

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：37122

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11133

研究課題名(和文) 鉄欠乏性貧血症に関わるタンパク質間相互作用ならびに亜鉛との関連性の解明

研究課題名(英文) A study of protein-protein interaction and its relationship with zinc in iron deficiency anemia

研究代表者

坂尻 徹也 (SAKAJIRI, Tetsuya)

九州栄養福祉大学・食物栄養学部・准教授

研究者番号：40412928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はセルロプラスミンからトランスフェリンへの鉄イオン移動に亜鉛イオンが必要なことを発見した。亜鉛欠乏状態になると生体内の鉄が利用しにくくなり、鉄欠乏性貧血になることが考えられる。本研究では鉄代謝経路にどのように亜鉛が関わるかについて解析するため、亜鉛結合セルロプラスミンとトランスフェリンの結合能を測定し、亜鉛セルロプラスミンの構造予測および亜鉛結合セルロプラスミンとトランスフェリンの複合体構造の予測を行った。その結果、亜鉛イオンがセルロプラスミンに結合し、亜鉛イオンが静電的な結合を助けることでセルロプラスミンとトランスフェリンが結合することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鉄欠乏貧血者の多くは亜鉛欠乏を併発していることが報告されている。しかしながら、鉄欠乏性貧血と亜鉛欠乏の関連性について分子レベルにおいてほとんどわかっていない。申請者らは、鉄代謝機構に亜鉛が直接関わることを発見しており、本研究の成果は、亜鉛欠乏性貧血の病因解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that many patients with iron deficiency anemia have concomitant zinc deficiency. We found that zinc ions are required for the transfer of iron ions from ceruloplasmin (Cp) to transferrin (Tf). Zinc deficiency may lead to iron deficiency anemia because iron is not readily available in the body. In this study, to analyze how zinc is involved in the iron metabolism pathway, the interaction of ceruloplasmin to transferrin, the structural prediction of zinc ceruloplasmin, and the complex structure of zinc-bound ceruloplasmin and transferrin were predicted. The results of this study are expected to lead to the elucidation of the etiology of zinc deficiency anemia.

研究分野：生化学

キーワード：トランスフェリン セルロプラスミン 鉄代謝 亜鉛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

潜在性鉄欠乏の有病率は世界人口の約 65%と WHO/UNICEF/UNU で共同報告されている。また亜鉛欠乏者は世界人口の約 25%と試算されている。鉄欠乏貧血者の多くは亜鉛欠乏を併発していることが報告されている。しかしながら、鉄欠乏性貧血と亜鉛欠乏の関連性について分子レベルにおいてほとんどわかっていない。

フリーの Fe()はフェントン反応により活性酸素を発生させる。また、フリーの Fe()は水に非常に不溶である。よって、セルロプラスミン (Cp) によって酸化された鉄がトランスフェリン (Tf) へ安全に運ばれるためには、Cp と Tf は直接結合していることが推測されるが、その結合はこれまで観測されていなかった。申請者は Zn(II)結合 Cp が Tf と直接結合することを表面プラズモン共鳴法 (SPR) と等温滴定型熱量測定 (ITC) により明らかにした。また、Zn(II)結合 Cp から Tf へ鉄を輸送したあと、鉄結合 Tf(Fe₂Tf)は Zn(II)Cp から外れることがわかった。これらの結果から、亜鉛の結合により Cp から Tf へ Fe()が安全に輸送することを解明した。また、Cp は細胞外への鉄放出に関わっており、マクロファージや腸管上皮細胞膜に存在する鉄放出タンパク質であるフェロポルチン(Fpn)から Fe()を受け取り酸化させ、Fe()を Tf へ受け渡す役割を担っていることが考えられている。実際、Cp が減少する銅欠乏症や無セルロプラスミン血症では肝臓や脾臓などに鉄が沈着する。しかしながら、in vitro で Fpn と Cp の結合は観測されていない。もし、この結合に亜鉛が関わっているならば、亜鉛は細胞外への鉄放出に関わっていることとなる。したがって、亜鉛欠乏症になると細胞内の貯蔵鉄が利用されにくくなり、赤血球などに含まれる機能鉄が減少する鉄欠乏性貧血になることが考えられる。

