鉄以外の金属も Iron Regulatory Protein と結合し、その機能に影響を与える

野沢浩司,^{a,b} 堀 誠,^b 北嶋繁孝,^a 大城 聡*,^a

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・遺伝疾患研究部門

遺伝生化学,^a 昭和薬科大学学生化学教室^b

Non-iron Metals Bind with Iron Regulatory Protein to Influence Its Function

Koji Nozawa,^{a,b} Makoto Hori,^b Shigetaka Kitajima,^a and Satoru Oshiro*,^a

^aDepartment of Biochemical Genetics, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan and ^bDepartment of Biochemistry, Showa College of Pharmaceutical Sciences, 3-3165 Higashi-Tamagawa-Gakuen, Machida 194-0042, Japan

(Received January 20, 1999; Accepted March 26, 1999)

An iron regulatory protein (IRP) is an RNA-binding protein that regulates the expression of several mRNAs such as transferrin receptor (Tf-Rc) and ferritin mRNAs in response to the availability of cellular iron (Fe). IRP interacts with the iron-responsive element (IRE) in both of mRNAs to regulate the life span and to modulate the translation rate of ferritin. IRP was also identified as cytosol aconitase. We previously demonstrated that aluminum (Al) as well as Fe decrease the expression of Tf-Rc mRNA in rat cortical cells treated with Al- and Fe-nitrilotriacetate. In this study, we examined the effect of non-Fe metals on IRP using gel shift and the enzyme assays. IRE was transcriptionally synthesized *in vitro* and IRP purified from the beef liver. Non-Fe metals including mercury, cadmium, copper, manganese and nickel decreased the binding activities of IRP to IRE with an increase in the aconitase activity in a dose-dependent manner. These data suggest that non-Fe metals bind IRP in 3Fe-4S state to influence its function.

Key words — iron regulatory protein, transferrin receptor, iron-sulfur cluster, iron

緒 言

Iron regulatory protein (IRP)は、トランスフェリン受容体 (Tf-Rc) とフェリチンを転写後調節することにより細胞内鉄濃度を調節する鉄センサータンパクである。Tf-Rc 及びフェリチン mRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) 及び 5' UTR 上には同じ構造を持つ iron responsive element (IRE) があり、IRP と相互作用する。¹⁻⁴⁾ まず細胞内の鉄濃度が低下すると IRP は Tf-Rc mRNA の 3' UTR にある IRE に結合し、その結果 Tf-Rc mRNA は RNase による分解から保護されて半減期が延び、Tf-Rc タンパクの発現効率は高まる。一方、フェリチン mRNA は 5' UTR 上の IRE に IRP が結合することによって、翻訳が阻害され、フェリチン合成は低下する。逆に細胞内鉄濃度が上昇すると IRP は IRE から離れ、Tf-Rc mRNA は RNase によって分解され、結果として半減期は短くなる。一方、フェリチン mRNA では

5' UTR 上の IRE から IRP が離れて翻訳が進み、フェリチン合成は増加する。IRE に対する IRP の結合は IRP の高次構造中の鉄-硫黄 (Fe-S) cluster の 4Fe-4S 型と 3Fe-4S 型の相互変換に依存している。鉄 4 原子のうち 3 原子は本体である IRP 中のシステインと結合し、残りの 1 分子は cluster を形成しているだけで不安定な状態にある。この鉄原子は細胞内鉄濃度が低下すると cluster から遊離し、3Fe-4S 型を形成する。その結果、Tf-Rc やフェリチン mRNA 上にある IRE との親和性は高まる。細胞内鉄濃度が上昇すると cluster へ動員され、IRE との親和性を低下させる。⁵⁾ また、IRP は立体構造、アミノ酸配列、分子量などが細胞質アコニターゼと一致しており、⁶⁾ 4Fe-4S の時、アコニターゼ活性を持ち、3Fe-4S の時アコニターゼ活性を失う。そして細胞内鉄濃度の変化に応じてアコニターゼ活性も変化する。¹⁾ 我々は最近、この IRP/IRE 調節系が鉄のみの調節を行うか否かを調べるため、ラット脳培養神経細胞を鉄とアルミニウム (Al) で前培養し、Northern blot により Tf-Rc mRNA 量を測定した。その結果、Fe のみならず、Al 負荷によっても Tf-Rc mRNA 量の発現量の低下が認められ、⁷⁾ Al は鉄代謝系に影響を及ぼすことや鉄以外の金属も IRP/IRE 系によって調節されることが推測された。

