

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871213

研究課題名(和文)ヘムシャペロンHRG-3による細胞間ヘム輸送の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of intercellular heme transport by a heme chaperon HRG-3

## 研究代表者

澤井 仁美(Sawai, Hitomi)

兵庫県立大学・生命理学研究科・助教

研究者番号：50584851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヘム(鉄ポルフィリン錯体)は、ほぼ全ての生物が生命維持に利用する化合物であるにも関わらず、その生体内輸送メカニズムは未解明であった。本研究では、線虫のヘム輸送に関わる新規な2種類のタンパク質HRG-3とHRG-4の調製法を確立し、各種分光測定や結晶化、ならびにヘム生合成欠損酵母を用いた機能解析を行うことにより、ヘム輸送メカニズムについて検討した。その結果、細胞間ヘムシャペロンと推定されたHRG-3は2量体あたり1分子のヘムを結合し6量体でヘムを輸送すること、腸管細胞の形質膜に局在するヘムトランスポーターHRG-4はポルフィリン環との相互作用によりヘムを輸送することなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Heme (iron-protoporphyrin IX) is one of the most important nutrition required in all organisms. Because animals utilize heme as iron source by food intake and biosynthesis/reuse in the body, it was previously thought that they are equipped with heme transport systems. However, no molecules apparently involved in heme transport have been identified, and heme dynamics in animals remained unclear.

Recently, the HRG proteins were identified as proteins related to heme dynamics by gene analyses of the metazoan *C. elegans*, which is a natural heme auxotroph. To investigate protein properties of HRG-3 and HRG-4, which were predicted as an intercellular heme chaperon and a heme importer, we established preparation protocols for these proteins, and characterized structural and functional properties. Based on the results, we revealed a dimer of HRG-3 bound one heme molecule, and the interaction between HRG-4 and protoporphyrin ring in heme was important for the heme trafficking mechanism.

研究分野：生物無機化学

キーワード：ヘム 輸送タンパク質 鉄栄養 構造機能解析

1. 研究開始当初の背景

ヘム (鉄ポルフィリン錯体) は、酸素の運搬貯蔵・酸化還元・異物代謝などの重要な生理機能を担うタンパク質の補欠分子として機能し、ほぼ全ての生物が生命維持に利用する化合物である。一方で、タンパク質に結合していない遊離ヘムは、活性酸素源であるだけでなく細胞膜を透過できずに細胞組織に沈着するため、酸化ダメージを誘起する「細胞毒」でもある。生物にとって、ヘムは「両刃の剣」のような化合物であるため、生体内にはヘムの濃度や酸化状態を厳密に制御するシステムが存在する。しかし、その制御に関与する遺伝子やタンパク質の同定が遅れており、詳細なメカニズムは未解明であった。

ヒトの場合、食餌・生合成・赤血球分解による再利用によりヘムを獲得することが明らかになっている。しかし、獲得したヘムが生体内でどのように輸送されるのかは不明瞭であり、生体内の鉄代謝に関わる疾病治療のためにも、そのメカニズムの解明が急がれる状況であった。

2. 研究の目的

本研究では、生体内におけるヘムの輸送メカニズムを原子・分子のレベルで解明することを目的として、ヘム輸送に関与する新規なタンパク質 Heme-responsive gene, proteins (HRG) (図 1) の構造機能解析に取り組んだ。

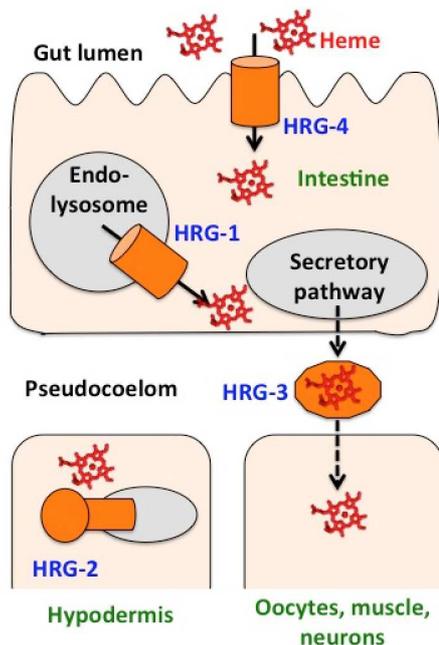


図 1. 線虫におけるヘム輸送の模式図

3. 研究の方法

ヘム栄養要求生物である線虫 *C. elegans* 由来の細胞間ヘム輸送タンパク質 HRG-3 と、腸管細胞の形質膜に局在し細胞内にヘムを輸送するヘムインポーターHRG-4 の高純度調製法を確立し、各種分光測定やX線結晶構造解析を目指した結晶化、ならびにヘム生合成