本研究では細胞外への鉄放出に関わるタンパク質間の相互作用解析とそこに亜鉛イオンが関わるかについて調べることで、亜鉛欠乏性貧血の解明を試みた。

2. 研究の目的

鉄欠乏性貧血者の多くは亜鉛欠乏を併発していることが報告されている。セルロプラスミン (Cp)からトランスフェリン (Tf)への鉄イオン移動に亜鉛イオンが必要なことを発見した。このことから亜鉛欠乏状態になると生体内の鉄が利用しにくくなり、鉄欠乏性貧血になることが考えられる。よって、本研究 では鉄代謝経路にどのように亜鉛が関わるかについて、さらに発展させる。具体的な計画として、亜鉛結合 Cp と Tf の複合体における結合サイトおよび構造解析、2. Cp から Tf への鉄イオンの移動経路の解明と亜鉛イオンとの関係性についての研究を行う。

3. 研究の方法

タンパク質 タンパク質間相互作用解析

ITC 解析: 熱量測定実験は MicroCal VP-ITC システム (Malvern Instruments, Malvern, UK) を用いて行った。16. 2μM の Cp と 91. 2μM の apo-Tf の溶液を、それぞれ 427μM と 3.30mM の Zn(II) で滴定した。16. 2μM の Cp と 91. 2μM の apo-Tf の溶液は、それぞれ 427μM と 3.30mM の Zn(II) で滴定し、11. 8μM の Cp と 12. 5μM の Zn(II)₃Cp の溶液は 150μM の apo-Tf で滴定し、11. 8μM の Cp と 12. 7μM の Zn(II)₃Cp の溶液は、それぞれ 150μM と 145μM の Fe(III)₂Tf で滴定した。すべてのタンパク質とイオンは、25 の生理塩水 (PSS) 緩衝液 (pH7.4) に溶解した。各滴定は、300 秒の間隔で 58 回の注入を行い、注入量は 5μL とした。溶液はセル内で 286rpm で攪拌した。Kd 値およびエンタルピー変化 (Hobs) は MicroCal Origin ソフトウェア (ver.7.0; Northampton, MA, USA) で提供されている Cp への Zn(II) の結合に対する結合部位モデル、または Tf への Zn(II)

の結合に対する逐次的な結合部位モデルを用いて、積分温度から計算した。実験は 25 で行った。

SPR 解析

BIACORE X システム (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) を用いて、Cp と Tf, Cp と金属イオンの結合に対する SPR 応答を評価した。Cp は、メーカーの指示に従い、アミノカップリングキット (GE ヘルスケア) を用いて、CM-5 センサーチップ上に 1,300 レスポンスユニット (RU) で固定化した。測定条件は、流速 20 μ L/min (PSS 緩衝液, pH7.4), 注入量 40 μ L, 温度 25 で行った。Apo-Tf, Fe(III)₂Tf, および金属イオンは、PSS ランニングバッファー (pH7.4) に溶解した。

亜鉛結合 Cp-Tf 複合体の分子モデリング

亜鉛結合 Cp および亜鉛結合 Cp-apoTf 複合体の構造モデルは、BIOVIA Discovery Studio 2021 を用いて構築した。複合体の構造モデルの構築には、BIOVIA Discovery Studio 2021 (Dassault Systems S.E.) を用いて構築しました。Cp と apoTf の結晶構造は、ヒト血清 Cp (PDB ID: 2J5W) とヒト血清 apoTf (PDB ID: 2HAV) をそれぞれ使用した。Cp の亜鉛イオンの結合部位については、Metallon Binding Site Prediction Method (<http://bioinfo.cmu.edu.tw/MIB/>) を用いた。モデル化された複合体構造は、分子動力学シミュレーションとエネルギー最小化により、エネルギー的に緩和された。エネルギー的に緩和された複合体構造は、分子動力学シミュレーションとエネルギー最小化 Insight II すべての相互作用と距離に依存する定数について、10Å のカットオフを用いて定数を設定した。

