

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：34428

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2020

課題番号：17KK0154

研究課題名（和文）メタロシャペロンによる金属含有酵素の活性中心形成機構の解明

研究課題名（英文）Investigation on the mechanism of metal-containing active-center formation of metalloenzymes.

研究代表者

増田 太郎（Masuda, Taro）

摂南大学・農学部・准教授

研究者番号：40395653

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,300,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、金属含有タンパク質・酵素として、フェリチン、ヘモシアニン、フェノールオキシダーゼについて、その生合成と活性中心形成過程、成熟後の構造と機能に着目し、研究を行った。ヒト由来フェリチンへの鉄取り込み機構について、特に国際共同研究として実施した。ヒトフェリチンと、ヒトフェリチンに対するメタロシャペロンであるPCBP1との相互作用解析を行い、PCBP1の認識対象となるフェリチンサブユニットとその部位について明らかにした。また、甲殻類由来フェリチンとヘモシアニンについて、高分解能X線結晶構造解析に成功し、これまで不明であった金属中心などの詳細な構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、鉄貯蔵タンパク質フェリチンと、その鉄貯蔵に寄与するメタロシャペロンPCBP1との相互作用について、その一端を明らかとした。金属含有酵素の活性中心の形成には、特定の因子を必要とする場合が多いと考えられる。本研究の基課題の対象である、銅含有タンパク質のフェノールオキシダーゼとヘモシアニンの活性中心も、自発的なフォールディングは困難であり、他の因子を必要とすることが本研究の成果により示唆された。

これらのタイプ3銅タンパク質は、ヒトなど多くの生物に存在するチロシナーゼとも共通点が多く、その活性中心形成機構の解明はチロシナーゼ活性の制御に応用可能な基礎的な知見を与えうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this research, I investigated the structures and functions of some metalloproteins in order to clarify the mechanism on formation of the metal-containing active center of metalloproteins. The candidate proteins are ferritin, hemocyanin and phenoloxidase. Studies on ferritin was performed as a collaboration with the researchers in the US. The results showed that human ferritin H chain preferentially interacted with PCBP1 and some amino acid residues on the surface of ferritin that were critical for the interaction with PCBP1 were identified.

To elucidate the metal loading mechanism, the three dimensional structures of some metalloproteins, crustacean hemocyanin and ferritin, were solved. These reseaches revealed the precise structures around the metal-containing active sites of these proteins.

研究分野：海洋生物化学

キーワード：金属含有酵素 メタロシャペロン フェリチン フェノールオキシダーゼ ヘモシアニン

1. 研究開始当初の背景

本研究は、基課題「甲殻類における銅蛋白質群の黒変現象への寄与とその反応機構について」に関する国際共同研究として実施した。基課題は、甲殻類食品における代表的な劣化現象である「黒変」の原因となる酵素、タンパク質の同定と機能解析を目的としている。この現象は、甲殻類体液におけるメラニン形成反応に起因するもので、その初発段階の反応を触媒する酵素としてフェノールオキシダーゼ（以下 PO）が知られている。一般的に、黒変の原因酵素と考えられるのは PO であるが、近年 PO と非常に類似した構造を有する酸素運搬タンパク質ヘモシアニン（以下 Hc）の関与も指摘されている。PO、Hc とともに、二核銅中心と呼ばれる特徴的な活性中心を有する「タイプ 3 銅タンパク質」に分類される。このように、Hc が PO と類似の構造を取ることで、また、Hc が甲殻類体液に極めて高濃度で存在することなどから、Hc が何らかの構造変化の結果、微弱ながら PO 活性を持つに至るとの仮説が唱えられている。また、代表的なタイプ 3 銅蛋白質である PO と Hc の機能的な差異は、生物化学・錯体化学分野における大きな関心事となっている。

上述のように、PO と Hc はともに「タイプ 3 銅タンパク質」に属し、共通する最も顕著な特徴として、銅を含む活性中心を有することが挙げられる。しかし、申請者のこれまでの検討によると、これらタイプ 3 銅タンパク質は、大腸菌など細菌を用いた発現系では活性中心に銅原子が適切に取り込まれず、また、in vitro でアポ型 PO、Hc と銅を共存させた場合も自発的な二核銅中心形成には至らなかった。以上のことから、PO、Hc の適切な活性中心形成には、銅を活性中心にもたらず因子が必須である可能性が示唆された。アポタンパク質の適切な部位に金属をもたらず因子は「メタロシャペロン」と呼ばれており、最近になって一部の金属含有タンパク質において見いだされている。

