

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24687015

研究課題名(和文)ヒトの鉄イオン輸送システムの作動原理と生体内鉄動態の解明

研究課題名(英文)Structure and mechanism of the iron transport system in human

研究代表者

杉本 宏 (Sugimoto, Hiroshi)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・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) 21,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの十二指腸の細胞の刷子縁膜に発現している非ヘム鉄の輸送に関与する膜タンパク質の大量調製方法を確立し、機能・構造解析を行った。鉄還元酵素の反応の初期段階となるアスコルビン酸による酵素分子内のヘムの還元反応について、ストップフロー装置を用いて反応速度論的解析を行い、野生型と変異体の解析の比較によってアスコルビン酸結合部位を同定した。また、鉄還元酵素を脂質キュービック相(LCP)法によって結晶化を行い、X線結晶構造解析に成功した。

研究成果の概要(英文)：We performed the structural and functional analysis of transmembrane ferrireductase expressed in human duodenal brush border membrane. This enzyme contains two hemes as a cofactor to mediate the electron transfer from intracellular ascorbic acid (Asc) to ferric iron in the intestinal lumen. Our stopped-flow kinetic analysis of the ferrireductase and its mutants in the detergent solution suggested that the conserved positively charged residues are involved in Asc-binding. We obtained the crystals by the lipidic cubic phase method and determined the structure of ferrireductase.

研究分野：構造生物学

キーワード：金属タンパク質 鉄イオン

1. 研究開始当初の背景

人体では鉄が欠乏すると貧血や爪の変形など様々な臨床症状を引き起こすが、過剰な鉄も活性酸素の生成を介して肝臓、心臓、中枢神経などの障害を引き起こす。このため、生体内の鉄は厳密にコントロールされなければならない。我が国に多い慢性C型肝炎や肝臓がんは臓器に鉄の異常な蓄積が認められる。また、生体の鉄代謝制御機構の破綻による鉄過剰症は白人に高頻度(400人に1人)にみられる。ヒトの腸管上皮細胞では鉄の吸収と恒常性を維持するシステムが存在する。

図1に示すように、ヒトでは食物からの鉄イオンの吸収は十二指腸で行われる。鉄はまず、腸管の上皮細胞膜内にある duodenal cytochrome *b* (Dcytb) というヘム酵素によって Fe^{3+} から Fe^{2+} に還元される (McKie *et al.*, Science 2001)。還元された鉄は、膜内の二価金属輸送タンパク質 divalent metal iron transporter-1 (DMT-1) を介して腸管上皮細胞内に取り込まれる (Gunshin *et al.*, Nature 1997)。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) から供給される。本課題は、腸管上皮細胞で機能する膜タンパク質の機能構造解析により、生命が発達させてきた「鉄の取扱い方」の分子メカニズムに迫るものである。

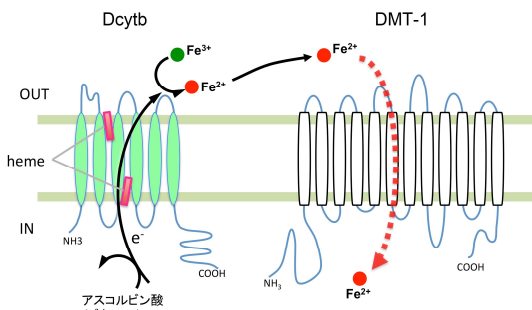


図1 Dcytbによって還元された鉄イオンがDMT-1によって膜輸送される

2. 研究の目的

ヒトでは血清中の鉄イオン濃度を維持するために中心的役割を果たしているのが、生体への入り口(腸管の上皮細胞膜)で食餌から鉄を取り込むインポーターと、細胞から血液に放出するエクスポーターである。奇妙なことに、鉄イオンはこの「取り込み→蓄積→放出」の過程でその価数を二価と三価の間で何度も変換しているが、その理由は不明である。本研究は、ヒトの鉄の輸送と酸化制御を担う膜タンパク質の結晶構造から鉄獲得の分子メカニズムを解明する。ヒトの鉄代謝の最初のステップは、Dcytbが細胞内のビタミンC(アスコルビン酸)を使って食餌中の鉄イオンを三価から二価に還元することであ