4. 研究成果

Zn(II) の非存在下では、ITC および SPR 測定において、Cp は apoTf または Fe(III)₂Tf と相互作用しないことが確認された (図 1)。SPR 実験では、センサーチップに固定化されたフローセルに Zn₂Tf を注入すると、濃度依存的に RU が上昇した (図 2)。Zn₂Tf 複合体の Zn(II) は Cp に移行しやすいため、apoTf は Zn(II) が結合した Cp に結合するのではないかと考えられた。この仮説は、ITC 分析の結果によって裏付けられた。Cp と Zn(II) の混合物 (Cp の濃度に対して 3 倍過剰) と apoTf を用いた熱量測定では、Zn(II) を結合した Cp と apoTf の間に相互作用が見られた [$K_d = 4.2 \pm 0.3 \mu$ M, $n = 0.64$ (Cp:apoTf = 1:0.64)] (図 3a)。しかし、Zn(II) が結合した Cp と Fe(III)₂Tf との相互作用はほとんど見られなかった (図 3b)。

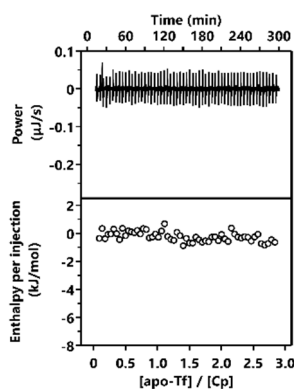


図 1. ITC による亜鉛非存在下における Cp と apoTf との相互作用解析

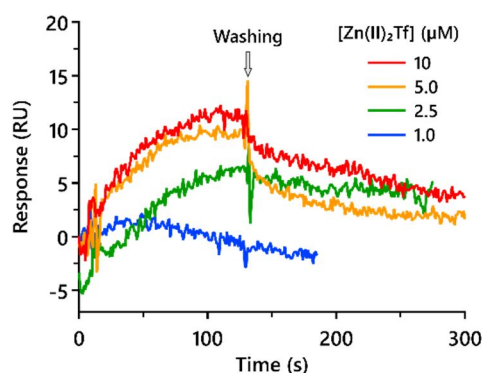


図 2. SPR による Cp と Zn₂Tf との相互作用解析

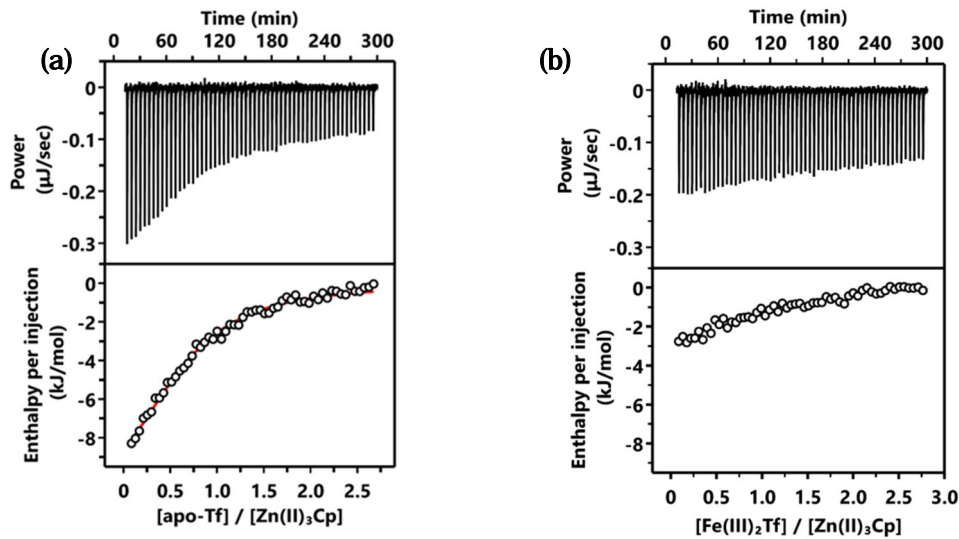


図 3. ITC による Zn(II)₃Cp と apoTf (a)および Fe(III)₂Tf (b)との相互作用解析

センサーチップに Cp を固定化したフローセルに Zn(II)を注入すると、わずかではあるが濃度依存的な RU の増加が見られ (図 4a), Cp への Zn(II)の結合がタンパク質のコンフォメーションを変化させたことが示された。さらに、他の金属イオン (Cu(II), Ni(II), Co(II), Mg(II), Ca(II), Al(III), Fe(II)) の Cp への結合についても調べた。これらの中では、Zn(II)が最も大きな RU の増加を示した (図 4b)。