*To whom correspondence should be addressed: Department of Biochemical Genetics, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan. Tel.: +81-3-5803-5823; Fax: +81-3-5803-0248; E-mail: satoru.bgen@mri.tmd.ac.jp

本研究は精製した IRP と鉄以外の金属との直接的な相互作用を明らかにすることを目的として、金属処理した IRP-IRE 結合活性及びそのアコニターゼ活性について検討した。

実験方法

1. 試薬及び試料 1.1 ウシ肝からの IRP の精製——ウシ肝は芝浦臓器から購入した。Sp Sepharose High Performance, Sephacryl S-200 は Pharmacia Biotech から購入した。

1.2 アコニターゼ活性測定用試薬——クエン酸三ナトリウム、二水和物は和光純薬、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ は関東化学、 β -NADP 及び isocitrate dehydrogenase は SIGMA から購入した。

1.3 蛋白定量用試薬——Bio-Rad DC protein assay は Bio-Rad から、標準タンパク bovine albumin は SIGMA から購入した。

1.4 金属処理関連試薬——Fe citrate (SIGMA), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (小宗化学), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬), $\text{CdCl}_2 \cdot 2.1/2\text{H}_2\text{O}$ (関東化学), HgCl_2 (和光純薬), EDTA (片山化学), dithiothreitol (DTT) (SIGMA), Hepes (片山化学) 等はいずれも特級試薬を用いた。

1.5 ゲルシフトアッセイ測定用試薬—— $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ CTP はアマシャムから、Electrophoresis buffer は Bio-Rad から γ -ATP, γ -GTP, γ -UTP は Pharmacia Biotech から購入した。

2. 実験方法 2.1 ウシ肝からの IRP の精製——ウシ肝 (100 g) を細切り、2 倍量の 2 mM Hepes (pH 7.2) buffer に 2 mM クエン酸 Na を加え、テフロンホモジナイザーにてホモジナイズした。ホモジネートは 40000 g, 30 分間遠心分離し、上清を 35—75% 硫酸塩析した。透析後 Sp Sepharose HP イオン交換カラムにかけ、Sephacryl S-200 にてゲル濾過し、更に、最終的に約 130 倍にまで精製されたことを IRP がもつアコニターゼ酵素活性によって確認した。

2.2 *In Vitro* 転写反応における IRE の作製——化学合成した human ferritin IRE (5'-ATCC GTCCAAGCACTGTTGAAGCAGGATCCC-TATAGTGAGTCGTATTA-3') を、pBluescript II SK+プラスミドの BamH I, Xho I site に挿入し、大腸菌を形質転換して IRE をクローニングした。転写反応の基質として用いる場合、制限酵素 Xho I site で切断した後、転写反応に用いた。転写反応は、 γ -ATP, γ -GTP, γ -UTP, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ γ -CTP (アマシャム), DTT, RNase inhibitor, T7 RNA polymerase を transcription buffer に加えて混和後、37°C, 30 分間インキュベーションした。

2.3 精製 IRP の金属処理——IRP を含む 20 mM Hepes buffer (pH 7.4) に 5 mM EDTA, 500 μM DTT を加えて、金属と EDTA の割合 (metal/EDTA) が最終的に 0, 0.25, 0.5, 1.0 となるよう、金属の nitrilotriacetate を加え、30 分間、室温でインキュベーションした。

2.4 ゲルシフトアッセイ——Binding buffer (10 mM Hepes, 3 mM MgCl_2 , 40 mM KCl, 5% glycerol, 1 mM DTT, pH 7.6) にそれぞれの金属で処理した IRP と $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ IRE を 30 分間、室温でインキュベーションした。反応終了後、未変性条件下、5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。泳動後ゲルをゲル乾燥器で乾燥させ、イメージ・アナライザー (BAS 2000, Fuji フィルム) によって解析した。

