

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02396

研究課題名(和文) 生体金属イオンの輸送システムで機能する膜タンパク質の構造解析

研究課題名(英文) Structural analysis of the membrane proteins involved in metal transport

研究代表者

杉本 宏 (Sugimoto, Hiroshi)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学研究センター・専任研究員

研究者番号：90344043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：人の生体維持に必須の微量元素である鉄を小腸の腸管上皮細胞で取り込む際には、膜内在型の還元酵素であるDcytbが重要な役割を担っている。しかし、これまでの研究では鉄イオンの配位子さえ明らかになっていなかった。本課題ではDcytbのX線結晶構造解析と分光法・生化学的な機能解析により、鉄還元のための電子の移動や鉄イオンの結合に関する構造的基盤を明らかにした。また、ヘムの輸送タンパク質に関連した解析では、古くなった赤血球からのヘム鉄の再利用に関して新たな現象を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鉄をはじめとする生体内の金属元素の多くはさまざまな生体内でのプロセスに必須であるが、過剰に体内に存在すると細胞にとって有毒となるため、体内の濃度は綿密に調整されている。本課題が実施したDcytbの解析では、ビタミンCによって小腸での鉄分の吸収が促進される仕組みを立体構造の見地から明らかにした。鉄の輸送と代謝のメカニズムは様々な疾病や病原菌の感染にも関与していることから注目されており、鉄過剰症や貧血といった制御のバランスが崩れて引き起こされる疾病の発症のメカニズムの理解や治療法の開発などへ発展すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Dietary iron absorption is regulated by duodenal cytochrome b (Dcytb), an integral membrane protein that catalyzes reduction of non-heme Fe (III) by electron transfer from ascorbate across the membrane. This step is essential to enable iron uptake by the divalent metal transporter. The current study provides structural insight into the function of Dcytb, one of the two duodenal proteins that are required for the uptake of dietary non-heme iron. In combination with the biochemical studies, this work also provides structural insight into how ascorbate enhances iron uptake and how several potential iron ligands found in various foods promote or inhibit iron uptake. Ultimately, knowledge of the structure of Dcytb should enable development of new, structure-based strategies for promoting the reduction of dietary iron and thereby enhancing the bioavailability of this essential nutrient.

研究分野：構造生物化学

キーワード：ヘムタンパク質 電子伝達 X線結晶構造解析 ビタミンC

1. 研究開始当初の背景

鉄をはじめとする生体内の金属元素の多くはさまざまな生体内でのプロセスに必須のコファクターであるが、逆に過剰に体内に存在すると有毒となる。そのため、体内の濃度は綿密に調整されている。ヘモクロマトーシスに代表される鉄過剰症や貧血は、このバランスが崩れた結果と考えられる。これまでに小腸における非ヘム鉄の吸収の分子メカニズムは盛んに研究されてきた。ヘム鉄の代謝についても、エンドソームから細胞質への受け渡しも含め、脊椎動物での分子生物学的な情報がここ 10 年間でようやく解明されてきた。本課題は、特に鉄イオンの輸送システムに注目し、中心的役割を果たす膜タンパク質の X 線構造解析¹に加え、分光法や細胞を用いた機能解析やヘム代謝物の分析²などを行うことで、生命が発達させてきた「生体金属のホメオスタシスの分子メカニズム」に迫った。

(1) 小腸での非ヘム鉄の吸収：Dcytb が還元した鉄は DMT-1 によって膜輸送される

ヒトでは食物からの鉄イオンの吸収は小腸で行われる（図 1）。食物中の鉄はおもに 3 価で存在するので、何らかの形で 2 価に還元されなければ吸収されない。その理由は、膜内の二価金属輸送タンパク質 Divalent Metal ion Transporter-1 (DMT-1) を介して腸管上皮細胞内に取り込まれるためである³。Fe³⁺は腸管の上皮細胞膜内に発現している Duodenal cytochrome b (Dcytb) というヘム酵素によって Fe²⁺に還元される⁴。還元に必要な電子は細胞内のビタミン C（アスコルビン酸、以後 Asc と略）から供給される。野菜や果実を食べると鉄分の吸収が促進されているということは古くから栄養学的に知られていたが、DMT-1 と Dcytb という 2 つのタンパク質の機能が同定されたことにより確認証明されている。

