



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Functional Characterization of Heme Binding in DNA Binding Proteins [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	南, 多娟
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第14310号
Issue Date	2020-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80260
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Dayeon_NAM_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 南 多 娟

学 位 論 文 題 名

Functional Characterization of Heme Binding in DNA Binding Proteins (DNA 結合タンパク質におけるヘム結合の機能解析)

第一章では、本学位論文の背景として、生体内における制御分子やシグナル伝達分子としての鉄 - ポルフィリン錯体「ヘム」の機能に関するこれまでの研究成果や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 Iron response regulator (Irr)及び Cold shock protein (Csp)に着目した理由について述べている。鉄は、化学反応の反応中心の還元型の種類が多様であることから、中心的な役割を果たしている。成人男子は 35-45 mg/kg、女性は 20-25 mg/kg の鉄を有しており、70%以上がヘモグロビン、ミオグロビン、その他の金属タンパク質の補助因子である鉄-ポルフィリン錯体、ヘムとして存在する。ヘムは活性中心として可逆的な気体分子の結合・小分子の活性化・電子移動などの機能を示す以外に、制御・シグナル伝達分子として機能が示唆されている。しかし、このような幅広い生物学的重要性に関わらず、ヘムによってその機能を制御されるタンパク質の機能発現機構については、その詳細な構造、機能解析が報告されていない。

第二章では、細胞内においてヘムの生合成過程を制御する Irr におけるヘム結合の機能的意義について検討を行った。Irr は窒素固定菌に存在する転写因子の一つで、細胞内で利用できる鉄量が欠乏する場合には、特定の DNA 塩基配列（鉄制御配列：Iron Control Element (ICE)）に結合することで、ヘム生合成を触媒する酵素の転写を抑制する機能を有している。Irr は、細胞内鉄量が高くなるとヘムを結合し、還元的雰囲気下、酸化的自己分解を起こす¹ことで、この抑制的転写制御が解消され、ヘム生合成が進行すると想定されている。しかし、このヘム結合から Irr の ICE からの解離まで、どのような過程を経るのか、その分子機構は明らかではなかった。そこで、蛍光分子である 6-FAM を修飾させた ICE (FAM-ICE) を Irr に結合させ、ヘムの添加による 6-FAM からの蛍光の異方性変化を追跡した。その結果、図 1 上に示すようにヘムの添加により、蛍光の異方性変化、つまり蛍光偏光度が低下した。これは分子の回転相関時間の増加、見かけの分子量の減少を意味することから、ヘムにより、Irr が FAM-ICE から解離したことが示された。また、この測定では還元剤が含まれていないことから、ヘム結合による Irr の自己酸