メタロシャペロンに関する研究として、鉄貯蔵タンパク質フェリチンの鉄貯蔵を支援する因子としてポリ C 結合タンパク質 1（以下、PCBP1）が見出された研究が挙げられる。これは、米国国立衛生研究所の Caroline Philpott 博士のグループによるもので、フェリチンによる多量の鉄取り込み反応は、PCBP1 の存在なしでは起こらないことを示したものである (Philpott CC, Elife 2014 など)。PCBP1 によるフェリチンの鉄貯蔵反応促進は、数少ないメタロシャペロン研究として今日でも当該分野における主要な研究成果とされている。したがって、本研究の基課題の主題である銅タンパク質の活性中心形成機構解明に向けた研究手法の取得のために、米国国立衛生研究所との国際共同研究はこの上ない機会であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、このようなメタロシャペロンに関する国際共同研究として、当該分野において先駆的な成果を上げている米国国立衛生研究所の Caroline Philpott 博士のもとで、金属タンパク質とメタロシャペロンの相互作用解析を実施した。国立衛生研究所においては、金属含有タンパク質として Philpott 博士の研究テーマであり、申請者も長年研究に取り組んできた鉄貯蔵タンパク質フェリチンを対象とした。ここでは、同定済みのフェリチンに対するメタロシャペロンである PCBP1 とフェリチンの相互作用について、1. PCBP1 はフェリチンの H 鎖或いは L 鎖のうち何れと相互作用するか、2. PCBP1 は 3 つの KH ドメインから成るが、そのうちのどのドメインがフェリチンとの相互作用に必須か、に着目して検討を行った。

3. 研究の方法

3-1 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いたヒトフェリチンと PCBP1 の相互作用解析

S. cerevisiae w303a 株 (MATa/MATa {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15} [phi⁺]) 内での共発現による相互作用を行うため、pYES ベクタ（以下、pYES Ura）と、酵母内での選択マーカーを URA3 から Ade2 に変更した改変型 pYES ベクタ（以下、pYES Ade）を用いた。基本的な実験デザインとして、pYES Ura のマルチクローニングサイトには HA タグを付したフ

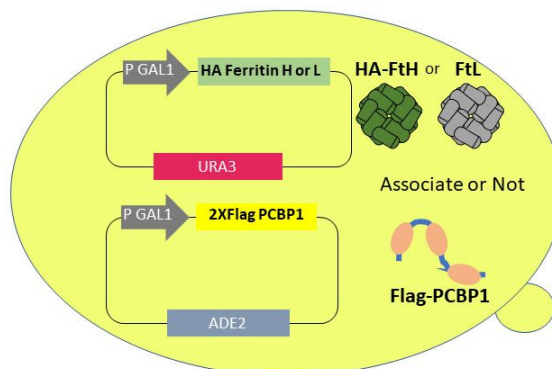


図 1 出芽酵母を用いた PCBP1 とフェリチンとの相互作用解析

フェリチン (H鎖 (以下 FtH) もしくは L鎖 (以下 FtL) およびその変異体) cDNA, pYES Ade には PCBP1 およびそのドメイン変異体 cDNA を挿入した (図 1)。両者を出芽酵母に導入、発現誘導し、タンパク質を抽出後抗 Flag アガロースビーズを用いた共免疫沈降を行い、抗 HA 抗体によるウェスタンブロットングで Flag-PCBP1 と相互作用した HA-Ft を検出することで相互作用の有無を確認した。蛍光標識二次抗体を用いたウェスタンブロットングのシグナル検出とバンド強度の定量は、Odyssey CLx を用いて行い、Flag-PCBP1 に対する HA-Ft の相対結合量を算出した。Flag-PCBP1 に対する FtH, FtL 二者間の結合量の差異については、Student T-test により検定した。

また、PCBP1 の存在下、非存在下での FtH の鉄取り込みについて、タンパク質発現誘導時に ^{55}Fe を酵母生育培地に加え、1時間経過後総タンパク質を抽出・定量し Native-PAGE で分離した。フェリチン多量体をウェスタンブロットングで検出し、その鉄取り込み量を ^{55}Fe からの X線放射量で定量化した。