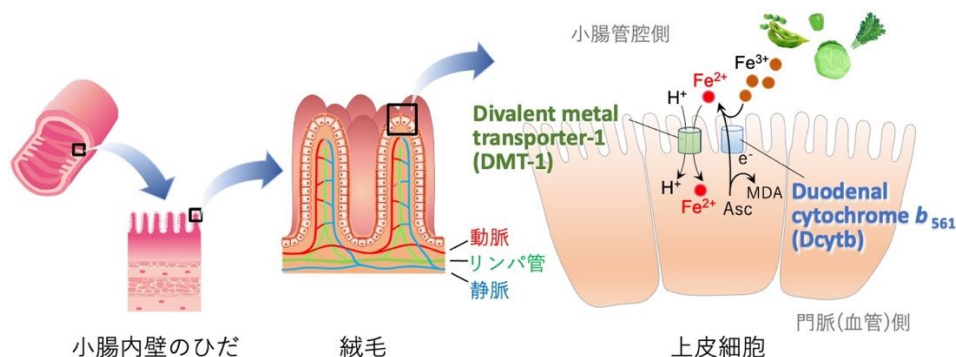


図 1. 小腸上皮細胞で鉄イオンを吸収する際に、鉄還元酵素とトランスポーターが機能する

(2) 老化した赤血球からヘム鉄は再利用される

食餌に加えて赤血球分解によるヘムの再利用によりヘム鉄が獲得されることが明らかになっている。寿命が尽きた赤血球はマクロファージの貪食によって分解される（図 2）。その際にヘムを細胞内小胞であるファゴリソソームから細胞質へと輸送するのが HRG-1 (Heme Responsive Gene 1) というヘムトランスポーターである⁵。しかし、他のトランスポーターファミリーとはアミノ酸配列に相同性がなく、エネルギー駆動力も不明である。

2. 研究の目的

- (1) Dcytb は「膜貫通領域を縦断する電子移動」と「鉄イオンの結合・解離」という分子機能をもつ。立体構造と生化学的な機能解析、そして電子移動反応の解析により、秩序ある電子の受け渡しや鉄イオンの結合がどのような制御でなされているのか、その構造的基盤を明らかにする。
- (2) 小腸上部（十二指腸）の柔毛の表面には粘膜上皮細胞が極性をもって一層に並んでおり、これらの細胞の腸管腔側に面した細胞膜に Dcytb が局在している。これを模した状態のヒト培養細胞に Dcytb を発現させた系を構築し、鉄還元活性と DMT-1 による膜輸送との関連を明らかにする。また、酵母に発現させた Dcytb の機能を評価する系を構築し、ヒト由来 Dcytb の X 線結晶構造解析により明らかになった特徴と細胞での機能との関連を明らかにする。
- (3) HRG-1 をコードする遺伝子を破壊したマウスの解析を行うことで、ヘムの再利用における

膜輸送の仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) X線結晶構造解析

Dcytb を大腸菌膜に発現させ、界面活性剤存在下で精製を行った。脂質キュービック相法（LCP法）によってサイズが約 5 μm の微小結晶が得られ、X線回折データは SPring-8 BL32XU の自動データ収集システム Zoo⁶ を利用した。基質フリー型の結晶と、ソーキングによって Zn^{2+} および Asc 結合型の結晶を調製した。いずれも 900 個以上の微小結晶から測定した small wedge データ (5° 結晶) に対して、プログラム KAMO⁷ を利用して格子定数のクラスタ解析に基づいたマージを行うことで構造解析に最適なデータセットを得た。