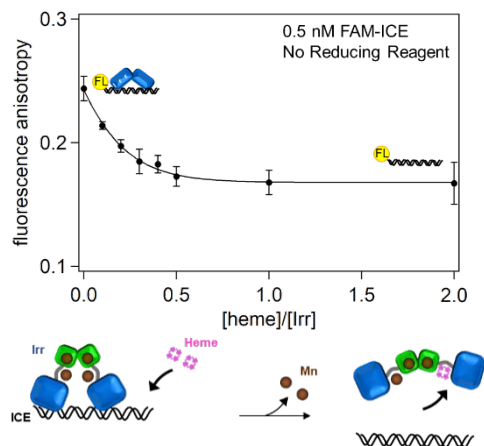


図1 ヘム結合によるIrr-ICE複合体の解離

化分解は起こっておらず、ヘムの結合のみで Irr は ICE から解離することを示している。興味深いことに、誘導結合プラズマ発光分析 (ICP-OES) の結果から、ヘムの添加に伴い、Irr から Mn^{2+} の解離が観測された。この Mn^{2+} の Irr への結合は、Irr が ICE に結合するために必須と考えられており、類似タンパク質のアミノ酸配列の相同性から、その結合部位は金属配位能を有するヒスチジン残基が集中した“His-cluster”領域であると想定されている。さらに、この“His-cluster”領域はヘムの結合領域であることも示されていること²から、ヘムは“His-cluster”領域に結合することにより、 Mn^{2+} を解離させることで、Irr を ICE から解離させると推論できた (図1下)。このような Mn^{2+} の“His-cluster”領域への結合を確認するため、“His-cluster”領域のヒスチジン残基を変異させたところ、ICP-OES の結果からは、変異体は Mn^{2+} の結合能を失うことが示さ、蛍光異方性の測定からは、この Irr 変異体は ICE と結合しないことが示された。つまり、Irr の ICE からの解離は、ヘムが“His-cluster”領域に結合することによる Mn^{2+} の解離により引き起こされることが明らかとなった。さらに、同様な測定からヘムが結合した Irr は ICE との結合能が消失しており、 Mn^{2+} も結合していなかった。以上の結果から、ヘムは Irr への結合により Mn^{2+} を解離させることで、その自己分解を誘起することなく転写抑制機能を解除し、ヘム合成を促進させる制御分子であることが示された。

以上のようにヘムは、ヘムが自ら生合成される過程における制御分子として機能していることが示されたが、近年の研究により、ヘムはそれ自身や鉄などの金属代謝以外の制御系においても制御分子として機能することが示唆されている。そこで、第三章では、ヘムによりその機能が制御されるタンパク質に共通のヘム結合配列として想定されている Heme regulatory motif (HRM) 配列を有し、多くのバクテリアで DNA 鎖複製を制御する CpsD に注目し、そのヘムによる機能制御を検討した。代表的なバクテリアであるコレラ菌の CspD (VcCspD) は、DNA 複製フォークにおける一本鎖 DNA 領域に結合してその複製を阻害すると想定されている。本章では一本鎖 DNA のモデル基質として、合成一本鎖 DNA オリゴマー (ssDNA) 用い、その CspD への結合を、結合部位近くに位置すると想定されている Trp の蛍光消光を利用することで追跡した。その結果、ssDNA の結合による Trp の蛍光消光 (図2上) は、ヘム存在下では抑制され (図2下)、ヘム添加により VcCspD の ssDNA への結合は阻害されることが示された。このような蛍光消光の抑制は、HRM におけるヘムへの配位子である Cys22 を変異することで消失することから、CspD は Cys22 へのヘムの結合により ssDNA への結合能を失うことが明らかとなった。以上の結果から、ヘムは DNA 複製の制御分子としても機能することが示唆された。

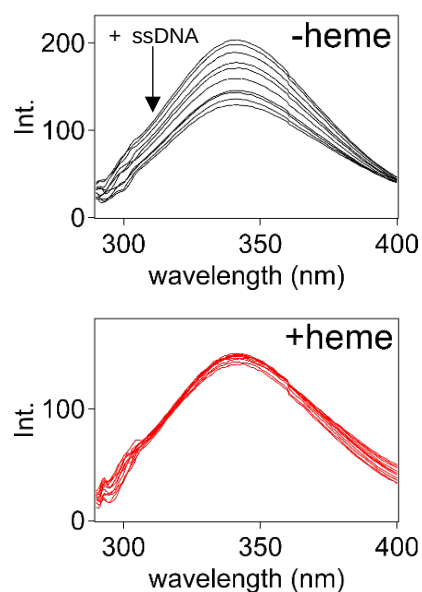


図2 ヘム結合によるCspD-ssDNA複合体の形成阻害解離

第四章では、本学位論文で得られた結果を総括し、細胞内の多様な制御過程におけるヘムの制御分子としての生物学的意義と残された課題、さらに今後の展望についてまとめられている。

参考文献

1. Kitatsuji, C., *et al.*, *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 18703.
2. Ishikawa, *et al.*, *Biochemistry*, **2011**, 50, 1016.