る。このような鉄の取り込みに関与するタンパク質の立体構造を決定し、他には見られない「膜タンパク質を縦断する電子移動」と鉄イオンの結合/解離のしくみを明らかにする。さらに、電子移動反応の解析を行う事で、複合体形成時に秩序ある電子の受け渡しがどのような酸化還元電位の制御でなされているのかなど、その構造的基盤を原子レベルで説明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) タンパク質発現方法

組換え体の調製は大腸菌の大量発現システムを用いた。コドンが大腸菌用に最適化した人工合成遺伝子を発現用ベクターに挿入した。発現するタンパク質にHis-tagとプロテアーゼ切断部位が付加するように設計を行った。このプラスミドでタンパク質発現用大腸菌を形質転換し、IPTGによって発現誘導を行った。大量培養後の菌体をプレンプレスによって破壊し、超遠心分離を用いて細胞膜画分を回収した。

(2) 精製

Dcytbは膜画分に含まれるため、界面活性剤を用いて脂質膜からの可溶化を行った。可溶化処理した溶液から不溶性成分を超遠心分離装置で沈殿させ、上清を界面活性剤存在下でNiアフィニティー樹脂に結合させた。低濃度のイミダゾールを含む緩衝液で洗浄後、高濃度のイミダゾールを含む緩衝液で目的タンパク質を溶出した。プロテアーゼを添加して約12時間反応させてタグを切断した。その後のタンパク質を再度Niアフィニティー樹脂にかけて素通り画分を回収した。タンパク質溶液を濃縮してゲル濾過カラムによる精製を行った。回収した各フラクションを再度濃縮して紫外可視吸収スペクトルを測定してタンパク質濃度の定量を行い、機能・構造解析のための標品とした。

(3) モノクローナル抗体との複合体調製

Dcytbとそのモノクローナル抗体フラグメントが結合した状態で結晶化する方法を検討した。膜タンパク質であるDcytbを可溶化するために加えている界面活性剤のミセルが結晶化の際に分子の相互作用を邪魔していることから、目的タンパク質と抗体フラグメントを結合させて親水性領域の表面積を広げることで結晶内のタンパク質分子間の相互作用を安定化し、X線回折分解能の向上が期待された。Anti-Dcytb IgGを含むマウス腹水からの抗体フラグメントの調製をプロテインAカラムによるアフィニティークロマトグラフィー、プロテアーゼによる抗体フラグメント化、陰イオン交換クロマトグラフィーの順でおこなった。その結果、純度の高い精製試料を得た。精製したDcytbと抗体フラグメントを混合してゲルろ過クロマトグ

ラフィーによって抗体結合能の評価を行った結果、両者が複合体を形成した状態で溶出されたことから、高い親和性があることが確認できた。

(4) 速度論的解析

Dcytb の吸収スペクトル変化を Stopped-Flow 装置 (UNISOKU 製) を用いて計測した。試料の嫌気状態を保持するため、リザーバーの表面に N_2 ガスを吹き付けながら測定を 20 で行い、スペクトルは Pseudo-Log sampling 機能を使って、反応開始直後の点を多く取れるようにし、60 秒間測定した。そして 5 回の測定の積算で得られたデータについて解析を行った。

(5) 結晶化と X 線回折データ収集

結晶形成時の分子パッキングに有利となるように、安定な構造を形成するタンパク質と融合して発現させたタンパク質や、モノクローナル抗体との複合体を調製して結晶化実験に利用した。また、結晶化は蒸気拡散法に加え、Lipidic cubic phase (LCP) 法を用いた。得られた結晶の X 線回折実験は SPring-8 の BL41XU および BL32XU で行った。