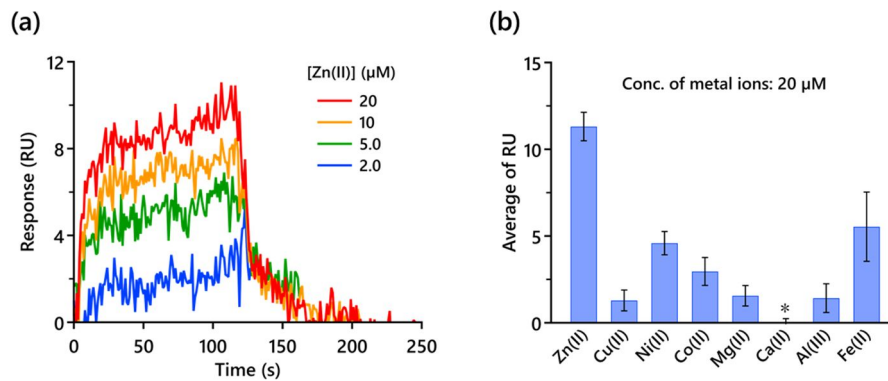


図 4. SPR による Cp と亜鉛イオン (a) および他の金属イオン (b)との相互作用解析

我々は、Zn 結合 Cp と apo-Tf のドッキングシミュレーションを行い、両者の相互作用の分子的詳細を調べた。Metal Ion Binding Site Prediction Method を用いて Cp 分子上の Zn(II)結合サイトを検索した。ITC 測定の結果、Cp は 3 つの亜鉛イオンと化学量論的に結合することがわかった。そこで、44 個の候補の中から、タンパク質の表面付近で有効性の高い 3 つの Zn(II)結合サイトを選択した。Tf の N1 サブドメインの先端にある Lys 280 は、Cp のドメイン 6 の Glu 931、Glu 932 と Cp のドメイン 2 の Asp 230 の間にドッキングする (図 5a)。Cp のドメイン 4 は、apo-Tf の N1 サブドメインと N2 サブドメインの間にある開いた裂け目にぴったりとはまる。apo-Tf の C2 サブドメインの先端にある Lys 552 は、Cp ドメイン 2 の Asp 233 と Cp ドメイン 4 の Glu 591 と Glu 593 に囲まれた凹部にぴったりと収まる (図 5b)。Cp ドメイン 6 は、apo-Tf の C1 サブドメインと C2 サブドメインの間の裂け目にちょうど収まる。Cp は、おそらく Zn(II)の介在に

より、N-lobe と C-lobe の両方に開いたクレフトを持つ apo-Tf と相互作用することができる。しかし、閉じたクレフトを持つ $\text{Fe(III)}_2\text{Tf}$ は、 Zn(II) が結合した Cp とドッキングすることはできないことが推察される。

まとめ

本研究では、分光光度計、ITC、SPR、ドッキングシミュレーションを用いて、特に Cp と Tf との相互作用を調べることにより、Cp から Tf への鉄の移動に亜鉛が関与していることを明らかにした。PSS 緩衝液中で Cp と Zn(II) を共存させると、 $\text{Fe(III)}_2\text{Tf}$ 複合体の形成が促進された。今後の研究として、Cp と Tf の複合体と鉄くみだしタンパク質であるフェロポルチンとの関係を明らかにするため、引き続き研究を継続させる予定である。

