

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790264

研究課題名（和文） 活性酸素の生産と消去に関するミネラルトランスポーターの分子メカニズム

研究課題名（英文） Molecular mechanism of mineral transport related to cellular reactive oxygen species level

研究代表者

菊地 晶裕（KIKUCHI AKIHIRO）

金沢大学・医学系・博士研究員

研究者番号：90321752

研究成果の概要（和文）：

ミネラル（必須微量元素）は活性酸素の生産や消去と密接に関連する因子であり、それらの輸送メカニズムを分子レベルで解明することは、細胞内における活性酸素濃度の制御メカニズムを理解するために必須である。本研究では、X線吸収スペクトルを利用し、活性酸素の生産に関連する鉄トランスポーターの局所構造を解析する手法を確立した。さらに、活性酸素の消去に関連するセレンのトランスポーターであるセレノプロテインPをヒト血漿から高純度に精製し、その微結晶を得ることに成功した。今後の結晶構造解析によりセレンの輸送メカニズム解明が期待される。

研究成果の概要（英文）：

A fine-tuned balance between production and scavenging of reactive oxygen species (ROS) is crucial for living cells. Since minerals (essential trace elements) can be a factor in regulation of ROS level, mechanisms of mineral transport at molecular level are essential for understanding the tuning mechanism of the ROS level in living cells. In this study, techniques for analysis of local structure around mineral using X-ray absorption spectroscopy has been established. Also, micro crystals of selenoprotein P, a selenium transporter, have been obtained. Further crystallographic study will be contributed the finding of scavenging mechanism of ROS by selenium-sites in the protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：構造生命科学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：活性酸素、ミネラル、トランスポーター、X線吸収スペクトル、結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内に過度の活性酸素が生じるとDNAを損傷させたり、酸化ストレスを引き起こしたりすることにより、生活習慣病や癌などの病気を生み出す。その一方、微量な活性酸素は細胞内シグナルを伝えるために必須であることから、抗酸化サプリメントの大量服用が糖尿病リスクを高めること

も報告されるようになってきた。つまり、病気の予防や治療という観点からは、細胞内の活性酸素を適度に保つ必要がある。しかし、活性酸素の生産や消去に関する因子は細胞内に多く存在し、それらを1つのシステムとして統合的に理解するまでには至っていない。つまり、活性酸素を適度に保つメカニズムに関しては未だ不明な点が多い。ミネラル（必須微量元素）は活性酸素

の生産や消去と密接に関連する因子であり、それらの輸送メカニズムを分子レベルで解明することは、細胞内における活性酸素濃度の制御メカニズムを理解するために欠かすことが出来ない。

ミネラルの一つである鉄は、その酸化還元特性から細胞内で活性酸素を生じさせ得る。そのため、過剰な活性酸素が生じないように、通常、細胞内の鉄は遊離した状態ではなく、貯蔵タンパク質であるフェリチンに取り込まれたり、鉄含有タンパク質に取り込まれたりして存在している。後者の場合、取り込まれた鉄は活性中心として機能するが、多くの場合、ヘムや鉄-硫黄クラスターなどの形で活性中心を形成している。つまり、多くの鉄は目的タンパク質に運ばれる前に、ヘム合成系や鉄-硫黄クラスター合成系が存在するミトコンドリアの内部に取り込ませることになる。しかし、ミトコンドリアはエネルギー代謝に伴い、通常の場合にも細胞内における活性酸素の主要な生産場所となっており、仮に、必要量以上の鉄を取り込んでしまうと、大過剰な活性酸素が生じることになる。過剰な活性酸素が生産されれば、ミトコンドリア自体にも損傷を与えることになる。そのため、ミトコンドリアに取り込まれる鉄は厳密に制御されていることが示唆されてきた。近年、ミトコンドリア内膜から鉄のトランスポーターであるミトフェリンが見出され、鉄輸送能力の制御メカニズムが提唱されたが、分子レベルでのメカニズム解明には至っていない。

一方、セレンもミネラルの一つであるが、強い抗酸化作用を有するため、グルタチオンペルオキシダーゼに代表とされるような抗酸化機能を担うタンパク質ではセレンが利用されている。しかし、活性酸素の消去に必要なセレン輸送の制御メカニズムに関する研究は鉄のそれよりも遅れており、ほとんど未解明のままである。現在までに、血漿中に存在するセレン含有タンパク質であるセレノプロテインPが細胞にセレンを輸送するセレントランスポーターとして機能していることが見出されており、セレノプロテインPが欠乏すると細胞内においてもセレンが欠乏し、過剰な活性酸素の消去が出来なくなることが分かっている。一方、セレノプロテインPが過剰の存在する場合、それ自体が活性酸素の消去に関与することによりインスリン抵抗性を高めて糖尿病を促進させる因子と成り得る可能性も報告されるようになってきた。従って、必要量以