4. 研究成果

(1) ヒト由来膜内在型タンパク質の試料調製方法の確立

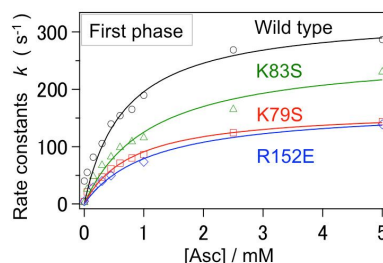
図 1 に示したように、Dcytb は 6 回膜貫通型のタンパク質 (286 残基) で、電子伝達を行うためのコファクターとして 2 つのヘムを結合していると予想されている。機能や構造の解析を行うためには大量の試料が必要であるが、従来報告されているような昆虫細胞を用いた発現方法では十分な量が得られない。本研究では遺伝子コドンの最適化、His タグの位置、発現用プラスミド、発現用大腸菌の種類、培養温度などの様々な条件の最適化を行うことで大量発現に成功した。界面活性剤による可溶化の条件や精製方法についても検討を重ねた結果、高い純度で精製することが可能となった。解析上有利な点は、Dcytb の酸化還元状態は、可視吸収スペクトルを測定することで簡便に評価できることである。この方法により本研究で用いた試料は昆虫細胞で発現させて精製した試料と同一の吸収スペクトルを示したことから、活性を保持していると考えられた。

Dcytb に加えてヒトの鉄イオンインポーター (DMT-1) が認識する金属イオンの配位子や周りの環境から二価イオン特異性の要因を明らかにすることを目的として、DMT-1 の試料調製方法の確立を試みたが、組換え体の調製実験が不調だったため、当初の計画どおり順調に実験が進んだ Dcytb の解析を優先して行った。

(2) 鉄還元酵素の速度論的解析

Dcytb の分子機能を解析するため、Stopped-Flow 装置を用いて Asc による Dcytb の還元反応を追跡して反応速度論的解析を行った。吸収スペクトルの時間変化を解析した結果、Dcytb の還元速度を 4 つの指数関数で近似できた。4 つの速度定数のうち最も早い反応は明瞭な Asc 濃度依存性を示したことから Asc の結合がこの反応の律速となっていると考えられた (図 2)。さらに、同じファミリーに属する植物由来の cytochrome b_{561} の立体構造とアミノ酸配列の保存性から Dcytb での Asc 結合に関わる残基を予測し、3 種類の変異体 (K79S, K83S, R152E) を作製した。それらの変異体の還元反応の測定の結果、解離定数および最大反応速度は変異によって大きく影響を受けたことから (図 2)、保存されたアミノ酸残基は Dcytb においても Asc 結合部位であることが示唆された。

野生型の Dcytb を円盤状の脂質二重膜であるナノディスクに再構成した状態でのヘムの酸化還元反応の速度を測定して速度定数を求めたところ、界面活性剤中での値とほぼ同じ値であった。この結果は界面活性剤中でも脂質中での活性を保持していることが推察される。



	K_s (mM)	k_{max} (s ⁻¹)
Wild type	0.68	330
K79S	0.81	170
K83S	1.1	270
R152E	1.1	170

図 2 アスコルビン酸による Dcytb 分子内のヘムの還元反応の速度論的解析

(3) X 線結晶構造解析

ヒト由来の鉄還元酵素 Dcytb の構造解析を目的として、タンパク質の精製・結晶化・データ収集を行った。蒸気拡散法によって得られた結晶 (図 3) は、分解能 11 Å 程度の反射しか得られなかった。そこで、回折分解能の向上のために、 T_4 ファージ由来リゾチームあるいは BRIL タンパク質との融合タンパク質を発現・精製し、結晶化作業を行ったが、蒸気拡散法では結晶は得られなかった。モノクローナル抗体フラグメントを利用した結晶化を実施したが期待した効果は得られなかった。しかし、脂質キュービックフェーズ法による結晶化を行った結果、5~10 ミクロンのサイズの微小結晶が得られた (図 3)。