3-2 トリプトファン蛍光変化を利用した in vitro でのヒトフェリチンと PCBP1 KH-3 ドメインの相互作用解析

PCBP1 の cDNA のうち、KH-3 ドメインをコードする配列部分を、pSUMO ベクターにクローニングし、SUMO-KH3 融合タンパク質の大腸菌での発現プラスミドを構築した。また、SUMO-KH3 に唯一含まれるトリプトファン残基を欠失させた変異体も作製した (SUMO-KH3 w/o Trp)。SUMO-KH3 融合タンパク質を大腸菌発現系により調製し、単一に精製した。SUMO-KH3 と SUMO-KH3 w/o Trp について、分光蛍光光度計を用いて、励起波長 (250-400 nm) における蛍光強度を測定した。また、FtH および FtL の大腸菌発現タンパク質は、pET21d を発現プラスミドとして調製し、単一に精製した。

SUMO-KH3 と FtH および FtL の相互作用を、SUMO-KH3 溶液 (1 μM) に対する濃縮 FtH, FtL (165 μM) を滴定し、その蛍光強度変化をプロットすることにより解析した。

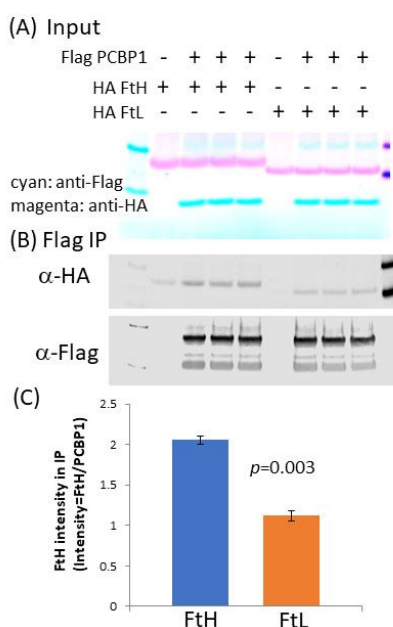


図 2 酵母共発現系を用いた Flag-PCBP1 と HA-Ft の相互作用解析 (A) 酵母粗抽出液、(B) Flag-IP、(C) 相互作用 FtH と FtL の相対定量

4. 研究成果

4-1 PCBP1 と FtH および FtL との相互作用

酵母細胞内での PCBP1 とフェリチン (FtH, FtL) との相互作用解析結果を図 2 に示す。図 2 (B) が示すように、全長の PCBP1 は FtH, FtL の両方と相互作用すると考えられる。しかし、PCBP1 は FtH とより強く相互作用することが示唆された図 2 (C)。なお、ヒトフェリチン H鎖、L鎖のうち、鉄取り込みに必要な活性部位を有するのは、H鎖のみである。

図 2 により、PCBP1 がヒトフェリチン H鎖と相互作用することが確かめられた。本実験系において、PCBP1 が実際にフェリチン H鎖の鉄取り込みを促進するかについて、タンパク質発現誘導時に酵母生育培地に ^{55}Fe を添加することで検討した。フェリチン H鎖はその配列中に鉄取り込みに必要な活性部位 (フェロオキシダーゼサイト) を有するが、図 3 に示すように酵母細胞中で単独では鉄貯蔵に寄与せず、PCBP1 の存在下でのみ鉄貯蔵タンパク質として機能した。

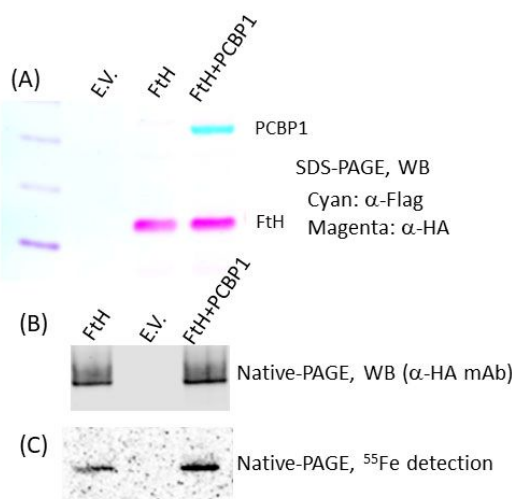


図 3 酵母共発現系における FtH の鉄取り込みと PCBP1 の関係 (A) 酵母粗抽出液の SDS-PAGE-ウェスタンブロットング、(B) (A) の Native-PAGE ウェスタンブロットング (C) フェリチン多量体に内包される ^{55}Fe の検出

4-2 FtH と相互作用する PCBP1 のドメインについて

PCBP1 は3つのKHドメインとKH2とKH3ドメインの間にある可変領域 (Variable Region) から成る (図4)。PCBP1 とFtHの相互作用において主要な役割を果たすPCBP1のドメインを明らかにするため、PCBP1の各ドメインとFtHの共発現を行い (図4) 発現タンパク質の抗Flag抗体結合ビーズを用いた共免疫沈降実験を行った。

