



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on Functional Regulation of Iron Regulatory Proteins Mediated by Heme Binding to Heme Regulatory Motifs [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	西谷, 雄大
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第13809号
Issue Date	2019-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75886
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yudai_Nishitani_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 西谷 雄大

審査担当者	主査	教授	村上 洋太
	副査	教授	石森 浩一郎
	副査	教授	加藤 昌子
	副査	教授	高木 睦
	副査	教授	藤田 恭之
	副査	准教授	内田 毅

学 位 論 文 題 名

Study on Functional Regulation of Iron Regulatory Proteins Mediated by Heme Binding to
Heme Regulatory Motifs
(ヘム制御モチーフへのヘム結合を介した鉄制御蛋白質 IRPs の機能制御に関する研究)

本論文は、鉄イオンの細胞内恒常性を維持している鉄制御蛋白質（Iron Regulatory Protein: IRP）において、ヘムの結合によってその標的 RNA への結合が制御されることを明らかにしたもので、5 章から成っている。

第一章では、本学位論文の研究背景として、細胞内鉄恒常性の生物学的重要性とその維持機構解明に関するこれまでの研究概要を述べるとともに、細胞内鉄恒常性を維持する中核的な制御蛋白質である IRP には 2 つの相同体、IRP1 と IRP2 が存在すること、これらの IRP はいずれもヘム結合部位と想定される Heme Regulatory Motif (HRM) を複数個所に有することが報告されているものの、その機能的意義については、IRP2 にのみ存在する鉄依存性分解ドメイン（Iron-dependent Degradation Domain: IDD ドメイン）中の HRM にヘムが結合することで IRP2 は蛋白質分解に導かれること以外は十分検討されていないことが述べられ、本学位論文の目的として、IDD ドメイン以外の HRM の機能的意義を明らかにすることを規定している。

第二章では、IRPs と標的 mRNA である Iron Responsive Element (IRE) の複合体形成過程におけるヘム結合の影響を、ゲルシフトアッセイを行うことで検討している。その結果、IRP1、IRP2 はいずれも IRE と複合体を形成したが、あらかじめヘムを加えて IRE と混合した IRPs では IRE との複合体形成が観測されず、ともにヘム結合によって IRE との結合は阻害されることが明らかになった。一方、IRPs-IRE 複合体にヘムを添加した場合には、IRP1 や IDD を欠損させた IRP2 (IRP2 Δ IDD) では一部しか複合体が解離しないものの、IRP2 では複合体が減少していたことから、IDD ドメインに結合したヘムは IRP2 を IRE から解離させ得ることを示している。さらに、IRP1 や IRP2 の IDD ドメイン以外の HRM のうち、C 末端側の HRM へのヘム結合が IRE の結合を阻害することを明らかにし、その原因として、この HRM は IRE との相互作用部位に隣接することから、C 末端側の HRM へのヘム結合は IRE との相互作用を立体障害により阻害すると想定された。一方で IRP2 の IDD ドメインは、IRE との相互作用部位から遠く、そのヘム結合により直接 IRE の結合阻害に参与しないと考えられることから、IDD ドメイン内の HRM へのヘム結合は、そのアロステリック効果によって IRE との複合体形成を阻害すると提案している。

第三章では、IDD ドメイン内の HRM へのヘム結合は、IRP2 の蛋白質部分に酸化修飾を引き起こすことが報告されていることから、IDD ドメイン以外の HRM についてもそのヘム結合によって酸化修飾が引き起こされるかどうか検討した。酸化されたアミノ酸側鎖を検出できる Oxyblot 測定による結果から、IDD ドメインを有さない IRP1 や IRP2 Δ IDD は酸化修飾されないことが示され、IDD ドメインの HRM に結合したヘムのみが酸化修飾を引き起こすことが明らかになった。さらに、この酸

化修飾を引き起こす活性酸素種（ROS）の同定を試みたところ、カタラーゼを添加すると IRP2 の酸化が抑制されたことから過酸化水素が産生していることが示された。しかし、過酸化水素のみの添加では IRP2 は酸化されなかったことから、過酸化水素はヘム鉄によってさらに反応性の高い水酸ラジカルなどに変換されることを考慮すると、IDD ドメイン内の HRM に結合したヘムは、まず分子状酸素を過酸化水素に活性化し、さらにヘムがこの過酸化水素を水酸ラジカルなどのさらに反応性の高い ROS に変換することで、IRP2 における酸化修飾が進行する機構を提案している。

第四章では、第三章で確認された IRP2 のヘム依存酸化修飾の分子機構とその酸化修飾部位について検討するため、この酸化反応における活性種の特定制をを試みている。ヘムと過酸化水素存在下における IRPs のペルオキシダーゼ活性を、グアイアコールを基質として測定した結果、HRM に結合したヘムは、反応性の高い水酸ラジカルを産生可能な反応中解体を形成していることが示された。さらにこの反応中間体が生成する水酸ラジカルによる酸化修飾部位を特定するため、酸化修飾された IRP2 の質量分析を行った結果、Met552 が酸化修飾していることが明らかとなった。この Met552 は IDD ドメイン近傍に位置し得ることから、IDD ドメインの HRM に結合したヘムが過酸化水素と反応し、生じた水酸ラジカルが近傍の Met552 を酸化修飾するという反応機構を提案した。

第五章では、本学位論文で得られた結果を総括し、ヘムの結合による IRPs の制御機構とその生理的意義に関してまとめられている。特に、これまで酸化修飾によってその IRE への結合能を失うと想定されていた IRP2 において、IDD ドメイン中の HRM へのヘム結合のみでその IRE 結合能が阻害されることを明らかにした点は、これまで提案された制御機構を大きく修正する重要な知見である。以上のような内容の一部は、査読付欧文学会誌である *Journal of Inorganic Biochemistry* 誌に掲載され、学術的意義が国際的にも評価されており、本論文によって得られた成果は、細胞内鉄恒常性維持機構における制御因子としてのヘムの意義を明らかにし、新たな細胞内シグナル伝達システムの解明にも重要な指針を与えられと考えられることから、博士（理学）の授与に値すると判断する。