

3A07

鉄制御蛋白質 IRP1 におけるシグナル伝達分子としてのヘムの配位環境

(北大・院総化¹, 京大・医², 北大・院理³)

○ 小倉 麻梨子¹, 武田 有紀子², 内田 毅^{1,3}, 岩井 一宏², 石森 浩一郎^{1,3}

Structural characterization of heme binding as a signaling molecule for Iron Regulatory Protein 1

(Grad. Sch. of Chem. Sci. and Eng., Hokkaido Univ.¹, Fac. of Med., Kyoto Univ.², Fac. of Sci., Hokkaido Univ.³)

○ OGURA Mariko¹, TAKEDA Yukiko², UCHIDA Takeshi^{1,3}, IWAI Kazuhiro², ISHIMORI Koichiro^{1,3}

【序】

鉄は、生体内でヘモグロビンによる酸素運搬やリボヌクレオチド還元酵素による DNA 合成など、さまざまな反応の活性中心として機能している重要な元素である。したがって、鉄不足は鉄欠乏性貧血など生体内の機能低下を招く恐れがある一方で、鉄は酸素と反応して活性酸素を産生するため、過剰な鉄は活性酸素による DNA やタンパク質の損傷を引き起こす恐れがある。そこで、哺乳類には鉄制御蛋白質 Iron Regulatory Proteins (IRPs)が存在し、これらの IRPs は、鉄不足時の鉄の取り込みや、鉄過剰時の鉄の貯蔵などに関連している鉄代謝タンパク質の mRNA と鉄濃度に応じて結合することで、そのタンパク質の量を翻訳レベルで制御し、細胞内鉄濃度を制御している。この鉄濃度制御機構の破綻は、肝硬変や神経変性症などの疾患との関連が示唆されているため、より詳細な鉄濃度制御機構の解明が求められているが、その制御機構で鍵となる細胞内での鉄濃度シグナル伝達分子については十分検討されてはいない。

これまで、そのアミノ酸配列の解析から、IRPs はシグナル伝達分子としてヘムを利用しているタンパク質に共通するヘム結合領域「Heme Regulatory Motif (HRM)」を有していることが示され⁽¹⁾、また、これまで我々の研究結果より IRPs の一つである IRP1 にヘムを添加すると、IRP1 と mRNA の結合が阻害されたことから、ヘムが細胞内の鉄濃度シグナル伝達分子として機能していることが示唆されている。しかし、IRP1 におけるヘム結合部位やそのヘム配位環境については十分な構造化学的知見が得られておらず、IRP1 におけるシグナル伝達分子としてのヘム結合の機能的、構造的意義は不明である。そこで、本研究では IRP1 のヘム結合部位とその配位環境を明らかにすることで、細胞内鉄濃度のシグナル伝達分子としてのヘムの IRP1 への結合の構造化学的意義を検討した。

【結果と考察】

IRP1 におけるヘムの結合を分光学的に確認するため、ヘム結合による紫外可視吸収スペクトル変化を追跡したところ、ヘムを添加するに伴い 370 nm と 421 nm をピークとして吸光度が増大した (図 1)。さらに、421 nm の吸光度に対する 370 nm の吸光度の比は添加するヘムの量が増えるにしたがい増大したことから、421 nm にピークを示すヘム結合部位の方が高い親和性を有し、IRP1 は親和性の異なった 2 つのヘム結合部位を

