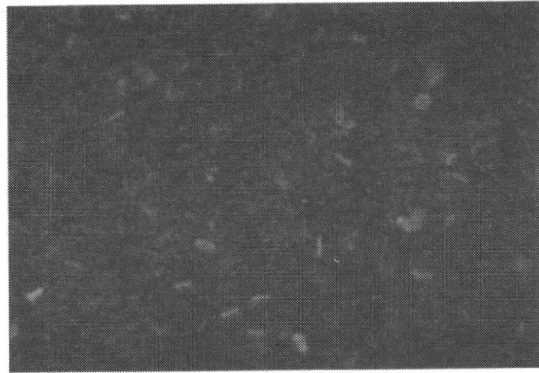
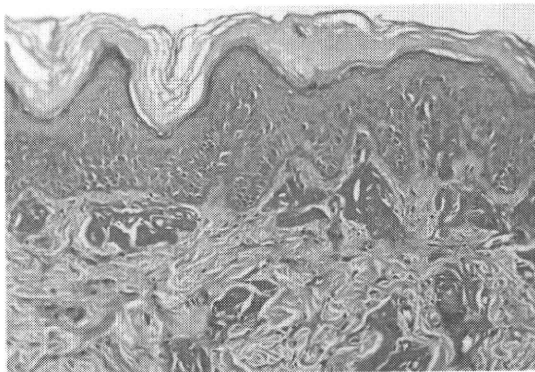


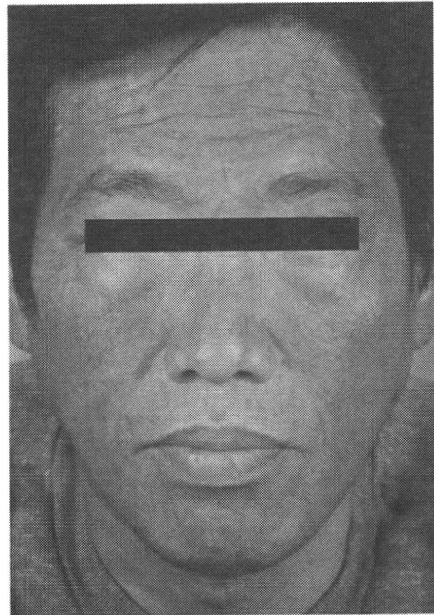
**図6 骨髄性プロトポルフィリン症の臨床像 (45歳男性, 両手背)**  
手背に色素沈着と多毛が見られる。



**図7 蛍光赤血球所見**  
骨髄性プロトポルフィリン症患者の末梢血スマア一を長波長紫外線下に観察すると、赤色の蛍光を発する赤血球が観察される。



**図8 骨髄性プロトポルフィリン症の組織像 (PAS染色)**  
真皮上層の毛細血管周囲にPAS陽性物質の沈着が認められる。



**図9 晩発性皮膚ポルフィリン症の臨床像 (47歳男性, 顔面)**  
顔面全体が褐色調を示す。基礎にアルコール性肝炎がある。



**図10 晩発性皮膚ポルフィリン症の臨床像 (47歳男性, 右手背)**  
図9と同一症例。手背は全体に褐色調の色素沈着を伴い、痂皮をつけたびらんと脱色素斑が散在している。

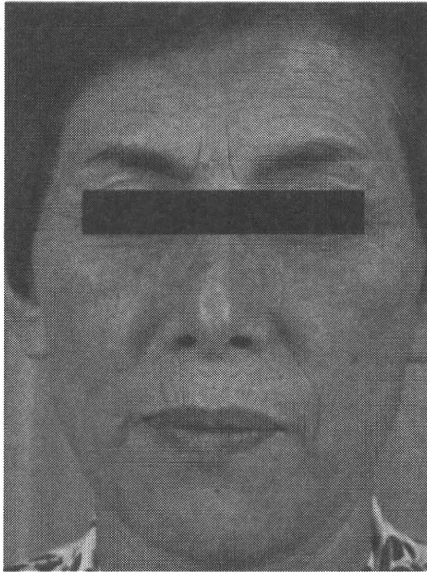


図11 晩発性皮膚ポルフィリン症の臨床像(56歳女性, 顔面)

顔面全体は褐色調を示す。基礎に慢性C型肝炎がある。

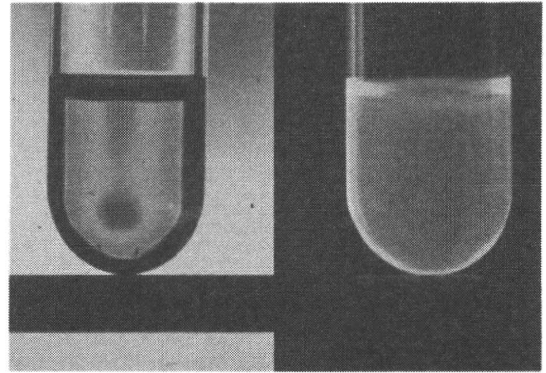


図12 晩発性皮膚ポルフィリン症患者の尿中ポルフィリン定性試験の所見

患者の尿を氷酢酸およびアミルアルコールにより処理し、アルコール部分のみを分離して、左は可視光線、右は長波長紫外線を照射した。長波長紫外線照射により赤色の蛍光が観察された。

- 赤血球中プロトポルフィリン定量：診断のために最も有用な検査は、赤血球中プロトポルフィリンの定量である。健常人では $100\mu\text{g}/\text{dl}$  RBC以下であるが、EPP患者では高値を示す。

### (3) 治療

- EPPに対する最も重要な治療は徹底した遮光である。作用波長が長波長紫外線から可視光線領域にあるので、それらの光線を遮断するような日焼け止めなどを用いる。一方、EPPに有効な薬物療法は未だ確立されていない。比較的多く行われているのは $\beta$ -カロテンの内服であるが、その評価は一定していない。

### 晩発性皮膚ポルフィリン症

- 晩発性皮膚ポルフィリン症(porphyrria cutanea tarda; PCT)は、ヘムの代謝経路における肝臓のuroporphyrinogen decarboxylase(URO-D)の活性低下が潜在し、これにアルコール、ウイルス性肝炎、薬剤などの誘発因子が作用して発症するものと考えられる。PCTを起こしやすい薬剤としては、スルホンアミド、バルビツレート、エストロゲン製剤などがよく知られている。

- 最近では、C型肝炎との合併が問題となっている。PCTは常染色体優性遺伝を示すとされるが、本邦では家族内に同症が見られたのは1%程度と少ない。

### (1) 臨床症状

- 40歳以降の中年男性に発症することが多いが、近年、女性例も増加している。初めは光線過敏、すなわち日焼けしやすくなったという程度で気付くことが多く、次第に露光部に色素沈着、水疱、びらん、癬痕などが生じる。時に多毛、脱色素斑を伴う(図9~11)。

### (2) 診断

- 本疾患では、尿中ポルフィリン体の定性試験がスクリーニング検査として有用である(図12)。診断確定には、蓄尿して1日の尿中ウロポルフィリン排泄量を定量する。血液中のポルフィリン体の増加は見られない。生検組織像ではEPPとほぼ同様の所見が得られる。

### (3) 治療

- アルコールが誘因の場合は、これを控える。また本症を悪化させる薬剤の使用が考えられる場合は、それを中止する。そして、他の光線過敏症と同様に日常生活における遮光が必要である。

### おわりに

- EPPは、肝不全のために死に至ることもある疾患であるにもかかわらず、比較的稀なこともあって、社会的にはまだまだ広く周知されていない。今後、社会的な啓蒙活動によりポルフィリン症が広く認識され、研究の進歩とともによりよい治療の開発が進むことが期待される。

# 手背の色素沈着と癬痕

川原 繁

## ポイント

- ★晩発性皮膚ポルフィリン症(PCT)の好発年齢は中年以降である。
- ★PCTは、基礎疾患にアルコール性肝炎などの肝疾患を伴うことが多い。
- ★PCTの皮膚症状は、顔と手背の色素沈着と手の水疱・びらん・痂皮である。
- ★PCTの診断は、尿中ウロポルフィリンの高値を証明することにより確定される。
- ★PCTの治療は、基礎となる肝疾患の治療、および日常の遮光である。