その結果、FtHとの相互作用はPCBP1の各ドメインのうちKH3ドメインにおいて最も顕著であった (図5)。

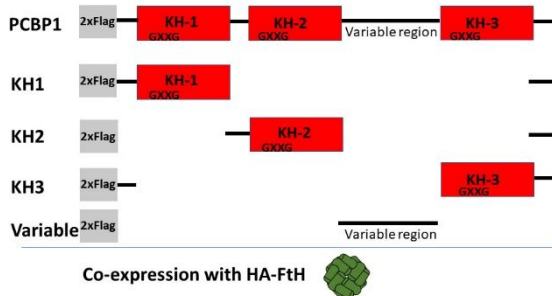


図4 FtHとの相互作用に必要なPCBP1のドメイン解析

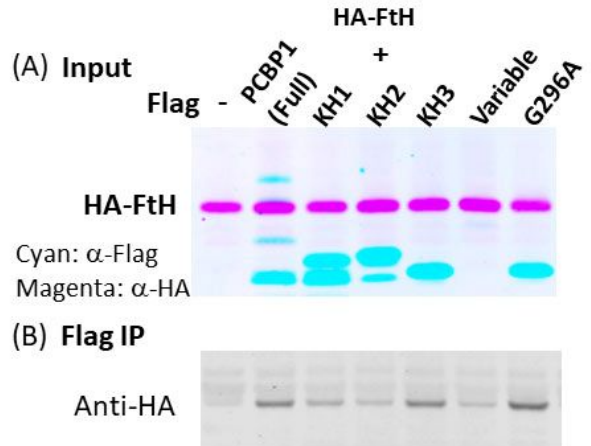


図5 FtHとの相互作用に必要なPCBP1のドメイン

(A) 酵母粗抽出液のSDS-PAGE-ウェスタンブロット

(B) (A)のFlag-IP後のHA抗体を用いたブロット

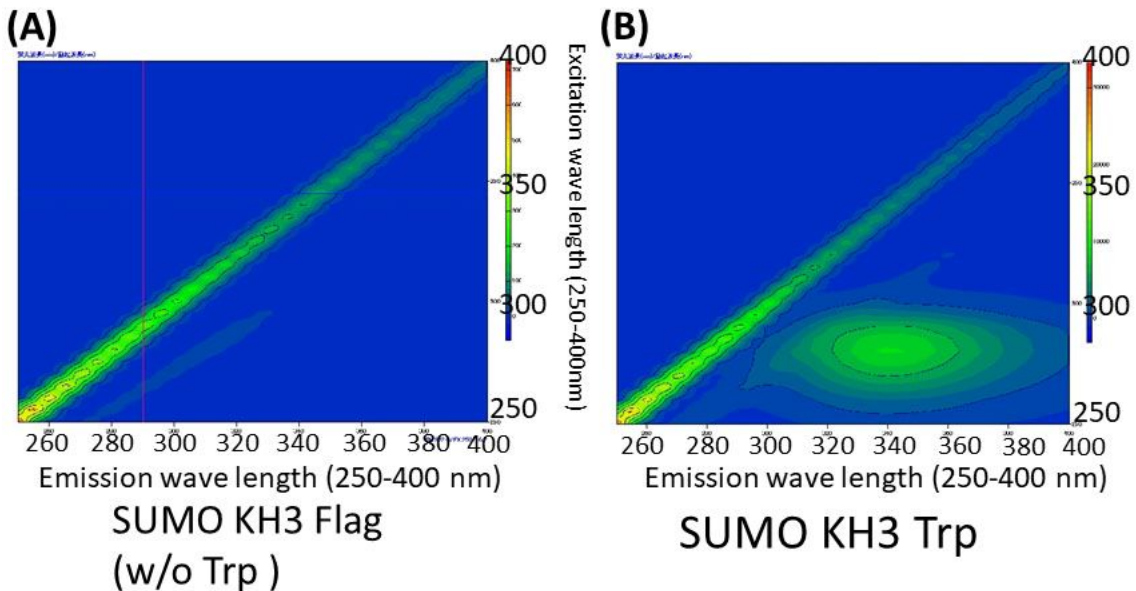


図6 SUMO-KH3 w/o Trp (A)とSUMO-KH3 (B)の蛍光スペクトル

4-3 FtH と PCBP1-KH3 ドメインの in vitro における相互作用解析

SUMO-KH3 と SUMO-KH3 w/o Trp の蛍光スペクトルを図6に示す。トリプトファン残基1つを含むSUMO-KH3 (SUMO KH3 Trp)のみ、285 nmの励起光で345 nmの蛍光を発することが明らかとなった。この傾向はKH3ドメインに存在する唯一のトリプトファン残基によるものであると考えられる。フェリチンと物理的に相互作用する場合、このトリプトファン残基の周辺環境に変化をきたし、スペクトル変化として検出できる可能性が考えられた。

