

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370040

研究課題名（和文）ヘムをシグナル伝達分子として機能する蛋白質制御系の構造化学的基盤

研究課題名（英文）Structural Characterization of Heme-mediated Signaling Mechanism in Protein Regulation System

研究代表者

石森 浩一郎（ISHIMORI KOICHIRO）

北海道大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：20192487

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヘムを制御因子として機能する Irr（Iron Response Regulator）と IRP（Iron Regulatory Protein）におけるヘム結合様式と、その結合したヘムによる機能発現機構について検討を行った。Irr においては、ヘム結合部位を分光学的に同定するとともに、そのヘムに蛋白質の酸化修飾機構を明らかにした。IRP についても、新たにヘム結合部位を同定し、その機能的意義についても明らかにすることができた。これらの結果は、細胞内におけるヘムの新たな機能を示唆している。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we characterized the heme binding in Iron Response Regulator (Irr) and Iron Regulatory Protein (IRP) and examined their functional significance. We spectroscopically identified the heme binding sites of Irr and, based on the structural information, a molecular mechanism of heme-induced oxidative modification in Irr was proposed. The heme binding sites of IRP were also determined and a new mechanism for the translational regulation by binding of heme was suggested in IRP. These new findings in this research project shed new light on the functional significance of heme *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：ヘム依存性制御蛋白質・酸化修飾・活性酸素・ヘム生合成・鉄代謝

## 1. 研究開始当初の背景

生体内においては種々の制御システムがその生命維持のために巧みに働いており、そこには多様な制御機構をもつ制御蛋白質が存

在している。このような制御蛋白質の多くはシグナル伝達分子の結合による構造変化を通して、その機能が制御されているが、近年、シグナル伝達分子が結合することで、制御蛋

白質自身が分解され、その分解を通して機能が制御される機構が見出された。さらに、これらの制御蛋白質は、従来、蛋白質の活性中心としての役割を果たすと考えられていた金属錯体であるヘムをそのシグナル伝達分子とすることが示唆されている。本申請者らは、ヘムが高等生物の鉄代謝制御蛋白質である Iron Regulatory Protein 2 (IRP2)の制御因子であることを世界に先駆けて分光学的に証明し、生物にとって必須の細胞内鉄イオンの恒常性維持には、ヘムがその鉄イオン濃度のシグナル伝達分子であること、さらに、ヘムを結合することで IRP2 は酸化活性を発現し、分子状酸素から活性酸素種を触媒的に産生することで、その活性酸素種が IRP2 自身を攻撃し酸化修飾することなどを明らかにした。さらに、バクテリアの蛋白質のヘム生合成制御蛋白質の Irr においても、本申請者らによって、IRP2 同様、ヘムが結合することによりそのペプチド鎖が酸化修飾され、最終的には蛋白質部分の分解によって標的 DNA に対する抑制的制御が解消されることにより、ヘム生合成が進行することを示してきた。つまり、いずれの制御蛋白質もシグナル伝達分子としてヘムを結合し、そのヘム鉄と分子状酸素を利用することで、自己酸化修飾反応を起こして自らの分解に至る「ヘム誘導自己酸化修飾」機能を持つことが明らかになった。このような機構は、ヘム鉄といった金属錯体が細胞内での種々のシグナル伝達的一端を担うとともに、ヘム鉄の酸化活性を巧妙に利用した新たな蛋白質制御機構を示しており、その分子機構の解明は多くの研究者が注目している。本申請者らの先駆的な研究の結果、いずれの蛋白質の場合も、そのヘムの結合を分光学的に確認することには成功したものの、ヘム結合後の自己酸化反応の分子機構に関しては十分解明できてはいない。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、新規蛋白質機能の制御メカニズムとしての「シグナル伝達分子としてのヘム」と「ヘム誘導自己酸化修飾」の分子機構とその生物学的意義を明らかにするため、自己分解を伴うヘム依存性制御蛋白質の構造化学的アプローチを試み、その構造化学的基盤を明らかにすることで、ヘムをシグナル伝達分子とした制御機構の分子論的解明を目的とする。そのため、ヘム誘導自己酸化修飾機能を有する蛋白質における、「ヘムの結合様式の解明」、「ヘム制御蛋白質の立体構造解析」、「ヘムの細胞内供給機構の解明」の3項目について実験を遂行する。