2.5 アコニターゼ活性の測定——100 mM Tris-HCl Buffer (pH 8.0), 10 mM クエン酸溶液, 10 mM MgCl_2 溶液, 10 mM β -NADP 溶液, 1 mg/ml isocitrate dehydrogenase 溶液をそれぞれ 20 μl ずつ取り、混和した。次に金属処理した IRP (20 μg) を加え、室温で 10 分間インキュベーションし、補酵素 NADPH の 340 nm における吸光度減少を Spectro-photometer DU-600 (Beckman) によって測定した。

結果

1. ウシ肝からの IRP の精製

まず本研究では、重金属と IRP が直接、相互作用をしょうかを明らかにするため、ウシ肝からアコニターゼ活性を指標として、IRP を精製した。

Table 1 に示すようにウシ肝ホモジネートを 35—75% 硫酸塩析、Sephacryl S-200 ゲル濾過によって分画し、Sp Sepharose HP イオン交換カラムによる精製過程を経て、最終的に IRP を約 130 倍にまで精製した。以後の実験ではこの IRP を精製標品として用いた。

Table 1. Purification of IRP from Beef Liver

Purification step	Specific activity units* ^{a)}	Purification fold
Soluble fraction	0.05	1.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitate	0.41	8.2
Sephacryl S-200	2.45	49.0
Sp Sepharose Hp	6.43	128.6

a) Units are μmol NADPH/min/mg protein at 25°C.

2. 鉄処理後の IRP-IRE 結合活性とアコニターゼ活性

上記の方法で精製した IRP と転写反応によって得られた IRE が、特異的な結合活性とアコニターゼ

活性を持つかを調べた (Fig. 1). ゲルシフト・アッセイは、本来、転写反応に用いられるが、本研究では IRE に対する IRP の結合活性を測定するために用いた. このアッセイ法では鉄濃度が低下あるいは

Fig. 1. Effect of Iron on IRE Binding and Aconitase Activities of Purified IRP

IRP (20 μ g) was treated in 20 mM Hepes (pH 7.5) containing 500 μ M dithiothreitol, 5 mM EDTA and varying iron concentrations. IRE binding (A,B) and aconitase activities (C) in these samples were determined after the incubation for 30 min as described in Materials and Methods. Data indicate mean $\pm$ S.D. of three experiments. A: The representative data on band-shift assay in samples exposed to Fe/EDTA with various ratio. B: Binding activities obtained from band-shift assay in samples exposed to Fe/EDTA with various ratio. C: Aconitase activities of samples exposed to Fe/EDTA with various ratio.

増加すると, IRE に対する IRP の親和性が増加あるいは減少する. その結果, IRP-IRE 複合体量が増加あるいは減少して, バンドの濃淡が観察できる.

本研究では, EDTA 処理で内因性の鉄を除いた後, IRP-IRE 複合体を十分に形成させ, 結合活性の鉄濃度依存性を調べた. その結果, EDTA 処理したサンプルを 100% として比較すると, Fe/EDTA 比が 0.5 では約 20%, 0.75, 1.0 では約 30% まで減少した. したがって, IRP-IRE 複合体量は鉄濃度依存的に減少することが示された (Fig. 1A, B). 一方, アコニターゼ活性は鉄濃度依存的に増加し, Fe/EDTA 比が 0.25 の場合は 1.7 倍, 1.0 では約 2 倍まで増加し, 濃度依存的に酵素活性が増加した (Fig. 1C).

3. 金属処理後の IRP-IRE 結合活性

次に IRP の種々の金属に対する結合活性を調べた (Fig. 2). その結果, Hg, Cd, Cu は, Fe よりも IRP-IRE 結合活性を低下させたが, Hg は特に顕著

Fig. 2. Effect of Various Metals on IRE Binding Activity of Purified IRP

IRP (20 μ g) was treated with various metals under the same condition described in Fig. 1. IRE binding activities in these samples were determined as described in Materials and Methods. Data indicate mean $\pm$ S.D. of three experiments.