## 手背の色素沈着と癬痕を診たときの基本的な考え方

手指背に褐色の色素沈着がみられ、さらに、水疱・びらん・痂皮・癬痕を伴っていた場合、はじめに、光線過敏症か、ほかの色素異常かを鑑別するために、他部位の色素沈着の有無を調べる。色素沈着が露光部に限局する場合、晩発性皮膚ポルフィリン症(porphyrria cutanea tarda: PCT)、ペラグラ、薬剤性光線過敏症などを疑い、詳しい問診、血清肝酵素の測定、尿中ポルフィリンの測定、および皮膚生検などで鑑別診断を行う。基礎に肝疾患があり、尿中ウロポルフィリン量の著明増加、皮膚生検で真皮上

層の血管周囲にPAS陽性物質の沈着が証明されれば、PCTと診断できる。

## 症例

54歳、男性。2008年7月初診。

【主訴】手背の色素沈着とびらん、痂皮。

【既往歴・家族歴】特記事項なし。

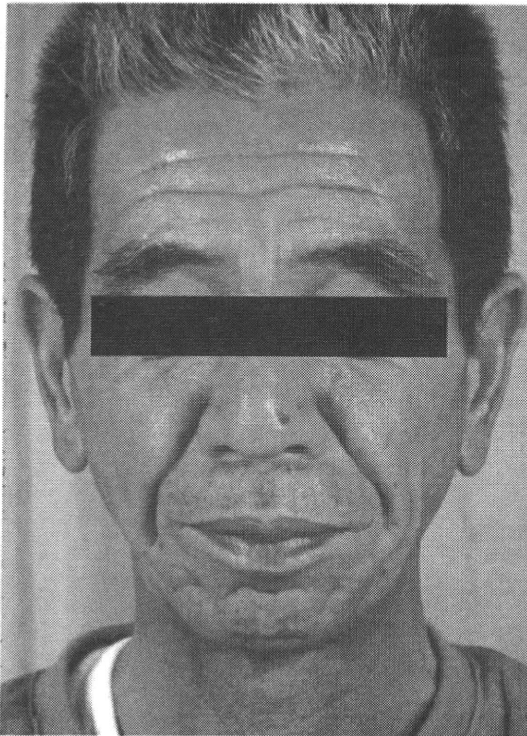
【現病歴】約9カ月前から、周囲の人に顔が浅黒くなってきたといわれていた。2週間前、庭仕事をした後左手背に痒みを伴って水疱が生じたが、放置していたところ自然に軽快した。昨日、左拇指にやや大きい水疱とびらんを生じたため、受診した。

【初診時現症】顔・頸部は全体に褐色調を示して



【図1】左手背の臨床像

手背には痂皮と小癬痕が散在し、左1指背には大豆大のびらんがみられた。



【図2】顔，頸部の臨床像

顔・頸部は全体に褐色調を示していた。

いた。両手背にも褐色の色素沈着があり，手背には痂皮と小癬痕が散在していた。左1指には大豆大のびらんがみられた。(図1，2)

### 臨床像から考えられる疾患

顔と手背に色素沈着とびらん・癬痕がみられることから，中年以降に発症する光線過敏症としてPCTが疑われる。ほかの光線過敏症では，薬剤性光線過敏症，ペラグラとの鑑別を要する。したがって，これらの疾患の鑑別を目的として，次に述べる問診と身体所見の観察，および検査を行う。

### 病歴では何を聞くか？

- ・日光を浴びた後，痒みの出現の有無

- ・飲酒歴
- ・薬剤歴：特に肝障害や光線過敏を起こしうる薬剤について

- ・下痢の有無

本症例では，日光を浴びた後軽度の痒みがあったこと，毎日晚酌(日本酒で3合を約35年間)をしていることがわかった。現在，内服している薬剤はないという。

### 身体的所見のどこをみるか？

- ・くも状血管腫，手掌紅斑など慢性肝疾患に伴う皮膚病変の有無

- ・触診により肝臓の腫大の有無

身体所見では，顔と手以外には色素沈着はなく，くも状血管腫，手掌紅斑も認められなかった。触診上，肝臓は触知しなかった。

### どんな検査が必要か？

- ・一般臨床検査：検尿，血液生化学検査
- ・ポルフィリン体の定量：尿中ウロポルフィリン，尿中コプロポルフィリン，尿中ポルフォビリノーゲン，血中プロトポルフィリン
- ・ニコチン酸の血中濃度測定
- ・皮膚生検：手背の皮膚より行う。(H-E染色，PAS染色)

一般臨床検査では，一般尿検査に異常所見なし。一般血液検査で，RBC 372万/ $\mu$ l，Hb 14.1 g/dl，WBC 4,000/ $\mu$ l(分画に異常なし)，Plt 13.0万/ $\mu$ l，生化学的検査では，TP 7.2 mg/dl，T. Bil 1.3 mg/dl，ALT 110 IU/l，AST 119，ALP 321 IU/l，LDH 273 IU/l， $\gamma$ -GTP 441 IU/l。腎機能，電解質に特に異常なし。HBs抗原，HCV抗体は陰性。ポルフィリンの定量では，尿中ウロポルフィリン 1,199  $\mu$ g/g・CRE(基準値は36以下)，尿中コプロポルフィリン 112  $\mu$ g/g・CRE(基準値は170以下)，尿中ポルフ

オピリノーゲン 1.1 mg/dl(基準値は 2.0 以下), 血中プロトポルフィリン 64  $\mu$ g/dl(基準値は 30~86)であり, 尿中ウロポルフィリン量の著明増加がみられた. ニコチン酸の血中濃度は, 6.1  $\mu$ g/ml(基準値は 4.7~7.9)であった. 皮膚生検では, H-E 染色で真皮上層の血管周囲に弱好酸性物質の沈着がみられ, その物質は PAS 染色陽性であった. 肝酵素上昇について, 消化器内科を受診し, アルコール性肝炎と診断された.

## ポルフィリン症の定義と分類

ポルフィリン症とは, ヘムの代謝異常による疾患群の総称であり, 主に光線過敏を伴う皮膚ポルフィリン症と, 神経・消化器症状などを主とする急性ポルフィリン症に分類される. 前者の主な疾患には, 小児期に発症し, ときに重篤な肝障害を伴う骨髄性プロトポルフィリン症と, 中年以降に発症し, 多くは基礎に肝疾患(アルコール性肝障害, 慢性 C 型肝炎など)を伴う PCT がある.

## PCT の原因と臨床的特徴

PCT は, ウロポルフィリノーゲン・デカルボキシラーゼ(uroporphyrinogen decarboxylase)の活性低下が潜在し, これにアルコール, ウイルス性肝炎, 薬剤などの誘発因子が作用して発症する. PCT を起こしやすい薬剤としては, スルホンアミド, バルビトレート, エストロゲン製剤などがよく知られている. 最近では, C 型肝炎との合併が問題となっている. 教科書的には常染色体優性遺伝を示すとされるが, 本邦では家族内に同症がみられたのは 1%程度と少ない.

PCT の皮膚症状は, まず日光曝露により露光部に痒みを伴って色素沈着が生じ, 次第に皮

膚が脆弱になるため, 軽微な外的刺激で容易に外傷を起こすようになる. そのため, 水疱や癬痕, 色素沈着・色素脱失が混在した状態になり, 時に, 多毛を伴う.

## PCT の治療

PCT に対する根治的な治療法はなく, 日常生活における遮光が最も重要である. ポルフィリン症における作用波長は, 長波長紫外線から可視光線領域にあるので, 日焼け止めもその領域を遮断するようなものが望ましい. さらに, 肝障害を改善することが重要であり, 飲酒を控えること, 肝障害を引き起こす薬剤はなるべく避けるように指導する.

## 症例のまとめ

### 病歴・診察・検査・診断

基礎にアルコール性肝炎があり, 手指背に褐色の色素沈着と癬痕, 顔には色素沈着がみられ, 検査で尿中ウロポルフィリン量の著しい増加が証明されたことから, 本症例は PCT と診断された.

### 治療と経過

診断確定後は, 飲酒を控えるように指導し, 主に日焼け止めを用いた遮光を指導して経過観察を行っているが, 最近では水疱およびびらん, 癬痕の新生はない.

### 文献

- 1) 野中薫雄, 三浦隆: ポルフィリン症. 市橋正光, 堀尾武(編): 光線過敏症, pp148-158, 金原出版, 2002
- 2) 川原繁: ポルフィリン症. *Derma* 96: 35-39, 2005
- 3) 落合豊子: C 型肝炎患者でみられる皮膚疾患. *Medicina* 43: 1734-1736, 2006

## トピックス

## 遺伝子発現調節のリガンドとしてのヘムの機能

## Heme-dependent Regulation of Gene Expression and Protein Functions

ヘムはヘムタンパク質の補欠分子族として、ガス分子の輸送や酸化還元反応を始めとする種々の酸素反応を担うことが知られてきたが、近年、タンパク質の機能を調節するリガンドとしてのヘムやガスセンサーとしての機能が知られるようになり、新たなヘムの機能を解明する研究が展開されている。ヘムは鉄とプロトポルフィリンIXの複合体として知られており、地球のほとんどの生物において存在して、好気的な生命機能の維持に関与することが知られている。ヘムの研究は医薬学、農学、工学をはじめとする種々の分野で行われており、ほ乳動物では肝臓や赤血球におけるヘム合成や分解について詳細な研究がされてきた。

動物のヘム合成の初発段階はミトコンドリアのグリシンとスクシニル-CoAの縮合に始まる8段階の酵素反応によって進行し、それらの4段階の反応に関与する酵素は細胞質に、残りの反応に関与する酵素はミトコンドリアに局在している<sup>1)</sup>。ヘム合成の律速段階は、初発酵素の $\delta$ -aminolevulinic acid synthase (ALAS)である。またヘム合成には鉄イオンが必要であり、小腸から取り込まれた鉄分子は血液中を移動して主に各組織細胞の表面にあるtransferrin receptorを介して細胞内に取り込まれる。生体内でのヘム鉄の維持に最も大きなウエイトを占めるのは十二指腸からの鉄イオンの取り込みであり、食事の鉄不足は細胞の鉄やヘムの低下をもたらす<sup>2)</sup>。

生体内の鉄利用に重要な役割を果たしているのはヘム分解を行うheme oxygenase (HO)である。HOはNADPH-cytochrome P450 reductase, NADPHおよび分子状酸素を使ってヘムを酸化的に分解する。本反応の生成物のひとつビリルビンは直ちにbiliverdin reductaseによってビリルビンになって排泄される。また、HOは鉄イオンと一酸化炭素(CO)を生成し、鉄イオンは再利用され、COはストレス弛緩物質としての機能を果たすことが知られるようになった<sup>3)</sup>。HOはHO-1とHO-2の2種類のアイソザイムがあり、HO-1は酸化的ストレス、金属、熱、炎症やサイトカインなどの種々の因子と基質であるヘムによって誘導されるストレスタンパク質である<sup>4)</sup>。一方、HO-2の発現は一定で、特に神経細胞や精巣細胞での発現量が多い。HOの大きな役割にはhemoglobinを始めとするヘムタンパク質の鉄イオンの再利用である<sup>5)</sup>。HO-1欠乏マウスでは極度の貧血とマクロファージなどでの顕著な鉄

の蓄積が認められることからヘム分解の多くはHO-1が行っていることが伺える。従って、ヘム鉄の行方はHO-1に依存する鉄イオンの細胞外への放逐とHO-1に依存しない遊離鉄の維持の二通りがあると考えられる<sup>4)</sup>。

## 細胞内ヘムレベルのヘムによる調節

ALASには広く種々の組織に発現するALAS1と赤血球系細胞で働くALAS2の2種類のアイソザイムが知られており<sup>2)</sup>、それぞれ違った調節を受けている。ALAS1発現はヘムによって負のフィードバック調節を受け細胞内のヘム量の維持に重要な役割を果たしている。ALAS1のヘムによる抑制は転写、ALAS1mRNAのヘムによる不安定化さらには翻訳後のALAS1前駆体のミトコンドリアへの局在の抑制に及ぶ(図1)。ALAS1前駆体の移行のヘムによる抑制はALAS1前駆体のミトコンドリア局在部位のheme-regulatory motif (HRM)に相当するシステイン-プロリンを含むK/RCPVアミノ酸配列(CP-motif)へのヘムの会合によるものである<sup>6)</sup>。ALAS1mRNAへの転写調節については、長年多くの研究がなされてきて、ヘムによる抑制の他に種々の薬剤やアルコールを始めとするいろいろな因子での誘導が知られ、数種類の核因子が遺伝子発現を調節することが知られている<sup>7)</sup>。しかし、ヘムによるALAS1の転写抑制については明確な機構の解明には至っていない。最近、ほ乳動物で核因子REV-*erba*がヘムを結合して、ALAS1のエンハンサー領域のE-boxに結合して活性化因子PGC-1 $\alpha$ を排除してCo-repressorである抑制因子NCOR-REV-*erba*複合体がALAS1遺伝子を不活性化するのはないかと考えられている<sup>8)</sup>。我々はマウスALAS1遺伝子のヘムによる転写抑制について詳細に調べた結果、ヘミン(20-50  $\mu$ M)処理した細胞ではALAS1遺伝子の近位プロモーター領域(-300bp付近)のGC-rich配列に転写因子EGR-1が結合することを見出した。EGR-1はさらに抑制因子NAB1/2と複合体を形成して遺伝子を不活性化するが、ヘムがこれらの因子とどのような相互作用をするかは不明である<sup>9)</sup>。

ヘムによるHO-1発現の顕著な誘導は細胞内のヘムレベルを低下させることに貢献する。種々のストレスで誘導されるHO-1遺伝子のプロモーター領域には種々の調節因子が結合することが知られている<sup>4)</sup>。ヘムによる遺伝子の活性化については全てのことが明らかにされてい

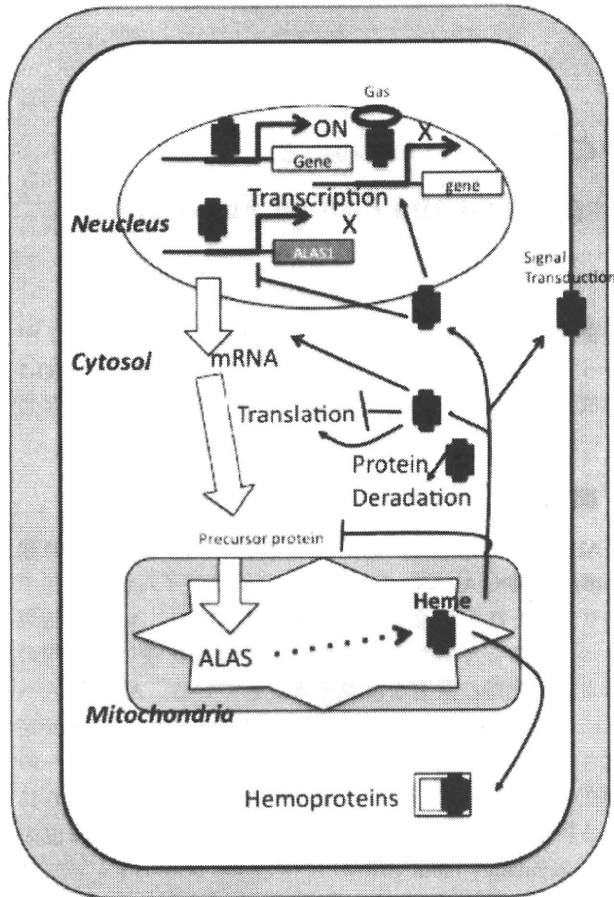


図1. ヘム合成調節メカニズムとヘムの多極的利用とその作用

るわけではない。しかし、近年、抑制因子 Bach1 にヘムが結合すると Bach1 の抑制活性が失われることで HO-1 の誘導が説明できるようになった。すなわち、Bach1 は Maf 因子と複合体を形成して HO-1 遺伝子の転写開始点から 10kb 以上上流にある MARE 部位に結合して遺伝子発現を抑制しているが、ヘムと結合することによって MARE 部位から離脱して代わりに活性化因子 NRF2 が Maf 因子と複合体を形成して MARE 部位に結合して遺伝子を活性化すると考えられている<sup>10)11)</sup>。

### 分化因子としてのヘム

ヘムは種々の細胞分化を促進することは以前から多くの報告がある。最もよく知られているのは赤芽球細胞の分化時のヘムの必要性である。赤芽球分化段階の細胞群のひとつである colony-forming unit (CFU) に関して、分化因子エリスロポエチンが存在してもヘム合成を阻害すると CFU の段階で分化の停止がみられ、またヘミンを添加すると CFU 細胞の増加が認められることが報告されている<sup>12)</sup>。マウス赤白血病 (MEL) 細胞はジメチルスルホキシド等の有機溶剤処理で赤血球様に分化することがよく知

