

(研究題目) エンドサイトーシスを介する鉄輸送の調節機構の解明

Regulation mechanism of the transport of iron mediated by endocytosis

(代表研究者) 竹谷 茂 関西医科大学・衛生学・講師

Sigeru Taketani, Lecturer, Hygienics, Kansai Medical Univ.

(協同研究者) 古川 高子 (Takako Furukawa) 関西医科大学・衛生学・助手

山本 章嗣 (Shoji Yamamoto) 関西医科大学・第一生理学・講師

徳永 力雄 (Rikio Tokunaga) 関西医科大学・衛生学・教授

### (1) Summary

To clarify the mechanism of intracellular transport of iron, an iron-binding protein was purified from rat liver microsomes. The physicochemical properties of the protein revealed it as ribosomal protein P2. Transferrin-iron was incorporated into ribosomes and ribosomal protein P2 with time- and dose-dependent. Iron containing-mitochondrial coproporphyrinogen oxidase was also cloned.

### (2) 研究経過

#### 2-1 研究目的

トランスフェリン鉄およびヘムは細胞外からエンドサイトーシスを介して細胞内へ取り込まれることが知られているが、鉄イオンの細胞内利用に至るまでの過程については全く不明である。これらの機構を明らかにするために、まず我々は、ラット肝臓から鉄結合蛋白質を分離した。単離した蛋白質は、今まで知られている鉄結合蛋白質とは異なっており、細胞増殖およびヘム合成への鉄利用に何らかの役割を果していると考えられた。そこで、本蛋白質の鉄輸送における機能の解明を第一の目的とした。また、ヘム鉄の細胞内利用を明らかにする目的でヘモグロビン-ハプトグロビン複合体への肝細胞の受容体を介する取り込み機構の解明ならびに受容体の単離を試みる。その他、細胞内でのヘム輸送や鉄イオンの細胞増殖への利用機構についても併せて明らかにする。

## 2-2 研究経過および成果

1. 鉄結合蛋白質については、ウサギ抗体を調製し、細胞内分布を調べた結果、本蛋白質はミクロソーム画分に局在することがわかった。また、金コロイド法を用いて、免疫電顕法で本蛋白質の肝細胞内における分布を調べた結果、滑面小胞体に主に分布した。ラット肝ガン細胞を用いて標識鉄-クエン酸とインキュベートすると40%の鉄が細胞内へ取り込まれ、その6~7%の鉄が鉄結合蛋白質に取り込まれた。さらに、同様の実験を標識鉄トランスフェリンを用いて行なった結果、取り込まれた鉄の4~7%が本蛋白質に取り込まれており、細胞内で鉄結合能を有することがわかった。本蛋白質の組織分布を調べた結果、本蛋白質は種々の組織に分布するが特に増殖の盛んな細胞に多く、増殖する細胞が鉄イオンを多く必要とすることとよく一致した。
2. 本蛋白質のmRNAおよび遺伝子の構造を明らかにする目的で本蛋白質をトリプシンで処理し、マッピングを行なった後、部分アミノ酸配列を決定した結果、リボソーム蛋白質P2の一部と同一であることがわかった。そこで抗P2モノクローナル抗体を得て、本蛋白質との反応性を調べた結果、鉄結合蛋白質とリボソーム蛋白質は同一であることがわかった。そこでラット肝ガン細胞を標識鉄でラベルし、抗P2抗体を用いてリボソーム蛋白質P2を単離した結果、細胞内へ取り込まれた鉄の5~8%がP2に結合した。抗鉄結合蛋白質抗体と抗リボソーム蛋白質P2による反応性はImmunoblotsでは同じであるが免疫沈澱法では抗リボソームP2モノクローナル抗体ではP2(14kDa)を含む全リボソーム蛋白質が検出されるが抗鉄結合蛋白質抗体では13.5kDa蛋白質のみが検出され、両抗体による認識機構が異なり、リボソーム蛋白質P2は鉄結合能力を有する細胞内移動蛋白質である可能性があり、鉄輸送へのリボソームの関与が示唆された。
3. 細胞へのトランスフェリン鉄供給とDNA合成の関係を調べるために鉄キレーターであるデスフェロキサミンで細胞を処理した結果、DNA合成の低下が認められ、この時鉄含有酵素であるリボヌクレオチド還元酵素(RR)の低下はDNA合成の低下にさきがけて起こった。また抗トランスフェリンレセプター抗体で細胞を処理すると鉄の細胞への低下、RRの低下およびDNA合成の低下が認められたが、この低下は無機鉄の添加によって回復した。従って、トランスフェリン鉄から細胞内へ取り込まれた鉄はRRの調節を介してDNA合成に関与することが強く示唆された。
4. ヒト肝ガン細胞(HepG2、Alexander)にはハプトグロビンレセプターが存在し、その数はヒト肝初代培養細胞の約半分であることがわかった。ハプトグロビン-ヘモグロビン複合体はレセプターを介してエンドサイトーシスによって取り込まれヘモグロビン-ヘ

