

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770121

研究課題名(和文)細胞内ヘム輸送メカニズムの解明

研究課題名(英文)molecular mechanism underlying intracellular heme transport

研究代表者

植田 亮(Ueta, Ryo)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：10445025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、真核生物におけるヘムの細胞内輸送メカニズムの理解を目指し、ヘムの輸送に関与する因子の同定と機能の解明を進めてきた。出芽酵母を用いてヘム輸送経路に異常のある変異株のスクリーニングを行い、機能未知の転写関連因子の変異株を取得した。野生株との比較による遺伝子発現解析により、この変異株においては、呼吸やミトコンドリアの関与する糖、脂質を始め様々な低分子の代謝に関連する多数の因子の発現変動が観察され、この転写関連因子はヘム輸送のみならず、ミトコンドリアの代謝の制御に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using *S. cerevisiae*, we performed the screening for mutants that are defective in intracellular heme trafficking, and isolated one mutant carrying mutation in a transcriptional regulator. In this mutant, the expression of many genes that are involved in respiration and metabolic pathways processed in mitochondria, suggesting that this transcriptional regulator controls not only heme trafficking, but also mitochondria-related metabolism.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ヘム 鉄 ミトコンドリア 出芽酵母

## 1. 研究開始当初の背景

鉄 - ポルフィリン錯体であるヘムは、酸素運搬・電子伝達・酸化還元反応を行う様々なタンパク質に結合して多彩な役割を果たしている。その重要性は古くから認識され、1950年代のヘムの生合成経路解明以降、多くのヘムタンパク質に関して生化学・分光学的な解析が行われてきた。近年もヘムが司る生理機能の多様性の理解は進展しており、鉄そのものではなく、鉄 - ポルフィリン錯体であるヘムを介した細胞の鉄代謝制御機構の存在も明らかになった。また、CO、NOなどのガスメディエーターをリガンドとしてガスセンサーとして機能するヘムタンパク質の同定も進み、ヘムが様々なシグナル伝達経路に関与することも判明している。

真核生物においてヘムはミトコンドリア内で生成されるが、細胞内のあらゆる箇所に存在する様々なヘムタンパク質に結合している。ヘムの物理化学的性質(脂溶性・反応性・非特異的結合性等)を考慮するとこの過程は単純拡散ではなく、ミトコンドリア外への搬出を担うトランスポーター、アポタンパク質への輸送を司るキャリアといった、ヘム輸送関連分子群の存在が予想されているが、その知見は非常に乏しい状況であった。

また、研究代表者が進めてきた出芽酵母の鉄濃度感知機構の研究結果などから、ヘムの合成の場であるミトコンドリアが細胞の鉄代謝調節において中心的な役割を担うことが予想されていた。

## 2. 研究の目的

出芽酵母の遺伝学的手法を用いて、細胞内ヘム輸送に関与する分子群を同定し、その機能を解明する。また、研究代表者が進めてきた出芽酵母の鉄濃度感知機構の解析を併せて進め、細胞の鉄代謝調節におけるヘムの役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) ヘム結合により機能制御を受けるミトコンドリア外タンパク質の機能を寒天培地上の生育で評価可能なレポーター出芽酵母を作成する。レポーター株に対して紫外線照射により変異を惹起し、変異出芽酵母ライブラリーを作出する。変異出芽酵母ライブラリーをレポーターアッセイ用寒天培地へ塗布し、当該ヘムタンパク質の機能が低下したものを単離するスクリーニングを実施する。

(2) 選別された変異株においては、ヘム合成、ミトコンドリア外への搬出を担うヘムトランスポーター、あるいは当該タンパク質へのヘム輸送を司るヘムキャリアの発現・機能が

低下した可能性が示唆される。出芽酵母の古典的遺伝学的解析及び遺伝子配列解析により、レポーター活性低下の責任遺伝子を探査する。ヘム合成に関わる既知遺伝子の変異株を除外し、レポーター株を元に候補遺伝子の破壊株、変異株を作製する。これら遺伝子破壊株、変異株におけるレポーター活性の低下を確認し、当該遺伝子の再導入を行い、責任遺伝子の確定を行う(レポーター活性の低下の責任遺伝子が全て劣性変異であったため)。出芽酵母のデータベースを活用し、遺伝子産物の配列、遺伝子配列、結合分子などの情報からその機能を予測する。

(3) 責任遺伝子産物の組換えタンパク質を大腸菌より精製し、吸収スペクトルを測定してヘム結合能を調べる。

(4) 野生型出芽酵母を元に遺伝子破壊株、変異株を作製し、細胞内のヘム量、その他のヘム結合タンパク質の活性低下の有無を調べ、細胞内ヘム動態の変化を解析する。また、網羅的な遺伝子発現解析を実施する。

## 4. 研究成果

(1) レポーター出芽酵母株、変異出芽酵母ライブラリーを作製し、レポーター活性の低下を示す変異株を13クローン単離した。

(2) 責任遺伝子を同定した結果、2クローンはレポーター活性の発現に必要な遺伝子に変異を有しており、細胞内ヘム輸送関連因子の変異株ではない可能性が示唆された。また、10クローンはヘム合成経路の3遺伝子(Aminolevulinatase dehydratase, Coproporphyrinogen III oxidase, Protoporphyrinogen oxidase)のいずれかに変異を有する変異株であった。残り1クローンの責任遺伝子は転写関連因子であった。この因子の細胞内ヘム輸送への関与は不明であったため、当該転写関連因子に着目して以降の研究を進めた。

(3) 大腸菌において当該遺伝子産物を発現・精製を行った。精製タンパク質に対してヘムを添加し、吸収スペクトルを測定したが、ヘムの結合を示唆するスペクトル変化は観察されなかった。このため、当該因子は直接ヘムを結合・輸送するヘムキャリアではない可能性が示唆された。

(4) 当該因子は必須因子であり、遺伝子破壊株を作製することはできなかった。このため、野生株の当該遺伝子に対して、(1)のスクリーニングで単離されたものと同変異を導入した株を作製した。この変異株における細胞内ヘム量は野生株に比ベ有意な変化は見られなかったが、ヘム前駆体であるポルフ

イルンの異常な蓄積が観察された。細胞内ヘム量の低下が見られないにもかかわらず、ヘム結合性タンパク質の活性が低下していたことから、この株においては合成されたヘムの細胞内輸送に欠陥がある可能性が示唆された。ポルフィリンの異常蓄積が見られたことはヘム合成の調節にも欠陥があることが示唆された。

当該因子が転写関連因子であることを鑑み、当該因子がヘム合成や輸送を転写の段階で制御する役割を予想し、網羅的な遺伝子発現解析を実施した。この変異株においては、呼吸やミトコンドリアの関与する糖、脂質を始め様々な低分子の代謝に関連する多数の因子の発現変動が観察され、この転写関連因子はヘム合成や輸送のみならず、ミトコンドリアの代謝の制御に関わる可能性が示唆された。

本研究により、細胞内ヘム輸送に欠陥があると考えられる変異出芽酵母が1クローン単離され、その責任遺伝子を同定することができた。責任遺伝子は転写調節因子をコードしており、精製タンパク質のヘム結合が検出できなかったことから、当該タンパク質自身がヘムトランスポーター、あるいはヘムキャリアである可能性は低いと予想される。本スクリーニングにおいてはヘムトランスポーター、キャリアの直接の同定を目指したより規模の大きなスクリーニングの実施を計画している。

一方、本研究により単離された転写関連因子の変異株においてはヘム輸送管レニン試の発現が低下していることが予想される。このため、実施した網羅的な遺伝子発現解析により、発現低下が観察された遺伝子に着目した、ヘム輸送関連因子の単離を目指す。ミトコンドリア局在の膜タンパク質を検索してヘムトランスポーター候補を、既知のヘム結合モチーフを持つ細胞質・核局在タンパク質を検索してヘムキャリア候補を選別し、遺伝子破壊・変異株を作製しヘム動態の異常を調べる。

また、当該変異株においては、ヘム前駆物質であるポルフィリンの異常な蓄積が観察された。本研究において実施した網羅的な遺伝子発現解析の結果、この変異株においては、呼吸や、ミトコンドリアの関与する様々な代謝経路の遺伝子発現の発現変動が観察され、当該転写調節因子が、ヘム輸送のみならず、ヘム合成を含めたミトコンドリアの関与する代謝の調節に深く関与する因子である可能性が予想される。遺伝子発現変動情報を用いたパスウェイ解析の実施により、この転写調節因子が制御する経路を検索し、様々な環境変化、ストレス応答時の遺伝子発現パターンとの比較を行い、この因子の生理的な機能を明らかにすることが今後の課題である

当該変異株、およびヘム合成関連因子の変

異株においては細胞の鉄濃度感知異常は観察されなかった。一方、ヘム同様ミトコンドリア内で合成される鉄硫黄クラスターの合成、輸送に関わる遺伝子の変異・欠損細胞においては細胞の鉄濃度感知が失われた。以上の結果より、出芽酵母における細胞の鉄濃度は、ミトコンドリアで生成される、ヘムではなく鉄硫黄クラスターの量を介して感知される可能性が示唆された。

鉄は我々にとって必須栄養素でありながら、過剰に存在するとフリーラジカルの産生源として毒性を示し、例えばパーキンソン病に代表される神経変性疾患やC型肝炎ウイルス発癌などと鉄代謝異常の関連が指摘されている。これら疾患におけるミトコンドリアの関わる鉄代謝異常を調べ、病態との関連、新たな治療・予防標的としての可能性を精査する必要がある。

## 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)

- (1) Ueta R., Fujiwara N, Iwai K, Yamaguchi-Iwai Y. Iron-induced dissociation of the Aft1p transcriptional regulator from target gene promoters is an initial event in iron-dependent gene suppression. *Mol Cell Biol.* 2012; 32 (24): 4998-5008. doi:10.1128/MCB.00726-12. peer reviewed

[学会発表](計0件)

[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]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
植田 亮 (UETA Ryo)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号: 10445025
- (2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし