



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Functional Characterization of Heme Binding in DNA Binding Proteins [an abstract of entire text]
Author(s)	南, 多娟
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/80261
Type	doctoral thesis
File Information	Dayeon_NAM_summary.pdf



学 位 論 文 内 容 の 要 約

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・マンガン・亜鉛・銅等の遷移

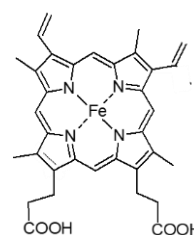


図1 鉄—ポルフィリン錯体（ヘム）

金属は、細菌から人まで多くの生物種における酵素の補欠分子やタンパク質の構造因子として必要である。なかでも鉄は、複数の酸化還元状態が存在し、化学反応の触媒として多様な機能を発揮している。成人男子が 35-45 mg/kg、女性が 20-25 mg/kg の割合で体内に鉄を有し、その 70%以上がヘモグロビン、ミオグロビン、その他のタンパク質の補欠分子である鉄—ポルフィリン錯体、ヘムとして存在する（図 1）。ヘムはタンパク質の活性中心として、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果たしているほかに、制御・シグナル分子としての機能も示唆されている。

ヘムによりその機能が制御されているタンパク質は「ヘム制御タンパク質」と呼ばれ、遺伝子発現・細胞恒常性・イオンチャネルの制御など幅広い生物学的過程で、ヘムは制御またはシグナル分子として機能していることが知られている。しかし、このような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ため、未だに十分議論されていない。本研究では、「ヘム制御タンパク質」のなかでもその生理的意義から重要な位置を占める DNA 結合タンパク質へのヘム結合について注目し、特に鉄代謝に関わるタンパク質の転写活性におけるヘム結合の重要性を構造化学的、生化学的手法により検討するとともに、生体内の鉄代謝とは無関係な制御系におけるヘム結合についてもその生理的意義を議論しようとしている。

第二章では、細胞内においてマメ科根粒菌で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ている。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である δ -aminolevulinic acid dehydrataseの転写を抑制し、細胞毒になるヘムの前駆体、protoporphyrin IXの蓄積を防ぐ機能を

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、酸化的な自己分解を起こす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、まず、単離精製したIrrにおけるICEへの特異的結合を検討するため、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FAM-ICEからの蛍光の異方性変化を追跡した。その結果、図2上に示すようにヘム

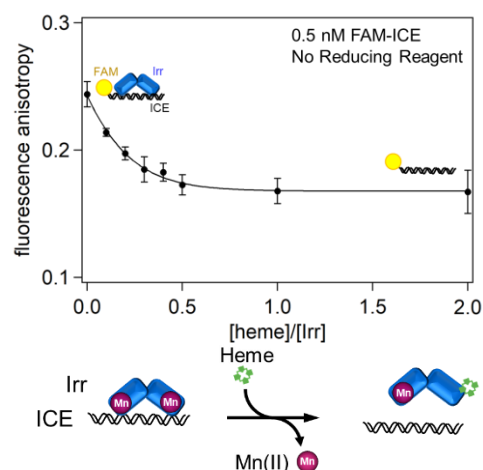


図2 ヘム結合によるIrr-ICE複合体の解離

の添加により、蛍光の異方性変化、つまり蛍光偏光度は低下し、これは分子の回転相関時間の増加、すなわち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の自己酸化分解は起こらず、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、 Mn^{2+} を含む培地で培養されたICE-likeモチーフを含む遺伝子産物は、細胞内の鉄量により制御されるものの、 Mn^{2+} が不足すると鉄量に依存した制御を失うことから、ヘム以外に Mn^{2+} がIrrとICEの結合に影響を与えることが報告されている³。そこで、 Mn^{2+} によるIrrのICE結合への影響を明らかにするため、まず、誘導結合プラズマ発光分析（ICP-OES）を用いることで、Irrに結合した Mn^{2+} の量を調べた結果、Irrには2当量結合することが明らかとなった。さらに、Irr-FAM-ICE複合体に金属キレート剤で、 Mn^{2+} と錯形成可能なEDTAを添加し、その蛍光異方性を追跡したところ（図3）、時間経過とともにその蛍光異方性は低下し、IrrからFAM-ICEの解離が観測できた。一方、FAM-ICE存在下、 Mn^{2+} が解離したIrrに Mn^{2+} を添加することにより、その蛍光異方性は時間経過とともに上昇し、FAM-ICEのIrrへの結合が観測された。つまり、IrrにおけるICEへの結合は、 Mn^{2+} がIrrに結合することが必須であると示された。このような Mn^{2+} のIrrにおける結合部位については、類似タンパク質のアミノ酸配列の相同性から、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た。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」領域で Mn^{2+} が配位していると想定されるヒスチジン残基を変異させ、その Mn^{2+} の結合をICP-OESから検討したところ、この「His-cluster」変異体は、 Mn^{2+} の結合能を喪失していることが示された。一方、この変異体は蛍光異方性の測定から、FAM-ICEとは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。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

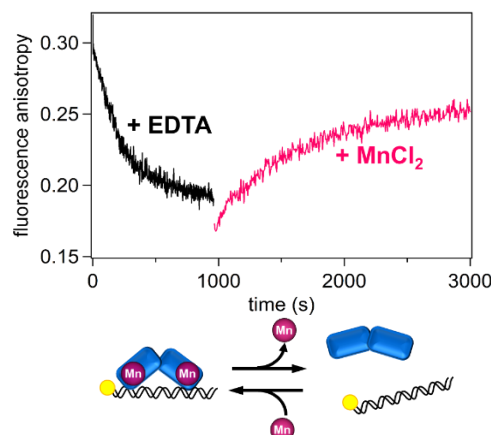


図3 IrrのICE結合への Mn^{2+} の効果

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)配列を有するものの、鉄やヘムの代謝関連の制御ではなく、多くのバクテリアでDNA複製を制御するCspDにおける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。このVcCspDにおけるヘムの特異的結合を確認するため、紫外可視吸収分光法を利用してVcCspDに対するヘム滴定を行った結果、VcCspDはヘムを1:1で結合することが明らかになった。このヘムの結合が、VcCspDの一本鎖DNA領域への結合に影響を与えるのか明らかにするため、合成一本鎖DNAオリゴマー (ssDNA) を一本鎖DNAのモデル基質として用い、その結合部位近くに位置する

と想定されるTrp11の蛍光消光を利用することで、ssDNAのVcCspDへの結合を追跡した。ssDNAの添加により、340 nm付近の蛍光強度は低下し、これは励起されたTrp11のエネルギーがssDNAのヌクレオチドに移動すること、つまり、ssDNAがVcCspDへ結合することを示している(図4上)。しかし、この蛍光消光はヘム存在下では抑制され(図4中)、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。さらに、このような蛍光消光の抑制は、ヘムへの配位子であるHRMのCys22を変異することで消失することから、VcCspDはヘムの結合によりssDNAへの結合能を失うことが明らかとなった(図4下)。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。この結果は、細胞の飢餓状態においてVcCspDが発現し、その細胞分裂を抑制していることを考慮すると、ヘムは細胞内の栄養状態を反映するシグナル分子としても機能している可能性を示している。

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、さらに鉄やヘムの代謝と関連しない生物学的過程を含む制御タンパク質における新しい制御機構を示すことにより、本研究での成果は、細胞内のヘムを媒介とする広範な制御システム解明の重要な糸口になることを提唱している。

参考文献

1. Kitatsuji, C., *et al.*, *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 18703.
2. Ishikawa, H., *et al.*, *Biochemistry*, **2011**, 50, 1016.
3. Sangwan, I., *et al.*, *J. Bacteriol.*, **2008**, 190, 5172.

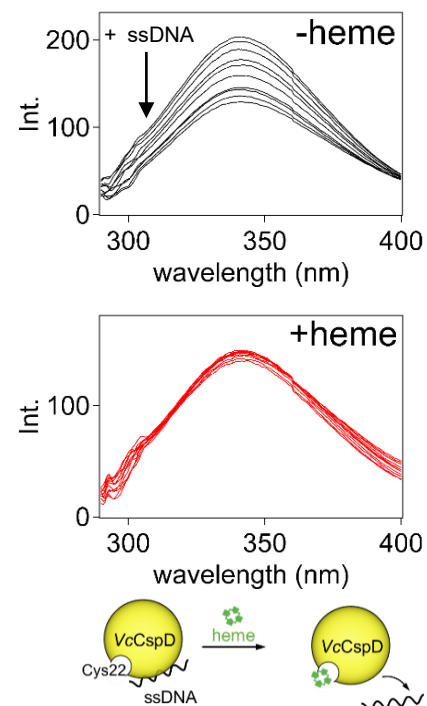


図4 ヘム結合によるCspD-ssDNA複合体の形成阻害解離