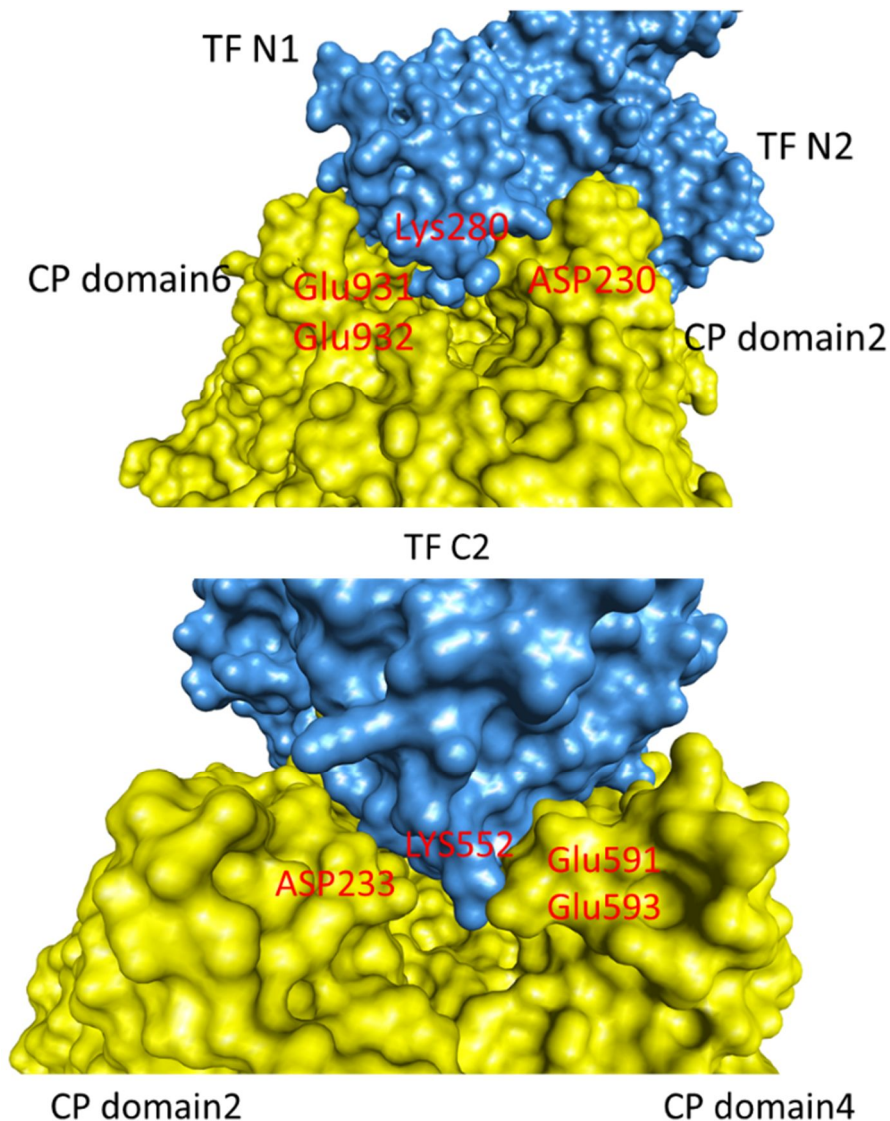


図 5. 分子モデリングによる亜鉛結合 Cp と Tf の複合体構造. (a) Tf-N lobe と Cp, (b) Tf-Clobe と Cp

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sakajiri Yuko, Sugano Eriko, Watanabe Yoshito, Sakajiri Tetsuya, Tabata Kitako, Kikuchi Takeshi, Tomita Hiroshi	4. 巻 503
2. 論文標題 Natronomonas pharaonis halorhodopsin Ser81 plays a role in maintaining chloride ions near the Schiff base	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 2326 ~ 2332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.06.156	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sakajiri T., Nakatsuji M., Teraoka Y., Ikuta K., Inui T., Yamamura T.
2. 発表標題 Zinc deficiency causes concurrently iron deficiency and production of non-transferrin-bound iron (NTBI)
3. 学会等名 8th Congress of the International Biolron Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山村 堯樹、坂尻 徹也、中辻 匡俊、寺岡 佳晃、古田 航祐、生田 克哉、洪佐 琴恵、菅野 江里子、富田 浩史、乾 隆
2. 発表標題 セルロプラスミン（Cp）への亜鉛の結合はCpとトランスフェリンとの結合を可能にする
3. 学会等名 第43回 日本鉄バイオサイエンス学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究分担者	生田 克哉 (IKUTA Katsuya) (00396376)	旭川医科大学・医学部・客員教授 (10107)	

6. 研究組織（つづき）

	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	乾 隆 (INUI Takashi) (80352912)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授 (24403)	

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