系欠損酵母を用いた機能解析を行った。

(1) HRG-3 の調製法

大腸菌を用いた一般的な方法で、組換え HRG-3 タンパク質を大量発現させると、タンパク質分解を受けたり、封入体として沈殿してしまう傾向がみられた。それを回避するために、インテインタグを付加した組換え HRG-3 タンパク質を大腸菌に発現させることにより、可溶性の HRG-3 タンパク質を大量に発現できるようにした。

組換え HRG-3 タンパク質は、インテインタグのアフィニティー精製後、還元剤を用いてタグを除去し、陰イオン交換クロマトグラフィーにより高純度に精製した。

このように調製した試料を生化学的実験や各種分光測定に用いた。

(2) HRG-4 の調製法

HRG-4 は後生動物由来の膜タンパク質であるため、大腸菌などのバクテリアを用いたタンパク質発現系では大量発現が困難であった。そこで、メタノール資化酵母 *P. pastoris* を宿主とした発現系を構築し、組換え HRG-4 の大量発現に成功した。その酵母の形質膜を単離し、それを界面活性剤で可溶化し、各種カラムクロマトグラフィーにより高純度に精製する方法を確立した。その際、高純度の HRG-4 を安定かつ大量に調製できる条件を検討するために、10 種類以上の界面活性剤や脂質の添加を試みた。その結果、ドデシルマルトシドとヘミコハク酸コレステリルの添加が、最も効果的であることがわかった。

このように調製した試料を結晶化や各種分光測定に用いた。

(3) ヘム生合成遺伝子欠損酵母を用いた機能解析

ヘム生合成遺伝子欠損酵母 *hem1Δ* (出芽酵母 *S. cerevisiae* の変異株) を用いた機能解析システムを構築した。ヘムやその類縁体を含む寒天培地での増殖を検討することにより、輸送能や輸送基質の特異性について検討した。

4. 研究成果

(1) HRG-3 の性質

組換え HRG-3 精製標品について、ヘム滴定実験を行った。ヘム濃度の増加に伴う変化 (図 2) から、2 分子の HRG-3 に 1 分子のヘムが結合することを明らかにした。

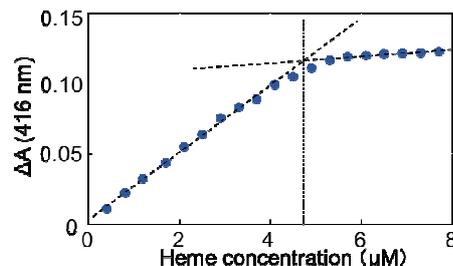


図 2. 10 μM HRG-3 に対してヘムを滴定した場合のヘムの吸光度変化

また、組換え HRG-3 精製標品の CD スペクト

ル測定により、ヘム結合／非結合に関わらず、HRG-3 は不規則構造を形成することが明らかになった。さらに、溶液中での会合状態を Blue-Native PAGE で検討した結果、組換え HRG-3 は 6 量体を形成していた。

これらの結果から、HRG-3 は細胞間隙で 6 量体を形成し、2 量体あたり 1 分子のヘムを結合した状態 (6 量体あたり 3 分子のヘムを結合) でヘムを輸送することが示唆された。

## (2) HRG-4 の性質

組換え HRG-4 精製標品はヘムを含んでいなかった。しかし、HRG-4 のアミノ酸配列上には、ヘムの配位子となりうるアミノ酸が存在していたため、組換え HRG-4 精製標品のヘム滴定実験を行ったが、ヘムの結合は見られなかった。また、ヘム生合成遺伝子欠損酵母を用いた機能解析により、HRG-4 はヘムだけでなく、プロトポルフィリンも輸送できることを見出した (図 3)。

