GFP との融合遺伝子を構築し、

発現パターンを検討した。両遺伝子は幼生期の表皮細胞，成体の腸管細胞に強い発現が認められた。両遺伝子が互いに非常によく似た時期，細胞特異性を示したことから，銅シャペロン／銅 ATPase の銅イオン輸送経路が多細胞生物においても保存されていることが強く示唆された。また，咽頭筋肉細胞の一部に，*cua-1* のみの発現が見られたことから，CUC-1 タンパク質に非依存的な銅イオン輸送の存在が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

銅は様々な酵素の補欠分子である一方，強力な酸化能を有するため毒性をもつ金属である。したがって生体内ではこの金属イオンの恒常性は厳密に制御される必要がある。本研究では線虫 *C. elegans* の銅イオン輸送性 ATPase，ならびに銅輸送シャペロン分子を同定し，その分子機能を出芽酵母内遺伝子発現系によって解析した。また，酵母発現系を用いてヒトの遺伝病原因遺伝子である *ATP7A* 遺伝子産物の機能発現に重要なアミノ酸残基・銅結合ドメインを同定した。さらに，遺伝子導入 *C. elegans* を作成することにより，銅代謝に関わる分子の転写の組織特異性を，細胞レベルで決定した。

これらの研究は銅イオンの恒常性調節の分子機構の研究に新たな局面を拓くものであり，博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。