(2) 分光解析

Dcytb は補欠因子としてヘムを含んでいるため、酸化還元状態の変化は可視光吸収スペクトルに反映される。界面活性剤 (n-dodecyl- β -D-maltoside) で精製した状態、あるいはナノディスクに再構成した Dcytb について、アスコルビン酸による還元型への反応速度を stopped-flow 装置による測定で求めた。また、結晶構造から示唆されたアスコルビン酸結合部位の解析を行うために、変異体について測定を行い、その結果を野生型と比較した。また、共鳴ラマン分光法によってヘムの分子構造および配位環境を取得するとともに、金属イオンの滴定によるスペクトル変化を測定し、ヘムの精緻な構造変化を追跡した。

(3) ヒト培養細胞を用いた鉄還元機能の解析

小腸上部の柔毛の表面には粘膜上皮細胞が極性をもって一層に並んでおり、それらの細胞の腸管腔側に面した細胞膜に Dcytb が局在している。このような状態を、プラスチックプレートのウェル内にセットした培養カップの底に Caco-2-hk 細胞⁸ を敷き詰めることで再現した。この細胞に Dcytb 遺伝子を導入し、Dcytb を発現させた後、カップの中に酸化鉄を含む反応液を加えてインキュベートした後に、細胞内の Fe^{2+} を蛍光または呈色試薬を用いてモニターすることで Dcytb の変異による鉄イオンの吸収への影響について検討した。

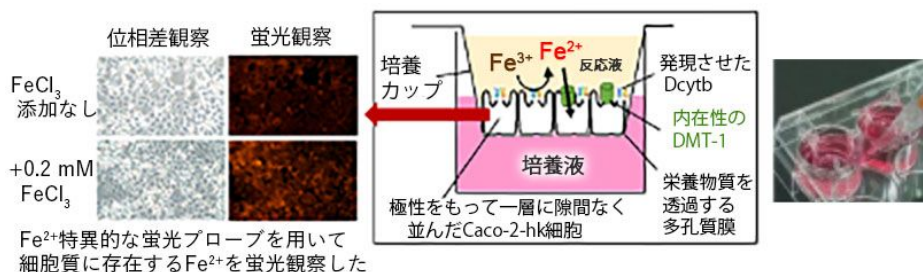


図 2. ヒト腸管モデル細胞 (Caco-2-hk) での鉄取り込み活性測定系の構築

(4) X線粉末回折

研究協力者の Iqbal Hamza (メリーランド大学) らによって HRG-1 遺伝子のノックアウト (KO) マウスが作製されており、表現型の様々な解析の中で、脾臓組織に蓄積した黒色の小片の分析を X線粉末回折法で行った。脾臓から分離抽出した不溶性画分を石英キャピラリーに封入して SPring-8 BL02B2 で X線粉末回折データを収集した。そしてリートベルト解析によって構造決定を行った。

4. 研究成果

(1) Dcytb の X線結晶構造：小腸でビタミン C が鉄吸収を促進する仕組みを解明

Dcytb は単量体 (286 残基) あたり 6 つの膜貫通ヘリックスと補欠因子として 2 つのヘムを有し、2 量体を形成していた (図 3)。細胞質の Asc から電子を受け取り、分子内電子移動を経て細胞外 (管腔側) の 3 価鉄を 2 価に還元していると考えられてきた。予想通り、結晶構造では Dcytb の細胞質側に Asc が結合していた。一方、管腔側の表面ポケットでは Fe^{2+} を mimic するために加えた Zn^{2+} が His108 側鎖に結合していた。興味深いのは、この Zn^{2+} に配位する形でもう一つの Asc が結合していたことである。ただし、こちらは実際には Asc ではなく、酸化型のモノデヒドロア

スコルビン酸 (MDA) の水酸基からプロトンが解離した状態で配位していると考えられる。Fe³⁺ と Zn²⁺ の競合実験・変異体解析やアミノ酸残基の保存性からも、この His 残基が Fe³⁺ 結合部位だと推察される。これらの結果は、Asc は細胞質からの電子供与体として利用されるだけでなく、管腔側でも MDA として電子伝達を媒介し、キレーターとしての役割を担っていることを示す。