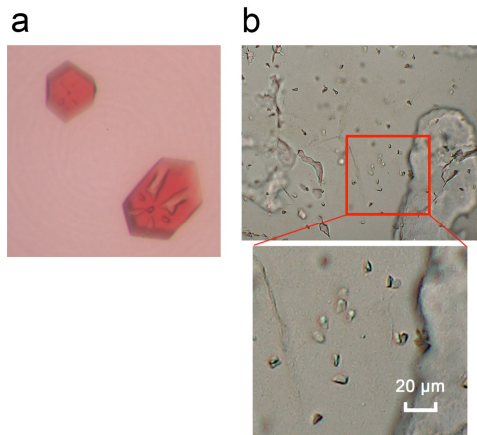


図3. Dcytbの結晶 (a) 蒸気拡散法 (b) LCP法によって得られた結晶の写真

放射光施設での実験において回折データの収集を行い、分解能 3.5 Å のデータセットの取得に成功した。結晶の非対称単位中にはモノマーが1分子含まれており、結晶学的な対称によって2量体を形成していた(図4)。モノマーあたり2分子のヘムがDcytb分子内部に結合しており、電子伝達の経路になっていると考えられる周辺の残基の立体配置を明らかにすることができた。Asc結合部位として予測して変異体解析の対象とした残基は予測通り分子表面に露出している。

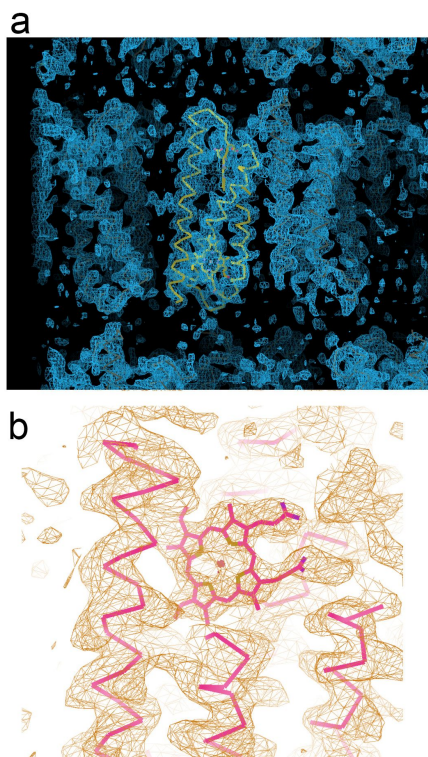


図4. Dcytbの構造解析によって得られた電子密度 (a) 結晶中の分子全体の電子密度と主鎖構造 (b) ヘム周辺の電子密度

Dcytbの結晶構造に基づいて補因子であるヘムを介した鉄イオンへの電子移動反応のメカニズムを明らかにするためには、基質との複合体の構造決定や分解能 2.5 Å 以上の解析が必要であると考えており、引き続き高分解能データを取得するために結晶の品質の向上を進めていく必要がある。しかしながら、本研究課題でおこなった機能・構造解析によりDcytbの分子構造解析が飛躍的に進展したとともに、補因子であるヘムを介した鉄イオンへの電子移動反応のメカニズムの一端を明らかにした。

(4) ヒトと病原菌の鉄の奪い合いの分子機構
病原微生物とその宿主であるヒトの間には必須栄養元素である鉄の争奪戦がくりひろげられている。その際の鍵となっている鉄の取り込みに関するタンパク質を分子レベルで理解するため、病原菌であるジフテリアでヘム鉄を感知する二成分情報伝達系のタンパク質や緑膿菌が細胞外のヘムを奪い取るために必要なタンパク質の解析も行い、結晶構造の報告を行った(文献1,2)。

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2件)

- (1) Doi, A., Nakamura, H., Shiro, Y., Sugimoto, H. "Structure of the response regulator ChrA in the haem-sensing two-component system of *Corynebacterium diphtheriae*". *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* 71, 966-971 (2015) doi: 10.1107/S2053230X15009838 査読あり
- (2) Shirataki, C., Shoji, O., Terada, M., Ozaki, S., Sugimoto, H., Shiro, Y., Watanabe, Y. "Inhibition of Heme Uptake in *Pseudomonas aeruginosa* by its Hemophore (HasA_p) Bound to Synthetic Metal Complexes". *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 2862-2866 (2014) doi: 10.1002/anie.201307889 査読あり