ムは分解され、ヘムはミクロソームに局在するヘムオキシゲナーゼによって鉄に分解され再利用されることがわかった。レセプターはリガンドの添加によって顕著な Down Regulation を受けることからレセプターのリサイクリングは起こらないと考えられた。細胞を鉄のキレーターであるデスフェロキサミン、インターロイキン1および6で処理してもハプトグロビンレセプター量はほとんど変化しなかった。

5. ミトコンドリア内の鉄含有酵素であるコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼはミトコンドリア内における鉄分子の受容蛋白質のひとつである。赤血球分化時のミトコンドリア内ヘム合成の誘導と本酵素の関係をcDNAを単離したのち、遺伝子発現誘導で明らかにした。さらにヒト本酵素のcDNAの構造を明らかにし、リコンビナント酵素を大量に発現させ鉄供給との関係を明らかにした。
6. ヒトのヘム合成酵素を大腸菌内で大量発現し、精製した後、諸性質を調べた。その結果、動物の本酵素はヘム鉄クラスターを含む鉄含有蛋白質であることが明らかになった。さらに基質である鉄の本酵素の結合部位が263番目のヒスチジン残基であることを人工変異酵素を作製して明らかにした。
7. Peripheral-type benzodiazepine 受容体はポルフィリンの輸送に関与することが考えられていたので、本受容体の赤血球分化時の動態を調べた。その結果、分化に伴い著しく誘導されることがわかった。さらに本受容体はポルフィリンのみならずヘムに対しても親和性があり、鉄イオンのミトコンドリア内への取り込みとヘムおよびポルフィリンの結合が協調していることがわかり、本受容体はヘム、ポルフィリンおよび鉄イオンのミトコンドリアの出入りを調節する因子であることが明らかになった。本受容体は Porinと結合していることから、イオン輸送とヘム輸送は区別できると考えられる。

## 2 - 3 発表論文リスト

1. Ribosomal Protein P2. A Novel Iron-binding Protein  
T. Furukawa, T. Uchiumi, R. Tokunaga and S. Taketani  
(1992) Arch. Biochem. Biophys. 298, 182-186
2. Iron-Deprivation Decreases Ribonucleotide Reductase Activity and DNA Synthesis  
T. Furukawa, Y. Naitoh, H. Kohno, R. Tokunaga and S. Taketani  
(1992) Life Sci. 50, 2059-2065
3. The Effect of Lead on Iron Uptake from Transferrin in Human Erythroleukemia (K562) Cells  
H. Kohno, S. Taketani and R. Tokunaga (1993) BioMetals 6, 77-83
4. Coproporphyrinogen Oxidase, Purification, Molecular Cloning and Induction of mRNA during Erythroid Differentiation  
H. Kohno, T. Furukawa, T. Yoshinaga, R. Tokunaga and S. Taketani  
(1993) J. Biol. Chem. 268, 21359-21363
5. Molecular Cloning, Sequencing and Expression of cDNA Encoding Human Coproporphyrinogen Oxidase  
S. Taketani, H. Kohno, T. Furukawa, T. Yoshinaga and R. Tokunaga  
(1994) Biochim. Biophys. Acta 1183, 547-549
6. Induction of Peripheral-type Benzodiazepine Receptors during Differentiation of Mouse Erythroleukemia Cells. A Possible Involvement of these Receptors in Heme Biosynthesis  
S. Taketani, H. Kohno, M. Okuda, T. Furukawa and R. Tokunaga  
(1994) J. Biol. Chem. 269, 7527-7531
7. Overexpression in Escherichia. coli. and One-step Purification of the Human Recombinant Ferrochelatase  
M. Okuda, H. Kohno, T. Furukawa, R. Tokunaga and S. Taketani  
(1994) Biochim. Biophys. Acta in press
8. Site-directed Mutagenesis of Human Ferrochelatase. Identification of Histidine 263 as Binding Site for Metal Ions  
H. Kohno, M. Okuda, T. Furukawa, R. Tokunaga and S. Taketani  
(1994) Biochim. Biophys. Acta in press