られている。この細胞をヘミン (20-100  $\mu\text{M}$ ) で処理すると同様にヘモグロビン合成は誘導されて分化することが知られている<sup>13)14)</sup>。これらの処理によって細胞内のヘム合成系酵素を始め種々のヘム依存性の赤芽球特異的タンパク質が誘導されていると考えられる(後述)。

マウス線維芽細胞 3T3-L1 をインスリンとデキサメサゾン等のホルモンで処理すると脂肪細胞に分化することが知られているが、この細胞をヘミン (25  $\mu\text{M}$ ) で処理すると同様に分化することが報告されており<sup>15)</sup>、さらにラット筋肉細胞でも同様な分化が認められている<sup>16)</sup>。また、ヒトの神経芽腫細胞をヘミン (50  $\mu\text{M}$ ) 処理した結果、神経特異的タンパク質の誘導や神経軸の成長が認められたことが報告されている<sup>17)18)</sup>。これらの細胞分化時には組織特異的な遺伝子が活性化されていると考えられる。一方、細胞によってはヘミン処理をするとミトコンドリア DNA の破壊などの細胞毒をもたらしことが多く報告されており<sup>19)</sup>、生体外の実験系がもたらす問題としてヘム毒も考慮しなければならない。

### ヘム依存性の遺伝子発現

核内のヘムによって転写が支配されていることが最初に知られるようになったのは酵母のミトコンドリア呼吸鎖のタンパク質である iso-1-cytochrome (CYC1) と iso-2-cytochrome (CYC2) である。すなわち、好気条件下で生育すると iso-1-cytochrome のみが産生される。CYC1 と CYC2 は活性化因子 HAPI がプロモーター領域 (UAS1) に結合することで活性化される。HAPI の UAS1 への結合はヘムによって増加する。HAPI は DNA に結合するジンクフィンガー領域とヘムに結合する CP-motif を含む活性化部位から構成されている<sup>20)</sup>。ヘム-HAPI 関与で転写が促進する他の遺伝子として COXVb, cytochrome b<sub>2</sub>, catalase T と CPOX などが知られているが、COXVa は逆に同様な様式で抑制される<sup>25)</sup>。光合成細菌を始めとする多くのバクテリアではヘム結合調節因子 CooA が同定され、CO を配位して始めてゲノムに結合して遺伝子を活性化することが知られるようになり、現在もっともよく研究されたガスセンサーである<sup>21)</sup>。

ほ乳動物で最初にヘム結合性を有する転写因子として発見されたのは Bach1 であり、Maf 因子と会合する遺伝子抑制因子である。Bach1 には 6 箇所 CP-motif が存在しており、ヘムが Bach1 の CP-motif に結合すると抑制因子としての活性を低下させることが知られるようになった。赤血球分化にともなって  $\alpha$ ,  $\beta$ -globin が誘導されるが、その時、活性化因子 NF-E2-Maf 複合体が globin 遺伝子のエンハンサー領域 ( $\mu\text{LCR}$ ) にある MARE サイトに結合して遺伝子を活性化することが証明されている<sup>22)23)</sup>。同様に MARE サイトを認識する Bach1-Maf の抑制活性をヘムが取り除くことで、NF-E2 を引き寄せて globin 発現を引き出していると考えられている。Bach1 の機能としては

前述の非赤芽球系細胞でのHO-1のヘムによる誘導の場合と類似の機構であるといえる<sup>10)</sup>。しかし、ヘムが生体のglobin産生に必須であるということに関しては、否定的な見解も多い。実際、ヘムを少量しか合成できない変異赤血球でもglobin mRNAレベルは正常であるということからも伺える。ヘムを活性化因子とする遺伝子発現は、薬剤代謝を担うフェノバルビタール誘導性のcytochrome P-450 (b型)の増加には遺伝子プロモーター領域へのヘム結合ファクターの結合が報告されているが、因子の同定までには至っていない<sup>24)</sup>。

2005年、ショウジョウバエの核因子E75がヘムを結合する能力があってエクサイゾンシグナルに関与すると考えられる標的遺伝子のプロモーター領域に結合して転写を抑制するが、CO/NO等のガスが配位するとco-activatorが結合して遺伝子を活性化することが報告され、核因子のリガンドとしてのヘムが知られるようになった<sup>25)</sup>。ほ乳動物でもE75にホモロジーのある核因子REV-erb $\alpha$  (前出)がヘムを結合して、plasminogen activatorやALAS1を始めとする種々の遺伝子のRORE様エンハンサー領域に結合して活性化因子PGC-1 $\alpha$ やPPAR $\gamma$ の結合部位と競合するとも考えられる<sup>8)</sup>。しかし、REV-erb $\alpha$ はE75のホモログであり、E75ではヘムにCOやNOが配位することが知られているので<sup>26)</sup>、今後REV-erb $\alpha$ 結合ヘムへのガスの配位による分子機能の調節機構が明らかにされる必要がある。また、ヘム産生には概日周期があり、その変化は細胞内ヘムレベルの変化によるALAS1の発現量の変動に起因していることが示された<sup>27)</sup>。ALAS1の概日周期下の発現調節には時計遺伝子NPAS2がヘムに結合してBMAL1と複合体を形成することでALAS1遺伝子を活性化するが、COがNPAS2/BMAL1複合体の活性を抑制することが分かり、NPAS2はガスセンサーとしての役割が明らかにされた。COはHOの反応産物であるので、細胞内のヘムレベルの上昇に伴ってCOが増加してALAS1遺伝子の不活性化を行う合理的なフィードバック調節が考えられている。さらに、NPAS2/BMAL1複合体を活性化する時計因子PER2もまたヘムが結合する部位を2個有しており、その一方に酸化型ヘムが結合すると不安定になって分解されるが、2個のヘムもしくは還元型ヘムと時計因子CRYが結合すると安定化されて標的遺伝子のプロモーターに結合して遺伝子発現活性を促進すると考えられている。これらの結果からPER2はヘムセンサーとも言われるようになった。このような調節はALAS1の他に、赤血球系のALAS2遺伝子を始め概日周期によって制御されるE-Boxをプロモーターに持つ遺伝子群の発現において同様な機構で調節されていることが明らかにされてくるに至り、さらにヘムの新しいリガンドとしての機能が注目されることになった<sup>28)29)</sup>。以上のように、ヘムは酸素やCOを配位してタンパク質機能を変化させて標的遺伝子の発現を調節していることからガスセンサーの主

役といわれるようになった。

ヘム結合性核因子REV-erb $\alpha$ はマウス3T3-L1脂肪細胞の分化時に誘導されることが報告され<sup>30)</sup>、ヘムによる脂肪細胞の分化の促進と関係すると考えられた。我々は数種類の核因子のヘム結合性を調べたところ、脂肪細胞分化の中心的役割を果たすRXR $\alpha$ にヘム結合能力があることを見出した。しかし、ヘムはRXR $\alpha$ の機能を低下させて3T3-L1細胞の分化を抑制することが分かった<sup>31)</sup>。ほ乳動物におけるヘムと調節因子の相互作用に関しては、抑制因子の機能を低下される場合のみが報告されており、未だHAP1のようにヘムによって直接活性化される転写因子は発見されていない。

### 転写後のヘムによる機能制御

赤芽球細胞でのグロビンなどのタンパク質合成を調節するprotein kinaseの活性はヘムによって調節され、heme-regulated inhibitor (HRI)と呼ばれている。HRIはeIF2 $\alpha$ の $\alpha$ サブユニットをリン酸化して翻訳を阻害する。eIF2 $\alpha$ のリン酸化はHRI, double strands RNA-dependent kinase, GCN-2, ER resistant kinaseなどで行われているが、HRIのみがヘムと結合することによってkinase活性を低下させる。従って、HRI活性の低下はeIF2 $\alpha$ を活性化し、赤芽球の主要タンパク質グロビンの合成を増加させることが知られている。HRIの活性低下はALAS2の翻訳をも促進し、hemoglobin合成促進の相乗効果を生む<sup>32)</sup>。最近、ヘムによる転写後の調節についても種々のステップで見られることが報告されるようになった。microRNA前駆体の成熟過程にはDGCR8の関与が必須であるが、ヘムが結合したDGCR8の二量体がmicroRNA前駆体と複合体を形成するという興味深い調節が最近報告された<sup>33)</sup>。しかし、その詳細は検討されておらず、今後の進展を期待したい。

細胞内の遊離鉄イオンは遊離ヘムと同様に毒性が高く、鉄レベルは細胞への鉄の取り込み、利用、貯蔵および排出で厳密に調節されている。これらの鉄の動態を調節するタンパク質群のmRNAにはiron-responsive element (IRE)が存在しており、IRE結合タンパク質 (IRP)の部位への結合と解離で調節されている。IRPは2種類のアイソホーム (IRP1と2)が知られている。IRP1は鉄-イオウクラスター含有タンパク質でaconitase活性を示すが、クラスターの完成度と逆の相関でmRNA内のIREとの結合能を獲得する。IRP2のIREの結合量はその量的な変動で調節されている。IRP2はプロテオソームで分解されるが、鉄レベルの増加でIRP2の酸化が自らのユビキチン化を招いて分解される。IRP2の酸化にはIRP2のiron-dependent degradation (IDD)部位への酸化型ヘムの関与が必要であり、IDD部位のE3 ligaseの認識機構にヘム結合タンパク質HOILが必要であることが報告されている<sup>34)</sup>。しかし、IDD部位とHOILが関与する鉄依存性のIRP2の分解につ

いて疑問視する報告があり<sup>35)</sup>、さらに、最近鉄結合部位 hemerythrin 様配列を有する FXBL5 が IRP2 の鉄依存性分解に作用することが知られるようになり<sup>36)</sup>、細胞内鉄イオンレベルは多極的に調節されている可能性も考えられる興味深い問題である。

ヘム輸送体として動物で最初に単離されたのは FLVCR である。FLVCR は猫の白血病ウイルスの細胞表面抗原であることが知られていた。近年、その機能としてはヘムの細胞外輸送 (exporter) として働いていると考えられるようになり、FLVCR ノックアウトマウスでは脾臓や血球細胞に顕著な鉄の蓄積が認められることからマクロファージのヘムの細胞外輸送に関与することが分かった<sup>37)</sup>。HRG-1 もヘム輸送体として知られ、エンドゾームに局在して H<sup>+</sup>-ATPase に会合し、エンドゾームを酸性 pH に維持して鉄の取り込みに関与する transferrin receptor を始めとする栄養輸送体のエンドサイトーシスに働くと考えられている。HRG-1 は本来ヘム合成が欠損している線虫においてヘム獲得のためのタンパク質として分離されており、動物やゼブラフィッシュにおいてもホモログが存在し、赤血球産生には必要な膜タンパク質であることが知られている<sup>38)</sup>。また、細胞内への鉄の取り込みは 2 価鉄を輸送する divalent metal transporter (DMT) が担っているが、細胞表面では 3 価鉄を 2 価鉄に還元する必要がある。鉄イオンの還元には膜貫通型の cytochrome b<sub>561</sub> ファミリーのヘムタンパク質 Dcytb が知られるようになり、Dcytb は特に小腸での 2 価鉄の取り込みには必須である。cytochrome b<sub>561</sub> ファミリーには 101F6, SDR2 を始めとする機能不明の膜貫通型のヘムタンパク質が知られており、それらはアスコルビン酸の産生と共役して種々の低分子物質の化合物の還元反応に関与している可能性が考えられる<sup>39)</sup>。一方、赤芽球系には鉄含有膜タンパク質 Steap3 が鉄イオンの還元に関与していることが知られている<sup>40)</sup>。また、生体膜の透過性に働くイオンチャネルのうちでジストロフィン依存性筋ジストロフィーに関連するカルシウム依存性 Slo1 BK チャネルは、保存されたヘム結合配列モチーフを有している。ヘムがヒト Slo1 チャネルおよびラットの脳にある野生型 BK チャネルを直接制御しているということが電気生理学的・構造学的な証拠によって示された。すなわち、酸化型と還元型のヘムが Slo1 チャネルタンパク質に結合して、チャネル開口頻度を減らすことにより膜透過 K<sup>+</sup> 電流を著しく阻害する。この BK チャネルの直接制御により、これまで知られていなかった急性のシグナル伝達分子としてのヘムの役割が明らかになった<sup>41)</sup>。

近年、種々のヘム結合タンパク質やヘム輸送タンパク質の発見が相次いでおり、それぞれのヘム利用は興味深い。HCP-1, OXG, ABCG2 などはヘムやポルフィリンの輸送に関係すると報告されているが、それらの機能には曖昧な点のあることが指摘されている。さらに、in

vitro での実験が生み出す artifact の可能性もあり、本来の機能解明にはまだまだ多くの検証が必要である。ヘムが可逆的にタンパク質に配位して機能を変換させ、また様々なガスのセンサーとして働いて細胞機能を緻密に調節することが、種々の遺伝病や変異生物の原因分子の性質の解明から明らかにされてきている。今後、さらなるヘムを始めとする小分子による機能制御の研究の発展が原因不明の疾病の解明につながることを期待してやまない。

**Key Words** : heme, transcription, nuclear receptor, heme oxygenase, ALAS1

Department of Biotechnology, Kyoto Institute of Technology  
Shigeru Taketani  
京都工芸繊維大学応用生物学部門 竹谷 茂

## 文 献

- 1) 古山和道, 佐々 茂 (2003) ヘム合成と鉄代謝. 生化学 **75**, 179-186
- 2) Taketani S (2005) Acquisition, mobilization and utilization of cellular iron and heme: endless findings and growing evidence of tight regulation. *Tohoku J Exp Med* **205**, 297-318
- 3) Shibahara S (1988) Regulation of heme oxygenase gene expression. *Semin Hematol* **25**, 370-376
- 4) Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M (2005) Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 558-567
- 5) Maines MD (1997) The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**, 517-554
- 6) Lathrop JT, Timko MP (1993) Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif. *Science* **259**, 522-525
- 7) Podvinez M, Handschin C, Looser R, Meyer UA (2004) Identification of the xenosensors regulating human 5-aminolevulinic synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 9127-9132
- 8) Wu N, Yin L, Hanniman EA, Joshi S, Lazar MA (2009) Negative feedback maintenance of heme homeostasis by its receptor, Rev-erbalpha. *Genes Dev* **23**, 2201-2209
- 9) Gotoh S, Nakamura T, Kataoka T, Taketani S (2009) Possible involvement of EGR-1 in transcriptional regulation of the mouse ALAS1 gene by heme. 第 32 回日本分子生物学会年会 (横浜 2009.12) 要旨集 2P-0231.
- 10) Sun J, Hoshino H, Takaku K, Nakajima O, Muto A, Suzuki H, Tashiro S, Takahashi S, Shibahara S, Alam J, Taketo MM, Yamamoto M, Igarashi K (2002) Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J* **21**, 5216-5224
- 11) Alam J, Igarashi K, Immenschuh S, Shibahara S, Tyrrell RM (2004) Regulation of heme oxygenase-1 gene transcription: recent advances and highlights from the International Conference (Uppsala, 2003) on Heme Oxygenase. *Antioxid Redox Signal* **6**, 924-933
- 12) Gilmore MM, Bishop TR (1999) The role of c-myc during the maturation of murine CFU-E. *Blood Cells Mol Dis* **25**, 68-77

