



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 渡部 祐太

審査担当者	主査	教授	坂口 和靖
	副査	教授	藤田 恭之
	副査	教授	高木 睦
	副査	教授	石森 浩一郎
	副査	准教授	内田 毅

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)

本論文では、これまで蛋白質の活性中心として機能していると考えられていた鉄-ポルフィリン錯体であるヘムが、細胞内の鉄代謝の制御因子となりうることを示し、さらに、このような制御因子としてのヘムが細胞内で遊離した場合には、その細胞毒となる活性酸素能を抑制する新たな機構を見出している。

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ている。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、十分に検討されてこなかった点を詳細に説明し、本論文での研究の方向性を示している。

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、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、Peroxisredoxin-1 (PRX1) がヘム結合蛋白質として同定された。この PRX1 はその紫外可視吸収スペクトルと変異体の実験から、Cys52 にヘムが結合すること、またヘムの酸化活性は PRX1 に結合することにより抑制されることが示され、細胞質で遊離ヘムの細胞毒性を抑制する初めての蛋白質として PRX1 を同定した。

次いで、第三章ではこのようなヘムを制御因子とする蛋白質として、細胞内の鉄代謝に関連した蛋白質の mRNA の特定領域に結合することで、その翻訳を制御する鉄代謝制御蛋白質 (IRP1) を取り上げている。この章では IRP1 におけるヘム配位環境について検討し、そのヘムを結合するアミノ酸残基として Cys300 と Cys118 を同定した。さらにヘム結合による標的 RNA 領域に対する結合能への影響を調べるため、蛍光標識した標的 RNA への IRP1 の結合による蛍光異方性の変化を追跡したところ、ヘム存在下では IRP1 添加による蛍光異方性の変化は小さく、IRP1 の標的 RNA への結合におけるヘムによる制御機構を提唱している。

第三章の結果より、IRP1 はヘム結合によって標的 RNA 結合能が制御されることが明らかとなったが、このような制御が細胞内でも起こっていることを確認するため、第四章では細胞内で IRP1 と標的 RNA との相互作用を細胞内環境で検出できるレポーターアッセイ系を構築している。ここでは、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、この lacZ の上流に標的 RNA 配列を挿入することで、IRP1 が標的 RNA に結合することによって β -gal の発現が制御される系を構築した。ヒト胎児腎細胞由来 293T 細胞にこのレポーター遺伝子を導入し、IRP1 を発現させると、ヘムの添加により β -gal の発現量は増大し、IRP1 へのヘム結合によって、IRP1 の標的 RNA からの解離が確認できた。一方、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ことから、細胞内においても IRP1 は鉄ではなくヘムを制御因子として用いることで、標的 RNA との結合を調節していることが示された。

最後の第五章では、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ており、本学位論文での知見は、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ことを示している。以上のような内容の一部は、査読付欧文誌である Biophysical and Biochemical Research Communication 誌に掲載されており、本論文において得られた結果は、細胞内鉄代謝機構における新たな制御機構の提案につながり、学術的にも意義があるばかりではなく、その成果は鉄代謝異常による種々の疾病に対する根本的な治療方法の指針にも資すると考えられる。以上の所見から本学位論文の内容は、博士（理学）の授与に値すると判断する。