上の活性酸素を消去することなく、かつ、必須量のセレンは細胞に輸送されるようなメカニズムが存在しているはずである。

このように、ミネラルが活性酸素の生産や消去と密接に関連することは明らかであるが、そのミネラルの輸送メカニズム、特にその分子レベルにおけるメカニズムには依然として不明な点が多く残されており、活性酸素を適度に保つメカニズム解明にも至っていない。

## 2. 研究の目的

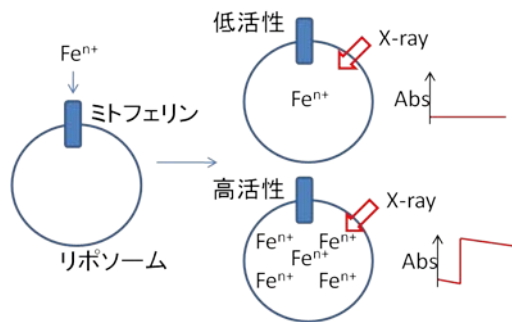
本研究は活性酸素の生産と消去のうち、一方が過剰になった場合、他方の輸送メカニズムにどのような変化をもたらすのか、など、細胞が活性酸素を適度に保つメカニズムの解明に発展させるために必要な基礎的知見を得ることを目指し、生産と消去の両面から構造生命科学的手法によりアプローチする。

具体的には、活性酸素の生産に関連するミネラルである鉄のトランスポーター（ミトフェリン）、および、消去に関連するミネラルであるセレンのトランスポーター（セレノプロテインP）の結晶構造解析およびX線吸収スペクトルによりそれらの立体構造を明らかにし、鉄およびセレンの輸送メカニズムを分子レベルで解明することが目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 鉄トランスポーター

本研究では鉄トランスポーターとしてミトフェリン (slc25a37) に着目する。ミトフェリンはミトコンドリア内膜に存在するslcトランスポーターの1つであり、他のタンパク質や基質と複合体を形成することにより鉄輸送能力が制御されていることが示唆されているが、その大量発現系は知られていない。そこで、ミトフェリンの大量発現系を大腸菌や無細胞系などで構築し、精製・結晶化条件のスクリーニングを行う。他のslcトランスポーターでは大腸菌において封入体として発現させ精製、その後、リボソームに再構成させることで鉄輸送機能の評価を行なっている報告がある。そこで、ミトフェリンも同様のストラテジーで発現・精製が期待されるが、リボソームで再構成したミトフェリンの機能評価にはマイクロビームを用いたX線吸収スペクトルによる新たな評価系を構築する（下図）。



X線吸収スペクトルは元素選択性が極めて高く、試料の状態も問わないため、リポソーム懸濁液のままでの測定も可能であるし、鉄を取り込ませた後、リポソームを分解し、そこから抽出したリポソーム内の溶液を用いて測定することも可能である。図に示すようにリポソームに再構成したミトフェリンに鉄輸送能が無ければリポソーム内に鉄は取り込まれず、X線吸収 (Fe K-edge) は観測されない。一方、輸送能が高ければリポソーム内に多くの鉄が取り込まれX線吸収が強く観測される。輸送能力の評価のみであれば、放射性同位体を用いても行うことは可能であるが、X線吸収スペクトルを用いた場合には、輸送能力の評価のみではなく、得られたスペクトル (XANESやEXAFS) を丁寧に解析することにより、ミトフェリンに結合している鉄周辺の局所構造情報を得ることも可能であり、輸送メカニズムの解明においては結晶構造解析と合わせて有用な手法である。X線吸収スペクトルの測定は大型放射光施設SPring-8を利用する。

(2) セレントランスポーター

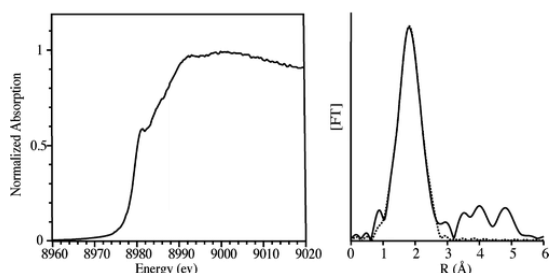
セレンのランスポーターであるセレンプロテインPには10残基のセレンシステインを含んでいるが、セレンシステインはストップコドンでコードされているため、既存のいかなる発現系を用いても組み換え体として得る事は極めて困難である。しかしながら、ヒト血漿からの精製法が既に報告されており (Saito *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **274**, 2866-2871 (1999))、それに基づき、さらに高純度な精製タンパク質を調製し、結晶化条件のスクリーニングを行う。得られた良質な結晶を用いて結晶構造解析を行い、構造に基づいた輸送メカニズムの議論を行う。