[学会発表](計12件)

- (1) Hanae Takeda, Hiromi Togashi, Tetsunari Kimura, Grant Mauk, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro "Stopped-flow kinetic analysis of human duodenal cytochrome b₅₆₁" International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), 2015年12月15-20日, ホノルル(アメリカ)
- (2) 冨樫ひろ美、武田英恵、木村哲就、Grant A. Mauk、杉本宏、城宜嗣 "ヒト由来Dcytbによる非ヘム鉄還元反応の速度論解析" 第88回日本生化学会大会, 2015年12月1-4日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
- (3) 冨樫ひろ美、武田英恵、木村哲就、Grant A. Mauk、杉本宏、城宜嗣 "ヒト由来鉄還

- 元酵素Dcytbの機能解析と結晶化”平成27年度日本結晶学会年会, 2015年10月17-18日, 大阪府立大学(大阪府堺市)
- (4) 武田英恵、富樫ひろ美、木村哲就、Grant Mauk、杉本宏、城宜嗣 “ヒト由来鉄還元酵素Dcytbの反応速度論解析” 第9回バイオ関連科学シンポジウム, 2015年9月10-12日, 熊本大学(熊本県熊本市)
- (5) 武田英恵、富樫ひろ美、木村哲就、Grant Mauk、杉本宏、城宜嗣 “ヒト由来鉄還元酵素DcytbのStopped-Flow法による機能解析” 第15回日本蛋白質科学会年会, 2015年6月24-26日, あわぎんホール(徳島県徳島市)
- (6) 富樫ひろ美、武田英恵、杉本 宏、G. Mauk、城 宜嗣, “ヒトの鉄吸収に關与する膜タンパク質Dcytbの結晶化と鉄還元反応に關する研究”, 第15回日本蛋白質科学会年会, 2015年6月24-26日, あわぎんホール(徳島県徳島市)
- (7) Hanae Takeda, Hiromi Togashi, Tetsunari Kimura, Grant A. Mauk, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro”Stopped-flow Analysis on the Reaction of Ascorbate with Duodenal Cytochrome *b₅₆₁*” Metals in Biology in Wako, 2015年6月16日, 理化学研究所(埼玉県和光市)
- (8) 富樫ひろ美、杉本 宏、G. Mauk、城 宜嗣, “鉄吸収に關与するヒト由来Cytochrome *b₅₆₁*の電子伝達機構の解明”, 第27回生物無機化学夏季セミナー, 2014年8月29-31, 円教寺会館(兵庫県姫路市)
- (9) 富樫ひろ美、杉本 宏、G. Mauk、城 宜嗣, “ヒト由来鉄還元タンパク質Dcytbの分子内電子移動反応に關する研究”, 第14回日本蛋白質科学会年会, 2014年6月25-27日, ワークピア横浜(神奈川県横浜市)
- (10) 富樫ひろ美、杉本 宏、G. Mauk、城 宜嗣, “ヒトの鉄吸収に關わる膜タンパク質Dcytbの電子伝達機構の解明”, 分子システム研究第3回春季研究会, 2014年4月24-25日, かんぼの宿彦根(滋賀県彦根市)
- (11) 富樫ひろ美、杉本 宏、Grant Mauk、城 宜嗣 “Transmembrane electron transfer by human duodenal cytochrome *b*” 第86回生化学大会 2013年9月11日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- (12) 富樫ひろ美、杉本 宏、Grant Mauk、城 宜嗣 “金属タンパク質の構造と機能” 分子システム研究 第2回春季研究会, 2013年6月7-8日, 御殿場高原ホテル(静岡県御殿場市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

<http://www.riken.jp/biometal/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本宏 (HIROSHI SUGIMOTO)

理化学研究所・放射光科学総合研究センター・専任研究員

研究者番号: 90344043

(2) 研究協力者

富樫 ひろ美 (Hiromi Togashi)

浦野 健 (Takeshi Urano)

八島 奈美 (Nami Yashima)

武田 英恵 (Hanae Takeda)

Grant A. Mauk