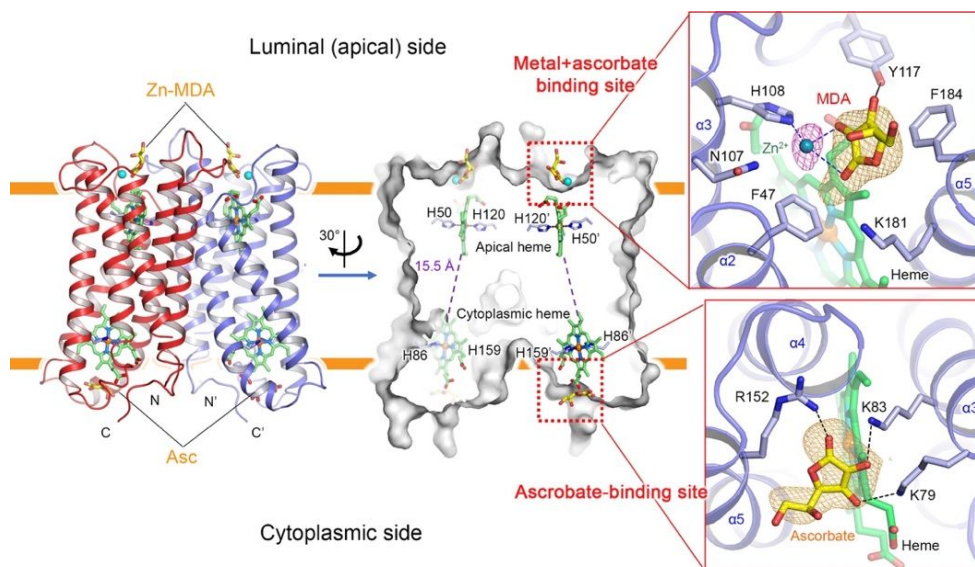


図 3. ヒト Dcytb の結晶構造。¹ ダイマー構造を形成している (左パネル)。モノマーあたり 2 分子のヘムを含み、それぞれ 2 つの His 残基が配位している (中央)。細胞質側と管腔側の分子表面でヘムの近傍には、それぞれ Asc および Zn²⁺-MDA 結合部位がある (右)。この Zn²⁺-MDA 結合部位に Fe³⁺ がキレーターと複合体を形成しながら結合すると考えられる。

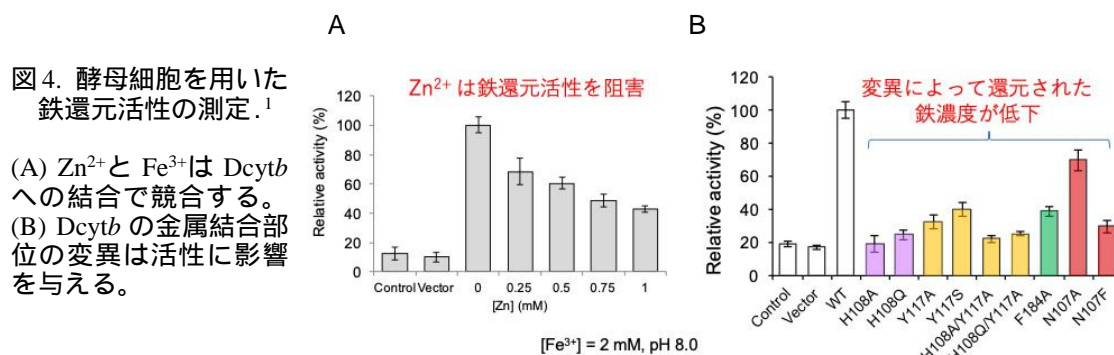


図 4. 酵母細胞を用いた鉄還元活性の測定。¹
(A) Zn²⁺ と Fe³⁺ は Dcytb への結合で競合する。
(B) Dcytb の金属結合部位の変異は活性に影響を与える。