4. 研究成果

(1) 鉄ランスポーター

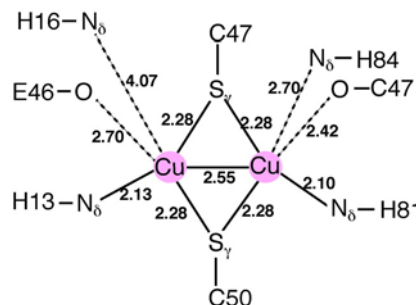
N末端側に FLAG タグを付加したミトフェリンの発現系構築を大腸菌により試みたが SDS-PAGE、FLAG タグ抗体による Western blot のいずれにおいてもミトフェリンに該当するバンドは見られなかった。そこで、膜タンパク質の大量発現に適していると言われているカイコバキュロウイルスによる発現を試みた。Western blot によりミトフェリンの発現は確認出来たが、そのほとんどは不溶性画分にあり、現在、可溶化やリポソームへの再構築条件を検討中である。

機能評価のための X線吸収スペクトルによる評価系は大型放射光施設 SPring-8 の BL01B1 において構築した。得られたスペクトルから局所構造の解析が可能であることは定性的な解析も行きやすい銅錯体や銅含有タンパク質を用いて確認した。例えば、4本鎖コイルドコイルタンパク質に銅イオンを添加して得られる紫色の銅タンパク質から下図のようなスペクトルを得た。



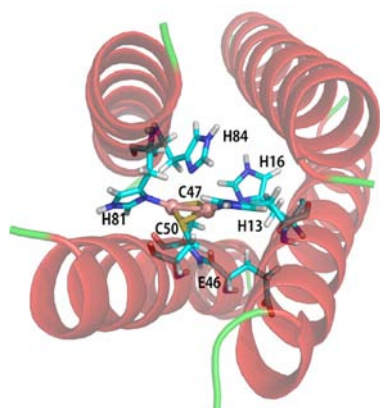
左：吸収端近傍のスペクトル (Cu K-edge XANES)、右：動径分布関数 (EXAFS) (Biochemistry, 2012)

吸収端近傍のスペクトル (Cu K-edge XANES) や、さらに高エネルギー側の振幅 (EXAFS) を解析することによりタンパク質に結合した銅周辺の局所構造を決定する事に成功した。その構造を下図に示すが、2つの銅イ



X線吸収スペクトル (EXAFS) 解析による銅周辺の局所構造。原子間の数字は結合距離 (Å) (Biochemistry, 2012)

オンが2つのシステイン側鎖によって架橋されたいわゆる”パープル銅”の構造であった。さらに、*in silico*において、この局所構造を保持した4本鎖コイルドコイル銅タンパク質のモデリングを行ったが、コイルドコイルの2次構造を崩壊させることなく銅タンパク質として存在し得ることが判明した(下図)。

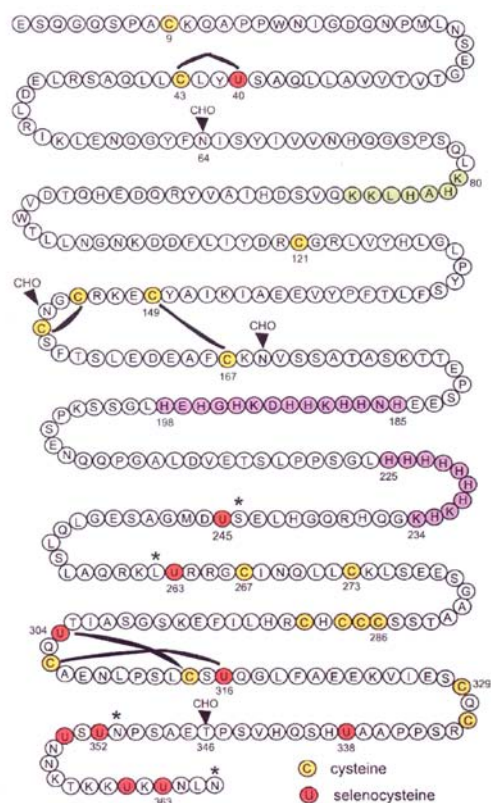


X線吸収スペクトルによる銅周辺の局所構造を反映したタンパク質全体の構造モデル (*Biochemistry*, 2012)