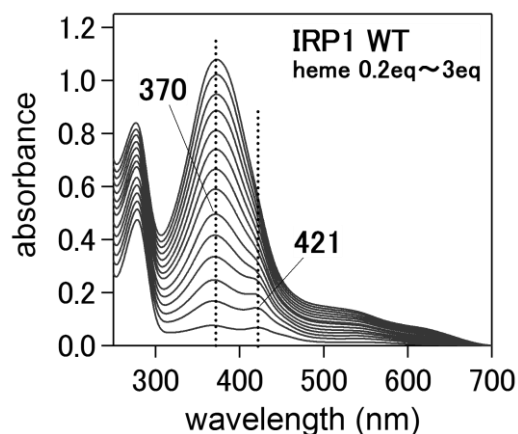


図 1. IRP1 の紫外可視吸収スペクトル

もつことが明らかになった。

このように IRP1 に結合するヘムは、その HRM 部位の Cys 残基を配位子として結合することが想定されるため、ヘム鉄とその配位子の Cys の伸縮振動を検出することができる共鳴ラマン分光法を用いてヘム配位構造の検討を行った。その結果、これまでの Cys を配位子とするヘムタンパク質と同様に、ヘムを添加した IRP1 では 330 cm^{-1} 付近に幅広なラマン線が観測された(図 1 中の実線)。このラマン線はこれまで報告されている Fe-Cys 伸縮振動のラマン線よりも低波数側であり、さらに半値幅も大きいことから、ポルフィリンの振動モードと重なっている可能性が考えられた。そこで、このラマン線を波数分解すると、 331 cm^{-1} と 345 cm^{-1} にピークを持つバンドが検出され(図 1 中の点線)、このうち 331 cm^{-1} にピークを示すラマン線は、ヘム鉄の質量数を ^{56}Fe から ^{54}Fe に変化させることにより、そのピークが 333 cm^{-1} へシフトした(図 1)。この差はヘム鉄の同位体シフトの差の計算値 2 cm^{-1} と一致することから、 331 cm^{-1} はヘムの軸配位子由来のピークである Fe-Cys 振動モードであると帰属でき、IRP1 に結合したヘムは Cys を配位子としていることが分光学的にも示された。

以上の結果より、IRP1 は親和性の異なる 2 つの Cys をヘムの配位子とする HRM を有することが明らかになった。IRP1 の立体構造をもとにこれらのヘム結合 HRM の構造的特徴を検討すると、IRP1 は 2 つの HRM 中の Cys 残基のうち ^{118}Cys は周囲に立体障害の少ないタンパク質表面に位置するのに対し、もう一方の ^{300}Cys はタンパク質内部の mRNA 結合部位に位置しており、ヘムのような分子が結合するためには大きな構造変化が必要と考えられる。したがって、IRP1 においては、まず親和性の高い ^{118}Cys にヘムが結合し、このヘム結合によって mRNA 結合部位近傍にある ^{300}Cys に構造変化が誘起され、その結果ヘムが ^{300}Cys に結合することで、IRP1 は mRNA を解離するという機構が提案できる(図 3)。

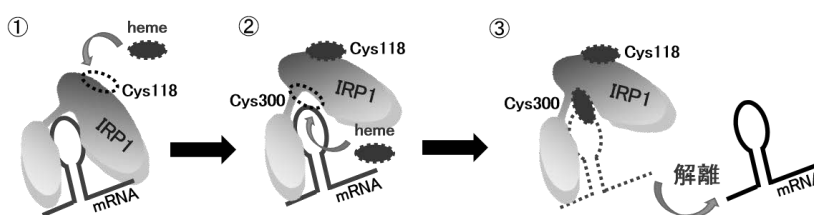


図 3. ヘムによる IRP1-mRNA 複合体解離機構

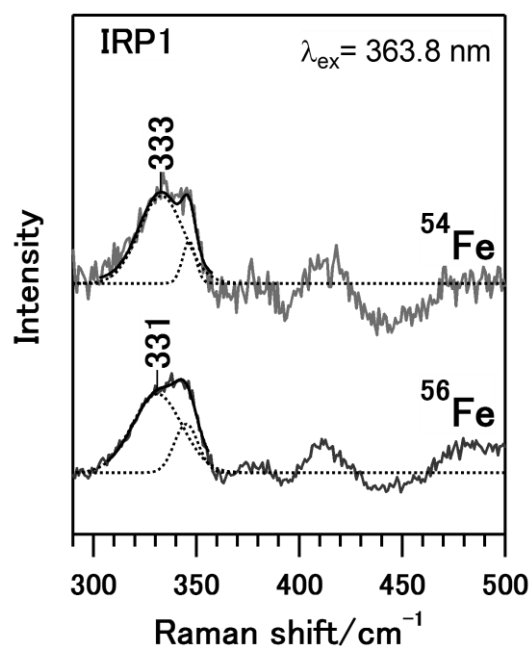


図 2. IRP1 の共鳴ラマンスペクトル(低波数領域)

【参考文献】

1. Chen, et al., *PNAS*, **1991**, 88, 315