- 13) Fukuda Y, Fujita H, Taketani S, Sassa S (1993) Dimethyl sulphoxide and haemin induce ferrochelatase mRNA by different mechanisms in murine erythroleukaemia cells. *Br J Haematol* **83**, 480-484
- 14) Sassa S, Nagai T (1996) The role of heme in gene expression. *Int J Hematol* **63**, 167-178
- 15) Chen JJ, London IM (1981) Hemin enhances the differentiation of mouse 3T3 cells to adipocytes. *Cell* **26**, 117-122
- 16) Swierczewski E, Pello JY, Arapinis C, Aron Y, Krishnamoorthy R (1987) Characterization of rat preadipocytes from normal rat adipose tissue by their effector response. *Biochem J* **248**, 383-387
- 17) Ishii DN, Maniatis GM (1978) Haemin promotes rapid neurite outgrowth in cultured mouse neuroblastoma cells. *Nature* **274**, 372-374
- 18) Bonyhady RE, Hendry IA, Hill CE, McLennan IS (1982) Effects of haemin on neurones derived from the neural crest. *Dev Neurosci* **5**, 125-129
- 19) Kumar S, Bandyopadhyay U (2005) Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* **157**, 175-188
- 20) Pfeifer K, Kim KS, Kogan S, Guarente L (1989) Functional dissection and sequence of yeast HAP1 activator. *Cell* **56**, 291-301
- 21) Gilles-Gonzalez MA, Gonzalez G (2005) Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. *J Inorg Biochem* **9**, 1-22
- 22) Ogawa K, Sun J, Taketani S, Nakajima O, Nishitani C, Sassa S, Hayashi N, Yamamoto M, Shibahara S, Fujita H, Igarashi K (2001) Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J* **20**, 2835-2843
- 23) Tahara T, Sun J, Nakanishi K, Yamamoto M, Mori H, Saito T, Fujita H, Igarashi K, Taketani S (2004) Heme positively regulates the expression of beta-globin at the locus control region via the transcriptional factor Bach1 in erythroid cells. *J Biol Chem* **279**, 5480-5487
- 24) Sultana S, Nirodi CS, Ram N, Prabhu L, Padmanaban G (1997) A 65-kDa protein mediates the positive role of heme in regulating the transcription of CYP2B1/B2 gene in rat liver. *J Biol Chem* **272**, 8895-8900
- 25) Reinking J, Lam MM, Pardee K, Sampson HM, Liu S, Yang P, Williams S, White W, Lajoie G, Edwards A, Krause HM (2005) The Drosophila nuclear receptor e75 contains heme and is gas responsive. *Cell* **122**, 195-207
- 26) Marvin KA, Reinking JL, Lee AJ, Pardee K, Krause HM, Burstyn JN (2009) Nuclear receptors homo sapiens Rev-erbbeta and Drosophila melanogaster E75 are thiolate-ligated heme proteins which undergo redox-mediated ligand switching and bind CO and NO. *Biochemistry* **48**, 7056-7071
- 27) Okano S, Zhou L, Kusaka T, Shibata K, Shimizu K, Gao X, Kikuchi Y, Togashi Y, Hosoya T, Takahashi S, Nakajima O, Yamamoto M (2010) Indispensable function for embryogenesis, expression and regulation of the nonspecific form of the 5-aminolevulinic synthase gene in mouse. *Gene to Cells* **15**, 77-89
- 28) Kaasik K, Lee CC (2004) Reciprocal regulation of haem biosynthesis and the circadian clock in mammals. *Nature* **430**, 467-471
- 29) Meng QJ, McMaster A, Beesley S, Lu WQ, Gibbs J, Parks D, Collins J, Farrow S, Donn R, Ray D, Loudon A (2008) Ligand modulation of REV-ERBalpha function resets the peripheral circadian clock in a phasic manner. *J Cell Sci* **121**(Pt 21), 3629-3635
- 30) Chawla A, Lazar MA (1993) Induction of Rev-ErbA alpha, an orphan receptor encoded on the opposite strand of the alpha-thyroid hormone receptor gene, during adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **268**, 16265-16269
- 31) Gotoh S, Ohgari Y, Nakamura T, Osumi T, Taketani S (2008) Heme-binding to the nuclear receptor retinoid X receptor alpha (RXRalpha) leads to the inhibition of the transcriptional activity. *Gene* **423**, 207-214
- 32) Igarashi J, Murase M, Iizuka A, Pichierri F, Martinkova M, Shimizu T (2008) Elucidation of the heme binding site of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase and the role of the regulatory motif in heme sensing by spectroscopic and catalytic studies of mutant proteins. *J Biol Chem* **283**, 18782-18791
- 33) Faller M, Matsunaga M, Yin S, Loo JA, Guo F (2007) Heme is involved in microRNA processing. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 23-29
- 34) Ishikawa H, Kato M, Hori H, Ishimori K, Kirisako T, Tokunaga F, Iwai K (2005) Involvement of heme regulatory motif in heme-mediated ubiquitination and degradation of IRP2. *Mol Cell* **19**, 171-181
- 35) Zumbrennen KB, Hanson ES, Leibold EA (2008) HOIL-1 is not required for iron-mediated IRP2 degradation in HEK293 cells. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 246-252
- 36) Vashisht AA, Zumbrennen KB, Huang X, Powers DN, Durazo A, Sun D, Bhaskaran N, Persson A, Uhlen M, Sangfelt O, Spruck C, Leibold EA, Wohlschlegel JA (2009) Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase. *Science* **326**, 718-721
- 37) Keel SB, Doty RT, Yang Z, Quigley JG, Chen J, Knoblaugh S, Kingsley PD, De Domenico I, Vaughn MB, Kaplan J, Palis J, Abkowitz JL (2008) A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* **319**, 825-828
- 38) O'Callaghan KM, Ayllon V, O'Keefe J, Wang Y, Cox OT, Loughran G, Forgac M, O'Connor R (2010) The heme binding protein HRG-1 is induced by IGF-1 and associates with the Vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase to control endosomal pH and receptor trafficking. *J Biol Chem* **285**, 381-391
- 39) McKie AT (2008) The role of Dcytb in iron metabolism: an update. *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 6), 1239-1241
- 40) Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, McDonald A, Chen J, Sharp JJ, Fujiwara Y, Barker JE, Fleming MD (2005) Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet* **37**, 1264-1269
- 41) Tang XD, Xu R, Reynolds MF, Garcia ML, Heinemann SH, Hoshi T (2003) Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels. *Nature* **425**, 531-535

## The low expression allele (IVS3-48C) of the ferrochelatase gene leads to low enzyme activity associated with erythropoietic protoporphyria

Tsuyoshi Tahara · Masayoshi Yamamoto ·  
Reiko Akagi · Hideo Harigae · Shigeru Taketani

Received: 4 October 2010 / Revised: 8 November 2010 / Accepted: 9 November 2010 / Published online: 4 December 2010  
© The Japanese Society of Hematology 2010

Erythropoietic protoporphyria (EPP) is an autosomal-dominant inherited disorder characterized biochemically by the excess accumulation and excretion of protoporphyrin, an intermediate precursor of heme biosynthesis. The enzyme abnormality that underlies protoporphyrin accumulation in EPP is a defect of ferrochelatase (FECH). Patients with EPP are clinically characterized by painful photosensitivity in skin and some (5–10%) exhibit liver failure due to massive hepatic accumulation of protoporphyrin [1, 2]. After we demonstrated the structure of the human *FECH* gene [3], more than 100 different kinds of molecular defects of FECH have been reported throughout the world. It has been reported that the low expression of a wild-type allelic variant *trans* to a mutated FECH allele is generally required for clinical expression of EPP [4]. According to this background, Gouya et al. [5] have found that the presence of a C at IVS3-48 in the human *FECH* gene causes the low expression of FECH. This intronic single nucleotide polymorphism (SNP) of the *FECH* gene, IVS3-48C/T transition, is key to the EPP phenotype. It is suggested that partially aberrant splicing of pre-mRNA by IVS3-48C is responsible for the clinical manifestations of EPP, although change in

the enzyme activity has not been examined. Here, we report mutations of the *FECH* gene associated with IVS3-48C in five Japanese EPP patients. We found that the FECH activity of peripheral blood lymphocytes with IVS3-48C/C was <50% of that with IVS3-48T/T suggesting that the variations of the activity in patients with EPP could be based on the different levels of control.

### 1 Mutation of the *FECH* gene in patients with EPP

We have diagnosed five patients with EPP in Japanese hospitals (Table 1). All patients suffered photosensitivity and three of them (patients 3, 4 and 5) developed hepatic dysfunction and died. Biochemical analysis of all patients showed marked elevation of protoporphyrin in erythrocytes. The FECH activity in peripheral blood lymphocytes of EPP patients decreased to 19–39% that of the control. After informed consent for all examinations had been obtained from patients and their families, blood samples were collected for genetic analysis. The total RNA was isolated by the guanidine thiocyanate method from lymphocytes or Epstein–Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. cDNAs were synthesized with oligo(dT) primer using ReveTra Ace (Toyobo Co. Ltd., Tokyo, Japan). The entire FECH protein-coding region was amplified by PCR using two synthetic primers, 5'-GAGGCTGCCCAGGC A-3' and 5'-TTTGCCTAACGCCACGGGGT-3'. The DNA fragments were ligated into pGEM-T vector (Promega Co., Madison, WI). Several plasmids-carrying FECH cDNA from a patient were isolated and the inserted DNAs were analyzed by sequencing. We found mutations in cDNAs. To confirm the mutation, we tried to analyze mutations of the *FECH* gene; namely, genomic DNA was isolated from whole blood cells. Regions containing molecular defects