## 3. 研究の方法

本研究計画は研究目的に示した研究項目を遂行するため、紫外可視、共鳴ラマン測定等の種々の分光学的手法を駆使して、以下の実験を実施する。

- (1) 酸化修飾を受けていない Irr の単離精製法の確立
- (2) Irr, IRP2 におけるヘム結合部位の同定
- (3) Irr における酸化修飾部位と酸化活性種産生機構の検討
- (4) Irr における酸化修飾機構の解明
- (5) Irr へのヘム運搬蛋白質としてのフェロキラーターゼ (FC) との相互作用の解明
- (6) IRP における新たな機能発現機構の検討

## 4. 研究成果

(1) 酸化修飾を受けていない Irr の単離精製法の確立 Irr における酸化修飾部位と酸化活性種の同定には、酸化修飾を受けていない Irr 標品を用いる必要があるが、質量分析計を用いた詳細なペプチド分析から、大腸菌で発現させた Irr は既に菌内で酸化修飾を受け、

標品として単離精製したときには、その80%以上が酸化修飾された状態であることが明らかになった。そこで、培地として鉄を含まない最少培地を用いて大腸菌でIrrを発現させたところ、酸化修飾を受けた蛋白質は5%以下まで減少することが明らかになった。以下の本研究課題においては、本手法を用いてIrrを単離精製することで、酸化修飾を受けていないIrrを試料として、各種実験および測定を行った。

#### (2) Irr, IRP2 におけるヘム結合部位の同定

ヘムの生合成を制御する転写因子Irrや、細胞内の鉄代謝を制御するIRP2の制御機能発現に重要な自己酸化修飾の分子機構を解明するため、その酸化修飾反応の端緒となるヘムの結合部位の同定を試みた。まず、それぞれの蛋白質に対するヘムの結合当量を決定するため、紫外可視吸収スペクトルを用いた正確なヘムの滴定を行い、ヘムの結合当量数をIrrでは2、IRP2では3と決定することができた(図1)。これらのヘム結合部位につい

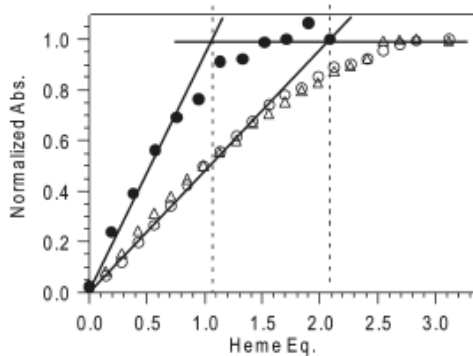


図1. Irr に対するヘム滴定。○, △は野生型で、それぞれ414 nm, 372 nmで追跡。●はC29A変異体で414 nmで追跡。

ては、Irr の場合、従来から想定されたようにヘム制御モチーフ(HRM)中のCys29の他、C末端側のHisクラスタ領域がヘム結合部位であると推定できた。一方、IRP2においては、ヘム依存性分解(IDD)ドメインのCys201の他にCys120とCys375へのヘムの結合が確認された。

#### (3) Irrにおける酸化修飾部位と酸化活性種産生機構の検討

Irrの酸化修飾における酸化活性種産生機構を検討するため、ヘムや無機鉄の存在下におけるIrrの酸化修飾反応を追跡した。その結果、ヘムの添加時にはIrrの酸化修飾反応は進行したが、無機鉄のみの添加では酸化修飾が進行しなかった。つまり、外部から加えた無機鉄はIrrに結合しない、あるいは結合しても活性酸素種の産生を触媒しないと考えられた。しかし、還元条件下でヘムは、分子状酸素と反応して過酸化水素を産生するものの、過酸化水素はアミノ酸を酸化修飾するほどの酸化力を示さない。一方、酸化修飾反応中の吸収スペクトルを追跡すると、ヘムの分解が確認され、Irrに結合したヘムの一部は分解し、蛋白質内部で無機鉄を放出することが示唆された。したがって、この無機鉄は外部から加えた無機鉄とは異なり、Irrと結合して過酸化水素とFenton反応を行うことが考えられ、その結果、酸化力の高いヒドロキシルラジカルが生成し、このヒドロキシルラジカルが蛋白質部分を酸化修飾すると結論付けられた。

#### (4) Irrにおける酸化修飾機構の解明

Irrの酸化修飾反応における酸化活性種の産生機構を明らかにするため、その産生部位と想定されるヘム制御モチーフ(HRM)部分へのヘム結合による酸化活性種の産生を検討した。IrrはHisクラスタ領域にもヘムを結合することが報告されており、さらにこの部位のヘム結合残基は同定されていないため、HRM部分にのみヘムを結合したIrr変異体を作成するのは困難であった。そこで、Irrと同じ蛋白質ファミリーに属し、配列相同性の高いものの、ヘムを結合しないことが報告されている酸化ストレスセンサー蛋白質PerRを用いて、PerRにHRMを導入することで、HRMにしかヘムを結合しないIrr様蛋白質、iPerRを作成