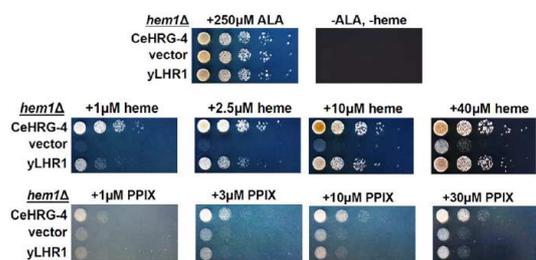


図 3. ヘム生合成遺伝子欠損酵母をもちいた増殖アッセイ

各写真の上段は CeHRG-4 を発現した酵母、中段は空ベクターを導入したコントロールの酵母、下段は CeHRG-4 のホモログタンパク質を発現した酵母。CeHRG-4 を発現した酵母は、ヘムやプロトポルフィリン (PPIX) の添加により増殖できるようになった。

これらの結果から、HRG-4 によるヘム輸送は、ヘムの中心鉄を認識するのではなく、ポルフィリン環との相互作用により進行することが示唆された。

さらに、原子レベルでのヘム輸送メカニズムを解明するに、HRG-4 精製標品の結晶化スクリーニングを行った結果、いくつかの条件で初期結晶を調製できた。今後、単結晶を調製するための条件検討を行い、X線結晶構造解析を進める予定である。

## 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 3 件)

- ① Y. Okamoto, H. Sawai, M. Ogura, T. Uchida, K. Ishimori, T. Hayashi, S. Aono, Heme-binding properties of HupD functioning as a substrate-binding protein in a heme-uptake ABC-transporter system in *Listeria monocytogenes*, Bulletin of the chemical society of Japan, 査読有、10 卷、

2014、1140-1146、

DOI: 10.1246/bcsj.20140166

- ② H. Tsujino, T. Yamashita, A. Nose, K. Kukino, H. Sawai, Y. Shiro, T. Uno, Disulfide bonds regulate binding of exogenous ligand to human cytoglobin, Journal of Inorganic Biochemistry, 査読有、135 巻、2014、20-27  
DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2014.02.011
- ③ 澤井 仁美、城 宜嗣、サイトグロビンの分子構造、月刊「細胞」、査読有、45 巻、2013、9-12  
[http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/archives/2013/11/201312\\_1.html](http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/archives/2013/11/201312_1.html)

[学会発表] (計 15 件)

- ① M. Ganasen, I. Hamza, Y. Shiro, H. Sawai, Characterization of CeHRG-4 as a novel heme transporter in animals, 2015 Leading program evaluation conference, 2016 年 3 月 14-15 日、Center for Advanced Science and Technology (兵庫県赤穂郡)
- ② M. Ganasen, I. Hamza, Y. Shiro, H. Sawai, Characterization of HRG protein as a novel heme transporter in animals, 3<sup>rd</sup> International Picobiology Institute Symposium, 2015 年 12 月 8-9 日、Center for Advanced Science and Technology (兵庫県赤穂郡)
- ③ M. Ganasen, I. Hamza, Y. Shiro, H. Sawai, Characterization of a novel heme transporter in animals, 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1-4 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ④ M. Ganasen, H. Sawai, I. Hamza, Y. Shiro, Characterization of a novel heme transporter in animals, Science and Business - 2<sup>nd</sup> Joint Symposium of UPM and UH, 2015 年 10 月 22-23 日、Center for Advanced Science and Technology (兵庫県赤穂郡)
- ⑤ 澤井 仁美、膜タンパク質が織り成す生体金属科学、1<sup>st</sup> Integrated Lipidology Meeting、2015 年 2 月 24-26 日、日本平ホテル (静岡県静岡市)
- ⑥ R. Yuki, H. Sawai, I. Hamza, Y. Shiro, Characterization of an intercellular heme carrier protein, HRG3, The Annual Evaluation Conference of the Leading Program, 2015 年 3 月 16-17 日、Center for Advanced Science and Technology (兵庫県赤穂郡)
- ⑦ M. Ganasen, H. Sawai, I. Hamza, Y. Shiro, Preparation of a novel protein involved in

heme transport in animals, The Annual Evaluation Conference of the Leading Program, 2015年3月16-17日、Center for Advanced Science and Technology (兵庫県赤穂郡)

研究者番号：

- ⑧ 澤井 仁美、真核生物におけるヘムの生体内動態の分子科学、「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)
- ⑨ 澤井 仁美、I. Hamza, 城 宜嗣、真核生物におけるヘムの生体内動態の分子科学、第6回日本生物物理学会中四国支部大会、2014年5月17-18日、とりぎん文化会館 (鳥取県鳥取市)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://proxy.sci.u-hyogo.ac.jp/life/regulation/research.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

澤井 仁美 (SAWAI, Hitomi)  
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・  
助教  
研究者番号：50584851

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )