

博士論文審査報告書

氏名 Menega Ganasen (メネガ ガナセン)
学位の種類 博士 (理学)
学位記番号 博理第 1 1 2 号
学位授与報告番号 甲第 3 4 6 号
学位授与年月日 平成 3 0 年 1 2 月 2 1 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条 1 項該当
論文題目 Structure-function studies on the membrane proteins involved in human iron metabolism
「ヒトの鉄代謝に関わる膜タンパク質の構造機能研究」
論文審査委員 (主査) 教授 阪口 雅郎
(副査) 教授 城 宜嗣
(副査) 教授 樋口 芳樹
(副査) 教授 石森 浩一郎
(北海道大学理学部)
(副査) Svetlana V. Antonyuk
(Reader, University of Liverpool, UK)

Antonyuk 委員の審査結果については別紙 (英文) として添付する。

1. 論文内容の要旨

「鉄」はすべての生物にとって必須の微量元素であり、多様なタンパク質の活性中心として、酸素の運搬・貯蔵、エネルギー変換、遺伝子の合成、毒素を含む不要物質の分解などの重要な生理機能に関与している。ヒトは、食餌に含まれる鉄イオン、鉄錯体を十二指腸の柔毛表面にある粘膜上皮細胞で吸収し、運搬・貯蔵を経て利用している。ヒトの体内の鉄濃度は一定に保たれており、鉄の過剰あるいは不足はガンや神経変性疾患、鉄欠乏性貧血などの疾病の要因となる。ヒトには、鉄の排出を制御する機能がないため、体内の鉄濃度の調節では鉄源の「吸収」が最も重要なステップとなる。ヒトが食餌から獲得する鉄源の吸収は現象としてよく理解されているが、それに関与するタンパク質を基盤にした研究は皆無であった。Ganasen 氏は、ヒトの鉄吸収メカニズムに重要性を見出し、それに関連する膜タンパク質を研究対象として、構造と機能の関連を分子・原子のレベルで解き明かすことを目的に研究を進めてきた。

本論文において、Ganasen 氏は鉄イオンの吸収に必須の膜タンパク質 Dcytb (Duodenal

cytochrome *b*) と DMT-1 (Divalent Metal Transporter-1) を研究対象に意欲的に研究を進めた。ヒトでは、鉄イオンは十二指腸腸管において吸収されるが、その際に粘膜上皮細胞の細胞膜に存在するトランスポーターDMT-1 が、腸管側に存在する食餌に含まれる鉄を細胞内に取込む。DMT-1 は還元型鉄イオン (Fe^{2+}) しか輸送できないため、粘膜上皮細胞には鉄還元酵素 Dcytb も存在し、食餌中の酸化型鉄イオン (Fe^{3+}) を還元型鉄イオン (Fe^{2+}) に還元している。Dcytb は、この還元反応に細胞内のアスコルビン酸の電子を利用することが分かっていた。Ganasen 氏は、膜タンパク質であるヒト由来 Dcytb の結晶化に成功し、SPRING-8 を用いた結晶構造解析によって、世界で初めてその立体構造を明らかにした。その構造情報を基にした共鳴ラマン分光測定や酵母を用いた機能解析など複合的なアプローチにより、細胞膜を横切る電子移動のメカニズムならびに Dcytb による金属認識のメカニズムを明らかにした。また、これらの結果に基づき、食餌に含まれる鉄キレーター化合物(クエン酸などの有機酸)が Dcytb による鉄還元を促進していることを提案した。さらに、Ganasen 氏は本研究の将来的な展望として、Dcytb により還元された鉄を DMT-1 が効率よく輸送するためのメカニズムを提唱し、それらの検証の必要性について議論した。本論文の主要部分は *Communications Biology* (Nature 姉妹紙) に掲載された (*Comms. Biol.* (2018) 1: 120, DOI: 10.1038/s42003-018-0121-8)。

2. 論文審査結果

本論文において Ganasen 氏は、鉄欠乏症が世界的にとっても深刻な栄養失調問題であることを言及し、ヒトの鉄吸収の第一段階を担う重要な膜タンパク質 Dcytb について、それらの構造と機能の関連性を構造生物学・生化学・分子分光学などの手法を組み合わせることで、詳細で丁寧に研究した。X線結晶構造解析によるヒト由来 Dcytb の立体構造の解明は、鉄代謝に関わるヒト由来の膜タンパク質としては世界初の成果であり、ヒトの鉄吸収に関するメカニズムを原子レベルで議論することを初めて可能にした。Ganasen 氏が解明した構造機能相関に関する情報は、医学・薬学分野への発展性を含んでおり、将来的にはヒトの鉄吸収を安全に促進させる新規な薬剤の開発に貢献しうる成果であると評価できる。

よって本論文は博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認める。

また、2018年10月25日、論文内容およびこれに関連する事項について諮問を行った結果、合格と判定した。

Dr S. V. Antonyuk
Reader

Institute of Integrative Biology
Faculty of Health and Life Sciences
Crown Street
University of Liverpool
Liverpool L69 7ZB
Telephone: 0151 7955147

Current Email: s.antonyuk@liverpool.ac.uk

The thesis, written by Miss Menega Ganasen with the title “Structure – function studies of the membrane proteins involved in human iron metabolism”, is composed of 4 chapters: Introduction; Characterization of a novel heme transporter in animals (Heme Responsive Gene-1 and 4 from of *C. elegans*); Structural insights into non-heme iron absorption in human duodenum (Dcytb) and General conclusion and future prospects.

The first chapter gives an overall introduction to iron absorption, its importance for mammals and challenges in iron transport and uptake. In this chapter Menega also introduces membrane proteins Heme Responsive Gene (HRG), Duodenal Cytochrome b (Dcytb) and Divalent Metal Transporter-1 (DMT-1) involved in heme iron and free iron absorption.

The second chapter is dedicated to overexpression, characterisation and crystallisation of *C. elegans* HRG-4 protein (CeHRG-4, which was discovered as transmembrane permeases upregulated in response to heme deficiency and localized on apical plasma membrane. CeHRG-4 only present in heme auxotrophs such as roundworms, parasitic helminthes, and some protozoan parasites, so finding inhibitor will be very beneficial for the development of antihelminthics and anti-parasitic drugs. Menega successfully overexpressed the protein in *Pichia pastoris* and overcome difficulties in finding correct detergent to prevent protein aggregation. She also succeeded in protein crystallisation but failed to grow diffracting crystals, which is not surprising, membrane proteins crystal are known for their poor diffracting properties. In order to understand the substrate specificity the *in vivo* yeast spot assay was used to prove the protein preference to heme.

Chapter three is the main chapter of the thesis and dedicated to X-ray crystal structure of homodimeric human duodenal cytochrome b (Dcytb) in free and bond with Zn^{2+} and ascorbate forms. Dcytb is an integral membrane protein that catalyses reduction of nonheme Fe^{3+} by electron transfer from ascorbate across the membrane. Menega overexpressed the protein in *E.coli*, purified, crystallised, solved its structure by X-ray crystallography and also performed many biophysical experiments to understand the function and metal binding. Most of very impressive results of this chapter were recently published in Communication biology journal, where Menega is the first author.

In addition to published results very detailed comparison between Dcytb and plant enzyme *Arabidopsis thaliana* Cytochrome b561 (*AtCytb561*), which was used as a starting model to solve the crystal structure, is provided. The work clearly shows the importance of cooperative binding of ascorbate and Zn^{2+} to the apical substrate binding site for Dcytb function. The results of this chapter gave a structural basis for the mechanism by which Fe^{3+} uptake is promoted by reducing agents and should facilitate structure-based development of improved agents for absorption of orally administered iron.

Chapter four is dedicated to general conclusions and future direction of the research, where in the first part the role of heme transport by CeHRG-4 has been discusses and further strategy for structure determination. In the second part of the concluding chapter the role of ascorbate as possible Fe^{2+} chelator in the lumen of duodenum is discussed as the result from Dcytb study. This chapter is continues with the discussion on the progress with human DMT-1 protein

I am not sure why DMT-1 study is positioned within part 4. Preliminary DMT-1 results could be better placed as additional chapter in the result part of the thesis together with detailed methodology on its expression and purification.

The results of his thesis were presented at many scientific meetings held in Japan and abroad and published in following paper

Menega Ganasen, Hiromi Togashi, Hanae Takeda, Honami Asakura, Takehiko Tosha, Keitaro Yamashita, Kunio Hirata, Yuko Nariai, Takeshi Urano, Xiaojing Yuan, Iqbal Hamza, A. Grant Mauk, Yoshitsugu Shiro, Hiroshi Sugimoto and Hitomi Sawai Communications Biology, 1 (2018) Article number 120. As the paper does not include authors contribution, it is important to explain authors contribution in the thesis.

The standard of written English is acceptable. The results described are convincing, and represent a significant increase in our understanding of the iron intake mechanism. Chapter 3 has been translated into high-impact paper. I am convinced, therefore, that the science described in the thesis is of high quality and recommend PhD degree award after minor corrections to the thesis (the list of minor corrections is provided separately). I also would like to comments on excellent quality of original illustrations helping the reader to understand the work.

A handwritten signature in black ink, reading "S Antonyuk" with a long horizontal flourish extending to the right.

Dr Svetlana Antonyuk

19.10.2018