し、その酸化修飾反応を検討した。その結果、iPerRはIrr同様、ヘム依存的に酸化修飾反応が観測され、HRMに結合したヘムのみでIrrにおける酸化修飾反応は進行することが明らかになった。

(5) Irr へのヘム運搬蛋白質としてのフェロキラーターゼ (FC) との相互作用の解明 Irrではヘムの結合により酸化修飾反応が進行するが、細胞内では遊離のヘムはほとんど存在せず、何らかのヘム運搬蛋白質が Irr にヘムを供給すると推定される。このヘム運搬蛋白質として、ヘムの生合成の最終段階でポルフィリンに鉄イオンを挿入するフェロキラーターゼ (FC) に注目し、FC、無機鉄、ポルフィリン存在下で Irr の酸化修飾反応が進行するか検討した。その結果、FC、無機鉄、ポルフィリン存在下では Irr の酸化修飾反応が進行したが、FC 非存在下では酸化修飾反応は確認できず、FC によって生成したヘムが Irr を酸化修飾する、つまり、FC が Irr に対するヘム運搬蛋白質であることが示された。

(6) IRP における新たな機能発現機構の検討 これまでの本研究者らのゲルシフトアッセイの結果から、IRP へのヘム結合により、酸化修飾を経ることなく、その標的 RNA である IRE (Iron Response Element) への結合阻害が誘起されると示されてきたが、IRP の IRE に対する結合特性をより定量的に議論するために、精製した IRP に蛍光ラベルした IRE を用いてその結合を蛍光の偏光解消度から追跡し、IRP の IRE に対する親和性とそのヘムによる結合阻害を検討した。その結果、ヘムによって酸化修飾を受けない IRP1 の IRE 結合親和性は、ゲルシフトアッセイ法で想定されたよりはるかに弱いことが明らかになった。

## 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3件)

1. A Heme Degradation Enzyme, HutZ, from *Vibrio cholera*, Uchida, T., Sekine, Y., Matsui, T., Ikeda-Saito, M., Ishimori, K. (2012), *Chem. Comm.*, in press. 査読有
2. Unusual Heme Binding in the Bacterial Iron Response Regulator Protein (Irr): Spectral Characterization of Heme Binding to Heme Regulatory Motif, Ishikawa, H., Nakagaki, M., Bamba, A., Uchida, T., Hori, H., O'Brian, M. R., Iwai, K., Ishimori, K. (2011) *Biochemistry*, 50(6), 1016-1022. 査読有
3. Molecular Oxygen Regulates the Enzymatic Activity of a Heme-containing Diguanylate Cyclase (HemDGC) for the Synthesis of Cyclic di-GMP, Sawai, H., Yoshioka, S., Uchida, T., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Ishimori, K., Aono, S. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, 1804(1), 166-172. 査読有

[学会発表] (計3件)

(国際学会招待講演)

1. Oxygen Activation and Oxidative Modification in Heme-regulated Proteins, Ishimori, K., 14th Asian Chemical Congress, 2011/9/6, Queen Sirikit National Convention Center, タイ国, バンコク市
2. Oxidative modification and its functional significance in

heme-regulated protein, Ishimori, K.,  
Pacifichem 2010, 2010/12/15, ハワイコ  
ンベンションセンター, 米国, ホノルル市

3. Iron Response Regulator Protein Is a Self-oxidative Oxidase-transcription Factor: A Mechanism for Heme-mediated Self-oxidation, Ishimori, K., 14<sup>th</sup> International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC14), 2009/7/30, 名古屋国際会議場 (愛知県)

[図書] (計1件)

1. Heme binding characteristics of mouse PER1, a transcriptional regulatory factor associated with circadian rhythms, R. Nagata, M. Harada, K. Kitanishi, J. Igarashi, T. Uchida, K. Ishimori and T. Shimizu, *Circadian Rhythms: Biology, Cognition and Disorders*, Golovkin, L. and Maliszkewicz, A., eds, pp. 62-65, Nova Science Publishers, 東京 (2011).

[その他]

ホームページ:

<http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~stchem/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石森 浩一郎 (ISHIMORI KOICHIRO )  
北海道大学・大学院理学研究院・教授  
研究者番号: 20192487

### (2) 研究分担者

内田 毅 (UCHIDA TAKESHI )  
北海道大学・大学院理学研究院・助教  
研究者番号: 30343742

(3) 連携研究者 なし