



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Mechanism of Heme-Dependent Protein Regulation for Intracellular Heme Metabolism [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	渡部, 祐太
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第12789号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65434
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuta_Watanabe_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 渡部 祐太

学 位 論 文 題 名

Mechanism of Heme-Dependent Protein Regulation for Intracellular Heme Metabolism

(細胞内ヘム代謝におけるヘム依存的な蛋白質の機能制御機構)

第一章では本学位論文の背景として、生体反応に不可欠な鉄-ポルフィリン錯体ヘムの細胞内代謝とその制御機構の問題点について述べる。ヘムは蛋白質の活性中心として重要な補欠分子族であるばかりではなく、近年では蛋白質の活性を制御する制御因子として機能することが明らかとなってきた。その一方で、遊離ヘムは活性酸素種と反応することで酸化活性を示し、脂質二重膜などの生体分子を損傷する危険性があり、このような生体分子の損傷によって生じる酸化ストレスは、様々な病気の原因となる。そのため、ヘムの生合成やその輸送の制御が重要と考えられているものの、その詳細な制御機構は明らかではない。特に、細胞質に放出されたヘムは、補欠分子族としての機能と細胞毒性といった相反する性質を示すことから、その動態の制御は生物学的にも医学的にも注目されているにも関わらず、十分に検討されていない。本学位論文では、このようなヘム制御系のうち、細胞質に放出されたヘムの反応性を抑制する機構とヘムが制御因子として機能する鉄代謝制御系に注目し、ヘム代謝の制御機構の一端を明らかにすることを試みた。

第二章では、細胞質に放出されたヘムの細胞毒性を抑制する機構について検討した。これまで細胞毒性の抑制に関与する蛋白質は知られていなかったため、ヘムをリガンドとした免疫沈降による網羅的解析を行ったところ、**Peroxioredoxin-1 (PRX1)**がヘム結合蛋白質として同定された。**PRX1**は過酸化水素(H_2O_2)を分解する抗酸化酵素であることが知られていたが、ヘムの結合については報告されていない。しかし、**PRX1**のラットにおける相同体**HBP23**はヘムによって発現が誘導されることから、**PRX1**はヘムが過剰になることで起こる細胞毒性に関与する可能性が考えられた。そこで、**PRX1**でのヘム配位環境やヘムの細胞毒性への影響について検討した。紫外可視吸収スペクトルより、ヘムに特徴的な吸収帯である**Soret 帯**が**Cys**を配位子とする蛋白質と同様、**370nm**に観測された。そこで**PRX1**中の**Cys**に変異を導入し、各変異体に対しヘム滴定を行ったところ、**Cys52**の**Ser**変異体ではヘム結合が消失し、**PRX1**は**Cys52**にヘムを結合することが明らかになった。**Cys52**は抗酸化酵素の活性中心であるため、ヘム結合による**PRX1**の抗酸化酵素活性への影響を調べたところ、ヘムによって**PRX1**の酵素活性が阻害されることが示された。これはヘムが**PRX1**の酵素活性における制御因子として機能することを示唆する。次にヘムの細胞毒性である酸化活性を、遊離ヘムと**PRX1**結合状態のヘムで比較した。その結果、**PRX1**に結合したヘムは遊離ヘムと比べて酸化活性が抑制されることが明らかとなった。このことは**PRX1**が細胞質で遊離ヘムの細胞毒性を抑制する機能を持つことを示している。

以上より、細胞質のヘムが制御因子として機能するにあたり問題となる細胞毒性は、**PRX1**によって抑制されることが明らかになった。一方、細胞質のヘムが過剰になると、ヘムの生合成を抑制する機構が知られる。しかし、ヘム生合成の抑制は、基質である鉄の蓄積につながる。鉄もヘム同様に活性酸素種と反応することから、鉄の代謝も細胞質のヘムに応じて制御する必要があると考えられる。そこで、第三章では鉄代謝の制御におけるヘムの関与