であった。一方, Mn は Fe の場合と類似しており, Ni は Fe よりも結合活性の低下はわずかであった。

4. 金属処理後の IRP におけるアコニターゼ活性

この実験では鉄以外の金属処理によるアコニターゼ活性への影響を調べた (Fig. 3)。その結果, Hg, Cd, Cu の場合 metal/EDTA 比が 1.0 では Fe の 2 倍以上のアコニターゼ活性を示した。Mn, Ni ではアコニターゼ活性の増加は見られたが, Fe よりも低い値を示した。

考 察

本研究は, IRP/IRE 調節系が鉄だけでなく様々な重金属の細胞内濃度調節も行うか否かを明らかにす

Fig. 3. Effect of Various Metals on Aconitase Activity of Purified IRP

IRP (20 μ g) was treated with various metals under the same condition described in Fig. 1. IRE binding activities in these samples were determined as described in Materials and Methods. Data indicate mean $\pm$ S.D. of three experiments.

るため, 精製した IRP と転写反応によって得られた IRE を用い, IRE 結合活性及び IRP が持つアコニターゼ活性に対する影響を調べた。

その結果, 鉄処理では IRP の特徴である鉄濃度に依存した結合活性の低下とアコニターゼ活性の増加が確認され (Fig. 1), 以下の機構が推測された。IRP を EDTA 処理すると IRP 中の cluster から不安定な Fe が EDTA とキレートすることによって除去され, 3Fe-4S 型となる。このとき IRP はアコニターゼ活性を失うと同時に IRE との親和性は増加する。次に Fe を添加していくと EDTA に対する相対比が増加して, EDTA のキレート能を上回る過剰の Fe が IRP 中の cluster に結合し, 4Fe-4S 型となる。その結果, IRE との親和性は低下するが, 補酵素である鉄を得るのでアコニターゼ活性は上昇する。

次に鉄以外の金属でも同様な現象が起こるかを確認した。Fig. 2 に示したように用いられたすべての金属に対して濃度依存的に結合活性が減少した。このことは様々な重金属が鉄と同様に IRP に直接作用するのではないかと推測された。すなわち, EDTA 処理により 3Fe-4S となった IRP の Fe-S cluster に鉄以外の金属が結合し, 4Fe-4S 型に相当する新たな cluster である [1 metal-3Fe]-4S を形成したためと考えられた (Fig. 4)。

結合活性の減少は鉄よりも大きいグループ (Hg, Cd, Cu) と小さいグループ (Mn, Ni) に分けられ得る。これは結合活性の強いグループは鉄調節や鉄代謝に影響を及ぼし, 生体への金属毒性と強く関わっていることが推測される。

上記の仮説を再確認するため, 金属処理後に, アコニターゼ活性の測定を行った。その結果, IRP の結合活性で見られたように, すべての金属処理に対して濃度依存的にアコニターゼ活性は増加した。この現象は結合活性と同様に, 鉄処理よりも酵素活性が高くなるグループと, 低くなるグループに分けられた (Fig. 3)。このことはアポ酵素 3Fe-4S 型が様々な金属と結合した結果, [1 metal-3Fe]-4S 型であるホロ酵素を形成して, アコニターゼ活性を獲得したためであり, 前述の仮説を支持する結果となった (Fig. 4)。

Fig. 4. Schematic Description of the Interconversion of the Fe-S cluster of IRP

When a labile iron in 4Fe-4S cluster is removed with EDTA, 3Fe-4S cluster is formed. After non-Fe metal squeezes in the position where a labile Fe existed, [1metal-3Fe]-4S cluster is formed. [1metal-3Fe]-4S cluster acquires aconitase activity such as IRP of 4Fe-4S state. Thus, the interconversion from 3Fe-4S cluster to [1metal-3Fe]-4S cluster is caused by interacting with non-Fe metal.