SUMO-KH3Trp に対してFtH, FtL 滴定した時の蛍光スペクトル変化から、同濃度のFtH, FtL 単

独自の蛍光スペクトルを差し引いた差スペクトルを図7に示す。FtHをSUMO-KH3Trpに滴定した場合のみ、濃度依存的な蛍光強度の減少が認められた。各Ft濃度の蛍光強度から、SUMO-KH3Trp単独の蛍光強度を差し引いた値の逆符号をF(AU)とし、

$F(AU) = F_{\max} \times [FtH] / (K_0 + [FtH])$ にフィッティングすると、FtHのPCBP1に対する解離定数 K_0 は、 $0.52 \mu\text{M}$ と見積もられた。

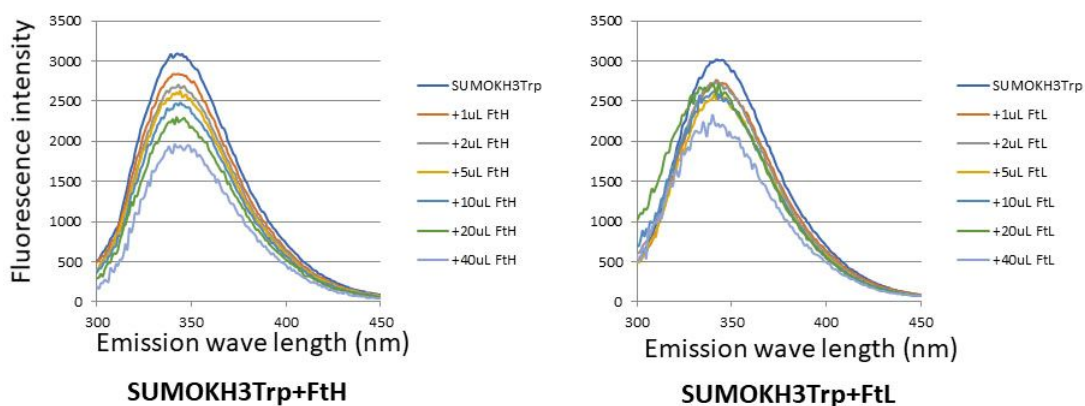


図7 SUMO-KH3 Trpに対するFtH (A) およびFtL(B)の滴定時の蛍光スペクトル変化

ヒトフェリチンは、通常FtHとFtLが共存するヘテロ多量体(24量体)として存在して、最大数千に及ぶ鉄原子を内包することができる。以上の結果から、フェリチンへの鉄貯蔵には鉄シャペロンPCBP1が必要であり、主としてPCBP1のKH3ドメインがFtHの表面を認識し、両者の相互作用は解離定数 μM オーダー程度と強いものではなく、一過的であると考えられる。この相互作用について、具体的に両者がどの部分を認識しあっているかについて明らかにすることは、哺乳類の鉄代謝を明らかにするうえで必要な情報であり、今後の研究課題となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Taro Masuda, Jiachen Zang, Guanghua Zhao, Bunzo Mikami	4. 巻 27
2. 論文標題 The first crystal structure of crustacean ferritin that is a hybrid type of H and L ferritin.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1955-1960
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.3495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Taro Masuda, Seiki Baba, Koichi Matsuo, Shinji Ito, Bunzo Mikami	4. 巻 688
2. 論文標題 The high-resolution crystal structure of lobster hemocyanin shows its enzymatic capability as a phenoloxidase.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108370
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2020.108370	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 増田太郎、河内達暉、豊原治彦
2. 発表標題 甲殻類黒変現象に寄与するタイプ3銅タンパク質群
3. 学会等名 日本水産学会2020年度春季大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Taro Masuda, Sarju Patel, Olga Protchenko, Caroline Philpott
2. 発表標題 The Interaction Analysis of Iron Chaperone PCBP1 and Human Ferritin H and L Chain
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田太郎、三上文三、豊原治彦
2. 発表標題 甲殻類黒変原因タンパク質に関するUpdate
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	フィルポット キャロライン (Philpott Caroline)	米国国立衛生研究所・NIDDK・Senior Investigator.	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	国立衛生研究所		