



Title	Study on the Sensing Mechanism of Cellular Iron for Iron Homeostasis Mediated by Heme in Iron Regulatory Protein 1 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	小倉, 麻梨子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第13274号
Issue Date	2018-06-29
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71331
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Mariko_Ogura_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 小倉 麻梨子

学 位 論 文 題 名

Study on the Sensing Mechanism of Cellular Iron for Iron Homeostasis

Mediated by Heme in Iron Regulatory Protein 1

(へみを介した鉄制御蛋白質 IRP1 による細胞内鉄感知機構に関する研究)

第一章では、本学位論文の背景として、生体内における細胞内鉄恒常性の制御機構の概要とその課題についてまとめ、細胞内の鉄濃度を制御するタンパク質IRP1に着目した理由について述べている。生体内において鉄は、生命維持に必須な金属元素であり、細胞内鉄恒常性の破綻は貧血や神経変性疾患など、多くの疾病と関連づけられている。そのため、哺乳類では厳密に細胞内鉄濃度を制御する必要があるが、その詳細な制御機構、特にその制御タンパク質の分子構造に基づいた解明はほとんど進んでいない。高等動物において、このような細胞内鉄恒常性の維持は、鉄代謝制御タンパク質Iron Regulatory Protein (IRP) が、細胞内への鉄の取り込みや貯蔵に関するタンパク質の翻訳を細胞内鉄濃度に応じて制御することにより実現していると想定されており、これらのIRPによる制御過程では、生体内で多様な機能を発現している金属蛋白質の活性中心であるへみが、細胞内鉄濃度変化のシグナル伝達分子として機能していると提案されている(Fig. 1)。しかし、へム結合に依存したIRPの翻訳制御機構については、その構造化学的な知見の欠如からこれまで十分議論されていない。本学位論文では、このような細胞内鉄濃度の制御タンパク質IRPのうち、未だに特異的なへム結合やへムによる翻訳制御機構が確認されていないIRP1に注目し、そのへム結合や機能的意義を検討することで細胞内鉄恒常性維持機構の一端を明らかにすることを試みる。

第二章では、このIRP1へのへム結合を明らかにするため、種々の分光学的手法により、そのへム結合を検討した。へムの結合により特徴的な吸収波長を示す紫外可視吸収測定を行ったところ、IRP1は一分子あたり2個のへみを結合することが示された。さらに、へム近傍構造を反映するへム結合体のIRP1の共鳴ラマンスペクトルは、へみをシグナル伝達分子として結合するタンパク質において共通のへム結合部位であるHeme Regulatory Motif (HRM)のシステイン残基に結合したへムの配位環境の特徴と一致し、既にへムの特異的な結合が報告されているIRP1の相同体IRP2のへム結合体の共鳴ラマンスペクトルと類似していた。このIRP2へのへム結合は、結合部位付近のアミノ酸残基の酸化修飾を引き起こし、この酸化修飾によりIRP2は標的であるmRNA (Iron Response Element; IRE) への結合能を失うと報告されているが、IRP1においてはそのような酸化修飾は観測されない。そこで、IRP1とIRP2におけるへム結合の機能的相違をもたらす構造的要因を明らかにするため、へみに誘導される酸化修飾機構において重要なへム鉄の還元過程に注目した。へム鉄の還元過程を検討するため、へム鉄の還元後のへム近傍構造の時間変化を追

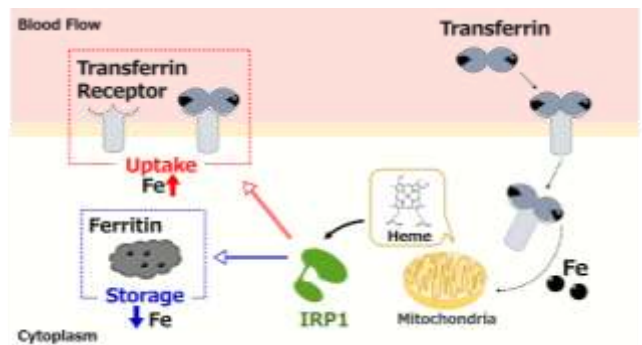


Fig. 1 鉄代謝タンパク質の翻訳制御により細胞内鉄恒常性を維持する IRP1

跡できるpulse radiolysis測定を行ったところ、IRP1では、IRP2において観測される酸化修飾を引き起こす中間体の形成が確認できなかった。したがって、IRP1はIRP2同様にHRMにへムを結合できるものの、その還元過程が異なるため酸化修飾を誘起せず、IRP2と異なったへムによる細胞内鉄濃度感知機構を有すると示唆された。