T. Tahara · M. Yamamoto · S. Taketani (✉)  
Department of Biotechnology,  
Kyoto Institute of Technology,  
Kyoto 606-8585, Japan  
e-mail: taketani@kit.ac.jp

R. Akagi  
Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy,  
Yasuda Women's University, Hiroshima 731-0153, Japan

H. Harigae  
Department of Hematology and Rheumatology,  
Tohoku University Graduate School of Medicine,  
Sendai, Miyagi 980-8574, Japan

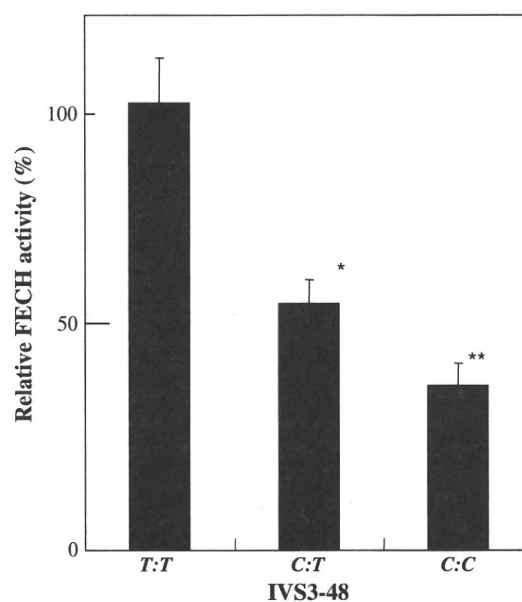
**Table 1** Characterization of Japanese patients with EPP in terms of phenotype and genotype

Patient no.	Sex	Age	Symptoms	Protoporphyrin in blood ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ RBC)	Mutation in FECH	Genotype of normal allele IVS3-48
1	M	23	Photosensitivity	1,424	IVS4(-4)a>g	C
2	M	33	Photosensitivity	9,274	$\Delta 5\text{b}$ (751-755)	C
3	M	41	Photosensitivity liver failure	12,574	T557C (I186T)	C
4	M	27	Photosensitivity liver failure	8,779	$\Delta 16\text{b}$ (574-589)	C
5	M	36	Photosensitivity liver failure	9,127	IVS9(+1)g>a	C

found in FECH cDNA were amplified with primers as previously reported [6]. The amplified DNAs were directly sequenced. Then, we identified five different mutations that were the same as those previously reported for Japanese and European patients [2]. The common mutations between Asians and Caucasians can be ascribed to their common ancestry.

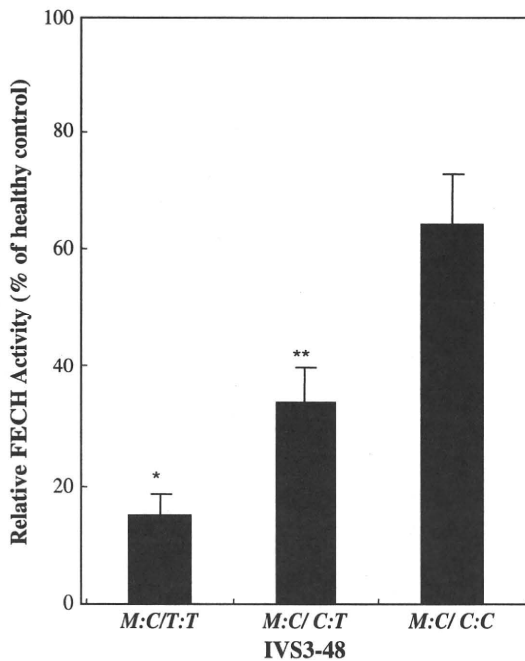
## 2 Relation of IVS3-48T/C of the FECH gene to Japanese EPP

The IVS3-48C/T transition of the FECH gene from EPP patients and their families was also analyzed. To amplify the DNA of the intron 3-exon 4 boundary (278 bp), the primers 5'-TCTACAACAAGAGAGCTGGC-3' and 5'-ATCCTG CCGTACTGCTCTTG-3' were used. Five Japanese EPP patients presented in this study were found to exhibit IVS3-48C of the normal allele (Table 1), which is consistent with the previous studies of Japanese [7], Caucasian and Asian EPP patients [2]. On the other hand, all carriers ( $n = 4$ ) in their families were found with IVS3-48T of the normal allele. Other possible low expression alleles of the FECH gene, such as -251 G/A and IVS1-23C/T transitions linked to the disease [4], were also examined for the five EPP families, but the examination was not conclusive. Thus, the variation of IVS3-48C/T transition in the FECH gene may explain the difference in the residual enzyme activities in asymptomatic and symptomatic mutant carriers. Alternatively, because EPP development requires with the mutated allele of the FECH gene as well as the allele with IVS3-48C, it can be said that EPP is a recessive-inherited disease in a broad sense. We examined the relationship of decreased FECH activity with the genotype of the FECH gene, including IVS3-48C/T transition. After the isolation of peripheral blood lymphocytes of EPP patients and Japanese healthy controls, we examined the FECH activity by the formation of zinc-mesoporphyrin [8]; namely, homogenates from lymphocytes were incubated with mesoporphyrin (10 nmol), zinc acetate (40 nmol), Tween 20 (0.01%), and sodium palmitate (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in 100 mM Tris-HCl, pH 8.0. The formation of Zn-mesoporphyrin was determined by



**Fig. 1** The FECH activity in peripheral blood T lymphocytes from healthy controls. Lymphocytes were isolated from healthy volunteers with IVS3-48T/T (T:T) ( $n = 9$ ), IVS3-48C/T (C:T) ( $n = 10$ ) and IVS3-48C/C (C:C) ( $n = 4$ ) of the FECH gene. The FECH activity was measured using homogenates. The activity of 100% is equivalent to  $67.2 \pm 6.5$  nmol Zn-mesoporphyrin formed/ $10^6$  cells/h at  $37^\circ\text{C}$  with IVS3-48T/T. \* $P < 0.01$ , C:T versus T:T; \*\* $P < 0.005$ , C:C versus T:T

HPLC with 5C18-5AR column ( $4.6 \times 150$  mm) (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). As shown in Fig. 1, the highest activity was observed in the genotype with IVS3-48T/T, a moderate level was shown with IVS3-48C/T, and the lowest level was with IVS3-48C/C. The FECH activity with IVS3-48C/C was only 38% of that with IVS3-48T/T. Then, we compared the FECH activities in EPP patients with those in healthy controls with IVS3-48C/C, C/T and T/T. As shown in Fig. 2, the activities in EPP patients relative to those of the controls were divided into three groups, which corresponded to 15, 35 and 64% of the controls, and these were dependent on the three genotypes. Various investigators have found that the FECH activities in EPP patients vary widely (8-45%), compared with those in controls [1, 9]. Some researchers reported that EPP seemed to exhibit



**Fig. 2** The FECH activity in EPP patients relative to that of healthy controls with IVS3-48C/T transition. The FECH activity in peripheral blood lymphocytes of patients with EPP (*M:C*) was measured by comparison with that of controls with IVS3-48T/T (*T:T*) ( $n = 4$ ), IVS3-48C/T (*C:T*) ( $n = 6$ ) and IVS3-48C/C (*C:C*) ( $n = 5$ ) of the gene. \*  $P < 0.01$ , *M:C/T:T* versus *M:C/C:C*; \*\* $P < 0.01$ , *M:C/C:T* versus *M:C/C:C*

autosomal recessive inheritance owing to the low enzyme activity [10]. We now demonstrate that this variation is derived from the three different genotypes of the *FECH* gene. Thus, heterozygotes with the low expression allele (IVS3-48C) in combination with a null allele would produce a small amount of FECH when compared with the normal group. Similarly, a low expression allele combined with a missense allele could explain the weak FECH activity observed in patients with EPP. Conversely, the FECH activities in healthy controls varied, the level of the relative FECH activities in EPP patients differed, depending on the different activities from the IVS3-48 genotypes of the *FECH* gene among controls. To estimate the frequency of IVS3-48C/T transition of the *FECH* gene in the Japanese population, analysis by single-strand conformation polymorphism (SSCP) using GeneGel Excel 12, 5/24 kit (GE Bioscience, Buckinghamshire, UK) was carried out with the genomic DNA of healthy volunteers. Of the 148 Japanese examined, the genotype with IVS3-48C/C was found in 32 (22%), IVS3-48C/T was in 68 (46%) and IVS3-48T/T was in 48

(32%). Thus, over half of the subjects have IVS3-48C. This value is similar to those reported for Asian people [2, 7]. Given that 10% of Caucasians have IVS3-48C, Asian people including Japanese face a higher risk of EPP. Although the reduced FECH activity is an important factor to diagnose EPP, it is difficult to evaluate EPP by FECH activity because of the high frequency of healthy controls with IVS3-48C in Asian populations.