に注目した。細胞内の鉄代謝は鉄代謝制御蛋白質(IRPs)が中心を担う。鉄獲得に関与する遺伝子の mRNA 中には鉄応答性因子 Iron-responsive element (IRE)が存在し、IRPs は IRE に結合することで遺伝子の翻訳量を調節する。この IRE 結合能は細胞内鉄濃度に依存しており、IRPs は鉄濃度を感知する必要がある。先行研究より、相同蛋白質の1つである IRP1 はヘム結合モチーフである Cys-Pro(CP)モチーフを構成する Cys118 と Cys300 へのヘム結合が示されている。このため、IRP1 はヘムによって IRE 結合能が制御されていると推測した。そこで、IRP1 のヘム結合による IRE 結合能への影響を調べるため、蛍光異方性による IRP1 と IRE の相互作用解析を試みた。蛍光標識した IRE に対して IRP1 を滴定し、複合体形成による蛍光異方性の減少を追跡した。その結果、IRP1-IRE 複合体の解離定数(K_d)は 6.9 nM であったが、4 当量のヘムを混合した IRP1 では、見かけの K_d がおよそ 200 nM と 30 倍近くも上昇し、IRE 結合能が阻害されることが明らかとなった。この原因について検討するため、ヘム結合 IRP1 の紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、420 nm 付近に肩を示す Soret 帯が観測され、2 つのヘム結合様式の存在が推定された。Soret 帯のピーク波長を求めることで 2 つのヘム結合様式の違いを区別するため、波形分解を行ったところ、ピーク波長は Cys 配位に特徴的な 372 nm と、Cys/H₂O 配位に特徴的な 418 nm であった。ヘムへの水の配位には遠位側の His との水素結合が必要であることが知られていることから、結晶構造より唯一 His207 を近傍に持つ Cys300 が Cys/H₂O 配位を取り、Cys118 は Cys 配位であると推定された。Cys300 と His207 の側鎖は異なる方向を向くため、Cys300 とともにヘムに配位した水が His207 と水素結合することで、IRP1 の構造変化を誘起することで IRE 結合能を失活すると推測された。これより IRP1 はヘムを制御因子として用いることで、IRE 結合能を制御することが示唆された。

第三章の結果より、IRP1 はヘム結合によって IRE 結合能が失活することが明らかとなった。この実験には遊離のヘムを用いているが、細胞内には遊離ヘムは存在せず、蛋白質に結合した状態と考えられている。そのため IRP1 は細胞質のヘムを制御因子として用いるのかを細胞内環境でも観測する必要がある。そこで、第四章では細胞内でヘムによって IRP1 の IRE 結合能が阻害されるのかを観測するために、ヒト培養細胞を用いたレポーターアッセイ系を構築した。レポーター遺伝子として β -ガラクトシダーゼ(β -gal)をコードする *lacZ*を用いた。*lacZ*の

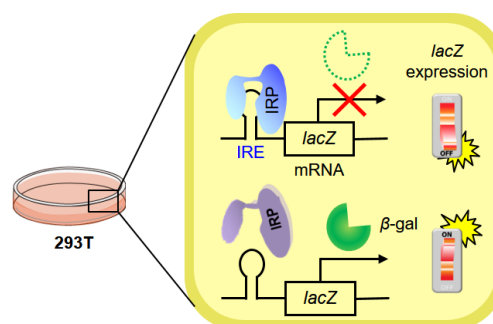


Fig.1 レポーターアッセイの概要

の上流に IRE 配列を挿入(IRE-*lacZ*)することで、IRP1 が IRE に結合することによって β -gal の発現が抑制される系を構築した(Fig.1)。実際にヒト胎児腎細胞由来 293T 細胞に IRP1 と IRE-*lacZ* を形質導入した場合、IRE-*lacZ* のみを形質導入した場合と比べ β -gal の発現量は抑制されることが確認された。これは IRP1 が IRE に結合することで *lacZ* の翻訳が抑制されたためと考えられる。この β -gal の発現量は、培地にヘムを加えて培養することで上昇したため、ヘムによって IRP1 の IRE 結合能が阻害されることが示唆された。これが細胞質のヘムによるものであることを確認するため、ヘム生成の中間体 δ -aminolevulinic acid (ALA)と鉄を加えて生成を促進した条件で β -gal の発現量を観測すると、ヘムを添加した場合と同様に上昇した。しかし、ヘム生成が進行しない条件として、鉄のみを添加した細胞では β -gal の発現量は変化しなかった。そのため、IRP1 は細胞質において、鉄ではなくヘムを制御因子として用いることで IRE 結合能を調節し、 β -gal の発現量が上昇することが示唆された。

第五章では、本学位論文において明らかになった点や今後の展望をまとめた。細胞質のヘムが細胞毒性の抑制と補欠分子族としての機能を両立するために、その動態が制御される必要があるが、その機構はこれまでほとんど明らかにされていなかった。本学位論文では、細胞質のヘムは、PRX1 によって活性酸素種との反応から保護されることを示し、IRP1 の制御因子として機能することで、ヘム生成の基質となる鉄の代謝がヘムにより制御されることを明らかにした。この知見は、ヘム自身を蛋白質の活性制御因子として用いるヘム代謝制御の分子機構解明の端緒となり、遊離ヘムにより引き起こされる酸化ストレスが関与する様々な疾患の予防への応用が期待される。