(2) Dcytb のカイネティクスおよび分光解析

野生型および細胞質側の分子表面にある 3 つの塩基性残基の変異体 Dcytb について、Asc による還元型への反応速度を stopped-flow 装置を用いて求めた。その結果、それらの残基が還元反応に重要であることを確認した¹。また、共鳴ラマン分光法によって Dcytb の補欠因子であるヘムの配位環境を取得した。Asc 存在下で鉄イオンの滴定によるスペクトル変化を測定し、ヘムの精緻な構造変化を追跡するとともに、亜鉛イオンの解離定数 ($K_d=0.5$ mM) を求めた¹。

(3) ヒト培養細胞を用いた非ヘム鉄の還元反応と輸送機構の解析

Caco-2-kh 細胞に野生型ならびに変異体の Dcytb を発現させ、Fe³⁺ 添加後の細胞内の Fe²⁺ 濃度を比較した結果、Dcytb 遺伝子を導入していないコントロールに比べて、野生型および鉄イオン結合残基周辺の変異体で大きな変化が見られなかった。この結果については不明な点が多いが、鉄還元機能を持つ他の因子が存在する可能性も考えられる。一方、Dcytb の C 末端を 10 残基ずつ削除した変異体では、細胞内の Fe²⁺ 濃度が高くなっていった。細胞質側に露出する C 末端領域は結晶中で disorder していたが、遺伝性のヘモクロマトーシス (鉄過剰による臓器・組織の障害) の患者ではこの領域に変異がみられることが報告されている^{4,9}。したがって、Dcytb の C 末端領域が細胞内に取り込まれた Fe²⁺ の輸送に関わっている可能性もあり、この領域が欠損すると細胞内に鉄が停滞して蓄積するという仮説をたてるに至った。今後、Dcytb の C 末端領域と細胞内外の鉄動態との関連について分子レベルで明らかにする必要がある。

(4) 哺乳類のヘム再利用において Hemozoin の生成がヘムの毒性を回避する²

HRG-1 の遺伝子を破壊したマウスの脾臓や骨髄は黒く着色していた (図 5)。組織から黒い蓄積物を抽出し、有機溶剤で可溶化した試料の可視光吸収スペクトルはヘムと同様の特徴を示した。黒片を固体のまま分離して SPring-8 で X 線ビームを照射すると同心円状の回折パターンを示した。そして、X 線粉末回折法によって立体構造の決定に成功した。ヘムが有する 2 つのプロピオン酸のうち、一方は隣のヘム分子の鉄に配位し、他方は別の分子のプロピオン酸と水素結合することで多量体化する相互作用が明らかとなった。この構造はマラリア原虫で観察される細胞内結晶である hemozoin というヘムの多量体構造と完全に一致していた。マラリア原虫が感染してヒトの血液から鉄源としてヘムを奪い取ったあとに、余剰のヘムを hemozoin の形態で酵素を介して蓄積することが知られており、これまでに原虫以外の生物からは発見されていない。今回の KO マウスの解析からは、ヘム代謝の生理学において 2 つの大きな意義がある。まず、HRG-1 の生理機能が古い赤血球からヘムを再利用する際の膜輸送体であることを裏付けたこと。そして、ほ乳類でも hemozoin の生成によってヘムの毒性を回避できる可能性が示唆された²。hemozoin の生成機構については、細胞生理学・生化学的に今後さらに解析が必要である。