以上の結果は鉄以外の重金属も IRP と結合し、IRP の機能に影響を与える可能性を示している。

総 括

重金属には、Cd や Hg のように生体にとって有害な金属と、Fe や Mn, Ni のように必要不可欠ではあるが摂取しすぎると有害となる必須金属がある。これら金属が体内に取り込まれると、生体は金属濃度を一定に保とうとする恒常性維持機構や過剰の重金属蓄積に対する防御機構を働かせるはずである。

現在、動物細胞には 3 種類の鉄輸送系が存在⁸⁻¹⁹⁾することが知られているが、最近我々は Tf-IU (Transferrin-independent iron uptake) 系が特に重金属の細胞内蓄積に関与することを見出した。^{7,18,20)}

本研究において我々は、Tf-IU 系を介して細胞内に蓄積した重金属が鉄代謝系にどんな影響を及ぼすか解析した。その結果、重金属は IRP に直接結合し得ることから、Tf 受容体仲介輸送系を担う Tf-Rc やフェリチンの発現に影響を及ぼす可能性が示唆された。

REFERENCES

- 1) Mullner E.W., Neupert B., Kuhn L.C., *Cell*, **58**, 373—382 (1989).
- 2) Koeller D.M., Casey J.L., Hentze M.W., Gerhardt E.M., Chan L.N., Harford J.B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 3574—3578 (1989).
- 3) Walden W.E., Daniels-McQueen S., Brown P.H., Gaffield L., Russell D.A., Bailey L.C., Thach R.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 9503—9507 (1988).
- 4) Brown P.H., Daniels-McQueen S., Walden W.E., Patino M.M., Gaffield L., Bielser D., Thach R.E., *J. Biol. Chem.*, **264**, 13383—13386 (1989).
- 5) Helmut B., Mary C.K., *Eur. J. Biochem.*, **186**, 5—15 (1989).
- 6) Rouault T.A., Stout C.D., Kaptain S., Harford J.B., Klausner R.D., *Cell*, **64**, 881—883 (1991).
- 7) Oshiro S., Kawahara M., Shirao M., Muramoto K., Kobayashi K., Ishige R., Nozawa K., *J. Biochem. (Tokyo)*, **123**, 42—46 (1998).
- 8) Thorstensen K., *J. Biol. Chem.*, **263**, 16837—16841 (1988).
- 9) Nunez M.T., Gaete V., Watkins J.A., Glass J. *J. Biol. Chem.*, **265**, 6688—6692 (1988).
- 10) Thorstensen K., Romslo I., *J. Biol. Chem.*, **263**, 8844—8850 (1988).
- 11) Basset P., Quesneau Y., Zwiller I., *Cancer Res.*, **46**, 1644—1647 (1986).
- 12) Imman R.S., Wessling-Resnick M., *J. Biol. Chem.*, **268**, 8521—8528 (1993).
- 13) Kaplan J., Jordan I., Sturrock A., *J. Biol. Chem.*, **266**, 2997—3004 (1991).
- 14) Link G., Pinson A., Hershko C., *J. Lab. Clin. Med.*, **106**, 147—153 (1985).
- 15) Oshiro S., Nakajima H., Markello T., Krasnewich D., Bernardini I., Gahl W.A., *J. Biol. Chem.*, **268**, 21586—21591 (1993).
- 16) Randell E.W., Parkes J.G., Olivieri N.F., Templeton D.M., *J. Biol. Chem.*, **269**, 16046—16053 (1994).
- 17) Oshiro S., Nakamura Y., Ishige R., Hori M., Nakajima H., William A. Gahl., *J. Biochem. (Tokyo)*, **115**, 849—852 (1994).
- 18) Oshiro S., *Tanpakushitsu Kakusan Koso-Protein, Nucleic Acid, Enzyme*, **40**, 1738—1743 (1995).
- 19) Sturrock A., Alexander J., Lamb J., Craven C. M., Kaplan J., *J. Biol. Chem.*, **265**, 9024—9027 (1990).
- 20) Oshiro S., Nozawa K., Yong C., Hori M., Kitajima S., *J. Med. Dent.Sci.*, **45**, 171—176 (1998).