ミトフェリンの場合にも、この手法では鉄輸送能力の評価のみにとどまらず、鉄の濃度や時間などの鉄処理条件を検討する必要はあるが、ミトフェリンに結合した鉄周辺の局所構造を解析することにも期待が持てる。そして、結晶構造解析により得られるタンパク質全体の構造と相補的に利用することにより、鉄輸送のメカニズム解明の手掛かりを得ることが出来ると期待される。

## (2) セレントランスポーター

既報の方法によりヒト血漿からセレノプロテインPを精製したが、SDS-PAGEにおいて2本のバンドが検出され、また収量も著しく悪かった。ヒトセレノプロテインPにおいては血漿中に存在しているプロテアーゼにより切断されることが知られているため (Saito *et al.*, *Biochem. J.* 381, 841-846 (2004))、分子量の小さいバンドは全長セレノプロテインP (10残基のセレノシステインを含む) の分解生成物である可能性が考えられる(下図)。そこで、プロテアーゼ阻害剤をカラム精製の前処理段階から導入した。さらに、FPLCを用いてヘパリアフィニティーおよびイオン交換カラムを高分解能カラムに変更したところ、収量は改善し、SDS-PAGEにおいてもシングルバンドとして検出されるようになった。



ラットセレノプロテインPのアミノ酸配列。赤はセレノシステイン、CHOは糖鎖修飾サイト、\*のアミノ酸をC末とする分解物が存在することも知られている (Burk *et al.*, *Annu. Rev. Nutr.* 25, (2005))

この条件で精製したセレノプロテインPを用いて結晶化条件のスクリーニングを行ったが結晶を得ることは出来なかった。セレノプロテインPには糖鎖が修飾されており(上図)、その構造上の不均一性と高い運動性が結晶化を困難させている要因の1つであると考え、精製タンパク質を糖鎖切断酵素(N結合型糖鎖を切断するPNGase F)で処理し、糖鎖フリーの試料を用いて再度、結晶化条件のスクリーニングを行った。その結果、微結晶を得ることに成功した。しかし、10 μm以下とサイズは小さく、また、シーディング法によっても結晶が成長することは無かった。さらに、微結晶の再現性も著しく乏しかった。

良質の結晶を再現性良く得るためにはより均一な精製タンパク質にする必要がある。特に、糖鎖の切断により微結晶が得られ始めたことから、糖鎖切断の条件や切断後の精製条件を再検討することは必須であると思われる。また、N結合型糖鎖のみではなく、O結合型糖鎖の切断も必要であるのかもしれない。

さらに、セレノシステインはストップコドンでコードされているため、10残基のセレノシステインを含む全長セレノプロテ

インPを組み換えタンパク質として得ることは困難であるが、立体構造のみに着目するのであれば、セレノシステインをシステインで置き換えたDNAを合成し、組み換えシステイン変異体を用いた結晶構造解析を行うことは、輸送メカニズムを解明するために有用であると考えられる。

今後、ミトフェリンの可溶化・リボソームへの再構成条件の検討を行い、結晶化条件のスクリーニングと合わせてX線吸収スペクトルによる鉄周辺の局所構造解析を行う。また、セレノプロテインPの結晶構造解析を引き続き行う。得られたそれぞれの構造情報からミネラル輸送メカニズムを分子レベルで解明し、細胞内における活性酸素濃度を制御するメカニズムの手がかりとしたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Daigo Shiga, Yasuhiro Funahashi, Hideki Masuda, Akihiro Kikuchi, Masanori Noda, Susumu Uchiyama, Kiichi Fukui, Kenji Kanaori, Kunihiko Tajima, Yu Takano, Haruki Nakamura, Misato Kamei, and Toshiki Tanaka, Creation of a Binuclear Purple Copper Site within a de Novo Coiled-Coil Protein, *Biochemistry*, **51**, 7901-7907 (2012) 査読有  
DOI: 10.1021/bi3007884

[図書] (計1件)

大塩 寛紀(編著)、菊地 晶裕(共著)、三共出版、金属錯体の機器分析(下)、2012年、217頁~247頁

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

菊地 晶裕 (KIKUCHI AKIHIRO)  
金沢大学・医学系・博士研究員  
研究者番号: 90321752

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

該当なし