第三章では、IRP1 におけるシグナル伝達分子としてのへム結合をさらに検証し、その機能的意義を明らかにするため、IRP1 のへム親和性とへム結合による IRE の結合制御機構について検討した。へムに対する親和性を表面プラズモン共鳴により測定した結果、IRP1 の親和性 ($K_d = 4.7 \times 10^{-7}$) はへムを活性中心として利用するタンパク質 ($K_d = \sim 10^{-13}$) よりも 10^6 程度低く、これまで報告されているへムをシグナル伝達分子として結合するタンパク質と同程度であることが明らかとなった。つまり、IRP1 は周囲のへム濃度の変化に応じて、へムを結合、解離することを示している。さらに、へム結合により IRP1 から IRE が解離することを確認するため、IRP1-IRE 複合体にへムを添加したところ、へム濃度の増加にしたがって IRP1-IRE 複合体が解離することが観察された。しかし、このようなへムによる解離は IRP1 溶液に大過剰のへムを加える必要があり、実際の細胞内へム濃度よりもはるかに高濃度で誘起された。細胞内の遊離へム濃度は極めて低く、その多くがタンパク質と結合していることを考慮すると、IRP1 は細胞内で可逆的にへムを結合できるものの、そのへム結合の際には遊離へムではなく、へムを結合したタンパク質などからへムを受け取り、IRE から解離すると想定された。

第四章では、ここまでの章で明らかになった IRP1 へのへムの特異的な結合による IRE 結合制御機構を構造化学的に検討するため、IRP1 とへム複合体の結晶構造解析を行い、その結果を IRP1-IRE 複合体の構造と比較した。IRP1 とへム複合体の結晶構造解析の結果、2.3 Å の分解能で複合体構造を決定でき、へム結合体の IRP1 の全体構造は、その4個のドメイン配置が IRE 複合体 (Fig. 2 左) とは異なり、IRE との相互作用部位が露出しない「closed」構造であることが明らかとなった (Fig. 2 右)。さらに、IRP1 のへム結合部位は HRM の配位環境と類似し、第二、第三章の結果と一致していたが、その結合部位はこれまで予想された HRM ではなく、IRP1 のドメイン 3 とドメイン 4 の間に位置し、「closed」構造の維持に重要な部位のシステインに結合することが示された。つまり、へムの結合は、IRP1 のドメイン配置を変化させ、IRE と結合できない「closed」状態にすることで IRE との結合を阻害することが明らかになった。

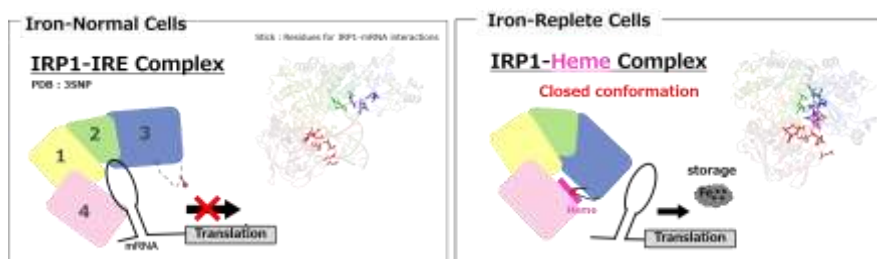


Fig. 2 IRP1によるへムを介した鉄代謝制御タンパク質の翻訳制御機構

第五章では、本学位論文で得られた結果を総括し、その細胞内鉄恒常性維持機構における意義や今後の展望をまとめた。生体内における鉄恒常性維持において、細胞内鉄濃度制御機構は、これまでIRP2へのへム結合が引き起こす酸化修飾を伴った制御機構の研究が多く進められていた。しかし、へム結合後のIRP2に観測される酸化修飾は活性酸素の産生を伴い、mRNAが存在する翻訳の場においては塩基の酸化修飾などの可能性もあり、細胞内で実際に進行している実験的検証は得られていない。一方、今回の研究で明らかになったへムによるIRP1のIRE結合の制御機構は酸化修飾を経由せず、周囲の生体関連成分に与える影響は小さいと考えられる。しかし、IRP1へのへム結合にはへムを運搬するタンパク質が必要であるものの、このようなタンパク質は同定されていない。さらに、細胞内鉄恒常性維持にはIRP1よりIRP2のほうがより大きな貢献をしているとの報告もあることから、IRP2においてもIRP1同様、酸化修飾を経由しないへム結合によるIRE結合制御機構も想定され、へムをシグナル伝達分子とする制御系についてはまだ未解明な点も多い。以上、本学位論文で得られた知見から、へムによる新たな細胞内鉄濃度制御機構を提案することで、生物に必須の細胞内鉄恒常性の維持機構の一端を明らかにできたと考えられ、近年、鉄代謝異常と疾病の関係が明らかになる中、本学位論文での知見を発展させることで、鉄代謝異常による疾患への予防や治療についても指針を与えることが期待される。