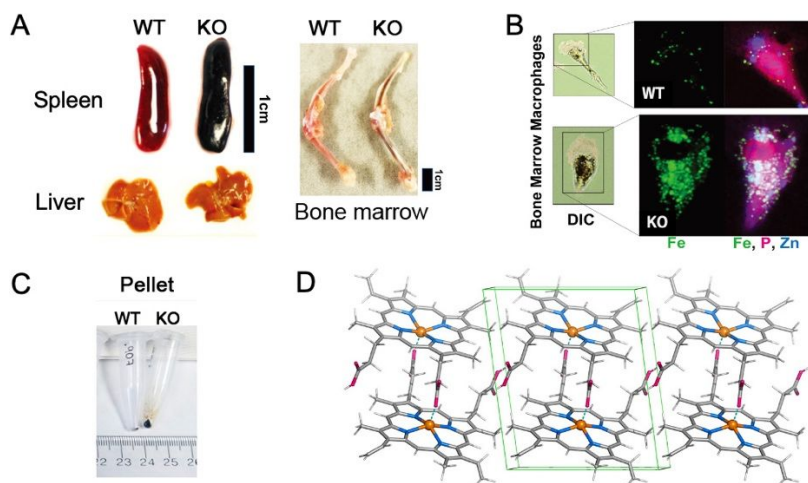


図 5. HRG-1 ノックアウトマウスの臓器に蓄積した結晶性のヘム²

(A) 黒く着色した脾臓と骨髄。(B) 骨髄マクロファージに Fe が蓄積。(C) 脾臓から分離した蓄積物。(D) X 線粉末回折で決定した蓄積物の分子構造はマラリア原虫の hemozoin 結晶と同じであった。

<引用文献>

1. Ganasen, M. *et al.* Structural basis for promotion of duodenal iron absorption by enteric ferric reductase with ascorbate. *Commun. Biol.* **1**, 120 (2018).
2. Pek, R. H. *et al.* Hemozoin produced by mammals confers heme tolerance. *eLIFE* **8**, e49503 (2019).
3. Gunshin, H. *et al.* Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**, 482-8 (1997).
4. McKie, A. T. *et al.* An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* **291**, 1755-9 (2001).
5. Rajagopal, A. *et al.* Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature* **453**, 1127-31 (2008).
6. Hirata, K. *et al.* ZOO: an automatic data-collection system for high-throughput structure analysis in protein microcrystallography. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* **75**, 138-150 (2019).
7. Yamashita, K., Hirata, K. & Yamamoto, M. KAMO: towards automated data processing for microcrystals. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* **74**, 441-449 (2018).
8. Fujishiro, H., Hamao, S., Tanaka, R., Kambe, T. & Himeno, S. Concentration-dependent roles of DMT1 and ZIP14 in cadmium absorption in Caco-2 cells. *J. Toxicol. Sci.* **42**, 559-567 (2017).
9. Zoller, H. *et al.* Duodenal cytochrome b and hephaestin expression in patients with iron deficiency and hemochromatosis. *Gastroenterology* **125**, 746-54 (2003).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 1件）

1. 著者名 Pek, R. H., Yuan, X., Rietzschel, N., Zhang, J., Jackson, L., Nishibori, E., Ribeiro, A., Simmons, W., Jagadeesh, J., Sugimoto, H., Alam, M. Z., Garrett, L., Haldar, M., Ralle, M., Phillips, J. D., Bodine, D. M., Hamza, I.	4. 巻 8
2. 論文標題 Hemozoin produced by mammals confers heme tolerance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLIFE	6. 最初と最後の頁 e49503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.49503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tamura, K., Sugimoto, H., Shiro, Y., Sugita, Y.	4. 巻 123
2. 論文標題 Chemo-mechanical coupling in the transport cycle of a heme ABC transporter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. B	6. 最初と最後の頁 7270-7281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.9b04356	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 -

1. 著者名 Ganasen Menega, Togashi Hiromi, Takeda Hanae, Asakura Honami, Tosha Takehiko, Yamashita Keitaro, Hirata Kunio, Nariai Yuko, Urano Takeshi, Yuan Xiaojing, Hamza Iqbal, Mauk A. Grant, Shiro Yoshitsugu, Sugimoto Hiroshi, Sawai Hitomi	4. 巻 1
2. 論文標題 Structural basis for promotion of duodenal iron absorption by enteric ferric reductase with ascorbate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-018-0121-8	査読の有無 無
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12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Hiroshi Sugimoto, Menega Ganasen, Hiromi Togashi, Hanae Takeda, Yoshitsugu Shiro, A Grant Mauk, Hitomi Sawai
2. 発表標題 Structural basis of iron reduction by human duodenal cytochrome b (Dcytb) involved in intestinal iron absorption
3. 学会等名 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Sugimoto, Menega Ganasen, Hiromi Togashi, Hanae Takeda, Yoshitsugu Shiro, A Grant Mauk, Hitomi Sawai
2. 発表標題 Structural basis of ascorbate-dependent iron reduction by human Dcytb involved in intestinal iron absorption
3. 学会等名 32nd European Crystallographic Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Menega Ganasen、富樫ひろ美、山下恵太郎、平田邦生、Grant A. Mauk、城 宜嗣、澤井仁美、杉本 宏
2. 発表標題 ヒト小腸の細胞膜でDcytbが鉄分吸収を促進するメカニズム
3. 学会等名 平成30年度結晶学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Ganasen, 藤代瞳、X. Yuan, I. Hamza, 姫野誠一郎、A. G. Mauk, 杉本宏、城宜嗣、澤井仁美
2. 発表標題 ヒトの鉄イオン吸収に関わる膜タンパク質の立体構造に基づく生きた細胞での機能解析
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤井仁美
2. 発表標題 ヒトの鉄イオン吸収に関わる膜タンパク質の立体構造を基盤とした機能と構造の相互解析
3. 学会等名 第42回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Sawai
2. 発表標題 Structural Basis for Promotion of Human Iron Absorption by Duodenal Ferric Reductase with Ascorbate and Some Dietary Metal-chelators
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia Meeting: Iron, Reactive Oxygen Species & Ferroptosis in Life, Death & Disease (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Sawai
2. 発表標題 Structural Basis for Enhancement of Human Iron Uptake by Duodenal Ferric Reductase with Ascorbate
3. 学会等名 9th Asian Biological Inorganic Chemistry (AsBIC-9) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Ganasen, H. Asakura, T. Tosha, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, Y. Shiro, H. Sugimoto and H. Sawai
2. 発表標題 Structural Insight into the Dietary Non-heme Iron Absorption in Human Duodenum
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Menega Ganasen, Hitomi Fujishiro, Xiaojing Yuan, Iqbal Hamza, A. Grant Mauk, Seiichiro Himeno, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, Hitomi Sawai
2. 発表標題 Structure-guided Functional Analysis of Human Ferric Reductase Using Living Cells
3. 学会等名 Gordon Research Conference: 2018 Chemistry and Biology of Tetrapyrroles (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	M. Ganasen, H. Asakura, T. Tosha, T. Urano, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, Y. Shiro, H. Sugimoto, H. Sawai
2. 発表標題	Understanding the Mechanism of Dietary Iron Absorption at the Atomic level
3. 学会等名	第91回日本生化学会年会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	杉本宏, Menega Ganasen 富樫ひろ美, 武田英恵, 朝倉帆南, 山下恵太郎, 平田邦生, A. Grant Mauk, 城宜嗣, 澤井仁美
2. 発表標題	小腸上皮細胞膜で機能する鉄還元酵素Dcytbの結晶構造
3. 学会等名	平成30年度 内外環境応答・代謝酵素研究会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	H. Sugimoto, M. Ganesen, H. Togashi, H. Takeda, H. Asakura, T. Tosha, K. Yamashita, K. Hirata, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, Y. Shiro, H. Sawai
2. 発表標題	Structural basis of ascorbate-dependent iron reduction by human duodenal cytochrome b (Dcytb) involved in intestinal iron absorption
3. 学会等名	Asian Crystallographic Association Conference (AsCA 2018) (国際学会)
4. 発表年	2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

貧血予防に新たな指針～ビタミンCが鉄分の吸収を促進するメカニズムを原子レベルで解明～
http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180820_1/
 貧血予防に新たな指針～ビタミンCが鉄分の吸収を促進するメカニズムを原子レベルで解明～
http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/press_release/2018/180820/

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
研究 分担者	澤井 仁美 (Sawai Hitomi) (50584851)	兵庫県立大学・生命科学研究科・助教 (24506)	

	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
連携 研究者	神戸 大朋 (Kambe Taiho) (90303875)	京都大学・生命科学研究科・准教授 (14301)	

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	University of Maryland			
カナダ	University of British Columbia			