**Acknowledgments** This work was supported in part by a Grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

## References

1. Taketani S, Fujita H. The ferrochelatase gene structure and molecular defects associated with erythropoietic protoporphyria. *J Bioenerg Biomembr*. 1995;27(2):231–8.
2. Gouya L, Martin-Schmitt C, Robreau AM, Austerlitz F, Da Silva V, Brun P, Simonin S, Lyoumi S, Grandchamp B, Beaumont C, Puy H, Deybach JC. Contribution of a common single-nucleotide polymorphism to the genetic predisposition for erythropoietic protoporphyria. *Am J Hum Genet*. 2006;78(1):2–14.
3. Taketani S, Inazawa J, Nakahashi Y, Abe T, Tokunaga R. Structure of the human ferrochelatase gene. Exon/intron gene organization and location of the gene to chromosome 18. *Eur J Biochem*. 1992;205(1):217–22.
4. Gouya L, Puy H, Lamoril J, Da Silva V, Grandchamp B, Nordmann Y, Deybach JC. Inheritance in erythropoietic protoporphyria: a common wild-type ferrochelatase allelic variant with low expression accounts for clinical manifestation. *Blood*. 1999;93(6):2105–10.
5. Gouya L, Puy H, Robreau AM, Bourgeois M, Lamoril J, Da Silva V, Grandchamp B, Deybach JC. The penetrance of dominant erythropoietic protoporphyria is modulated by expression of wildtype FECH. *Nat Genet*. 2002;30(1):27–8.
6. Schoenfeld N, Mamet R, Minder EI, Schneider-Yin X. A “null allele” mutation is responsible for erythropoietic protoporphyria in an Israeli patient who underwent liver transplantation: relationships among biochemical, clinical, and genetic parameters. *Blood Cells Mol Dis*. 2003;30(3):298–301.
7. Nakano H, Nakano A, Toyomaki Y, Ohashi S, Harada K, Moritsugu R, Takeda H, Kawada A, Mitsuhashi Y, Hanada K. Novel ferrochelatase mutations in Japanese patients with erythropoietic protoporphyria: high frequency of the splice site modulator IVS3-48C polymorphism in the Japanese population. *J Invest Dermatol*. 2006;126(12):2717–9.
8. Taketani S. Measurement of ferrochelatase activity. In: Maines MD, Costa LC, Reed DJ, Sassa S, Sipes JG, editors. 1999 Current protocols in toxicology, vol 1, Suppl 2. New York: Wiley, unit 8.7.1–8.7.8.
9. Elder GH, Gouya L, Whatley SD, Puy H, Badminton MN, Deybach JC. The molecular genetics of erythropoietic protoporphyria. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2009;5(2):118–26.
10. Sarkany RP, Alexander GJ, Cox TM. Recessive inheritance of erythropoietic protoporphyria with liver failure. *Lancet*. 1994;343(8910):1394–6.

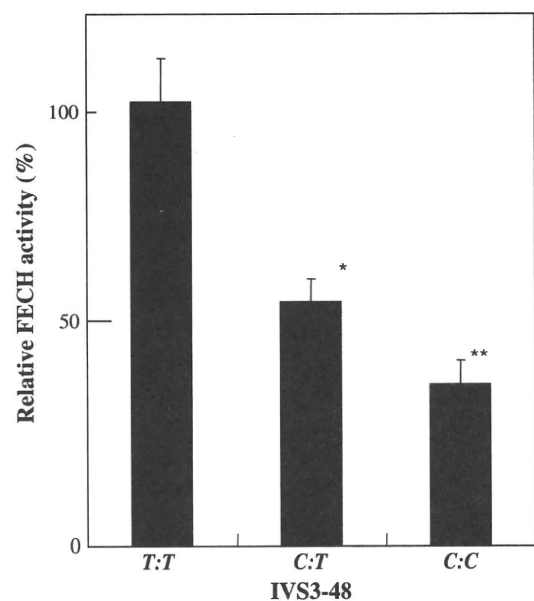
**Table 1** Characterization of Japanese patients with EPP in terms of phenotype and genotype

Patient no.	Sex	Age	Symptoms	Protoporphyrin in blood ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ RBC)	Mutation in FECH	Genotype of normal allele IVS3-48
1	M	23	Photosensitivity	1,424	IVS4(-4)a>g	C
2	M	33	Photosensitivity	9,274	$\Delta 5\text{b}$ (751-755)	C
3	M	41	Photosensitivity liver failure	12,574	T557C (I186T)	C
4	M	27	Photosensitivity liver failure	8,779	$\Delta 16\text{b}$ (574-589)	C
5	M	36	Photosensitivity liver failure	9,127	IVS9(+1)g>a	C

found in FECH cDNA were amplified with primers as previously reported [6]. The amplified DNAs were directly sequenced. Then, we identified five different mutations that were the same as those previously reported for Japanese and European patients [2]. The common mutations between Asians and Caucasians can be ascribed to their common ancestry.

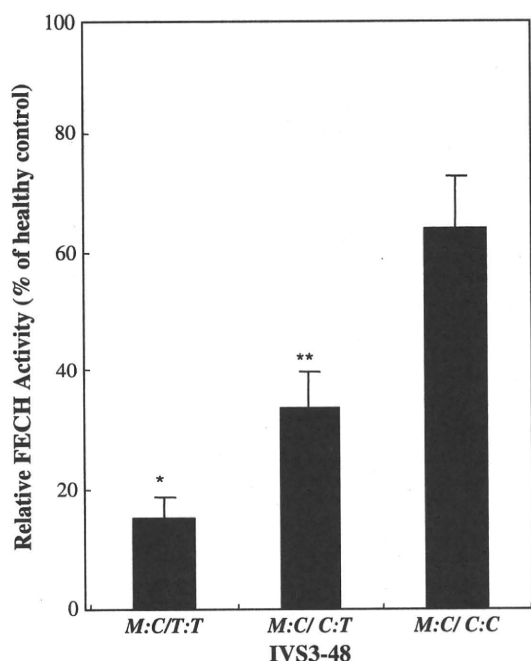
## 2 Relation of IVS3-48T/C of the FECH gene to Japanese EPP

The IVS3-48C/T transition of the FECH gene from EPP patients and their families was also analyzed. To amplify the DNA of the intron 3-exon 4 boundary (278 bp), the primers 5'-TCTACAACAAGAGAGCTGGC-3' and 5'-ATCCTGCGGTACTGCTCTTG-3' were used. Five Japanese EPP patients presented in this study were found to exhibit IVS3-48C of the normal allele (Table 1), which is consistent with the previous studies of Japanese [7], Caucasian and Asian EPP patients [2]. On the other hand, all carriers ( $n = 4$ ) in their families were found with IVS3-48T of the normal allele. Other possible low expression alleles of the FECH gene, such as -251 G/A and IVS1-23C/T transitions linked to the disease [4], were also examined for the five EPP families, but the examination was not conclusive. Thus, the variation of IVS3-48C/T transition in the FECH gene may explain the difference in the residual enzyme activities in asymptomatic and symptomatic mutant carriers. Alternatively, because EPP development requires with the mutated allele of the FECH gene as well as the allele with IVS3-48C, it can be said that EPP is a recessive-inherited disease in a broad sense. We examined the relationship of decreased FECH activity with the genotype of the FECH gene, including IVS3-48C/T transition. After the isolation of peripheral blood lymphocytes of EPP patients and Japanese healthy controls, we examined the FECH activity by the formation of zinc-mesoporphyrin [8]; namely, homogenates from lymphocytes were incubated with mesoporphyrin (10 nmol), zinc acetate (40 nmol), Tween 20 (0.01%), and sodium palmitate (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in 100 mM Tris-HCl, pH 8.0. The formation of Zn-mesoporphyrin was determined by



**Fig. 1** The FECH activity in peripheral blood T lymphocytes from healthy controls. Lymphocytes were isolated from healthy volunteers with IVS3-48T/T (T:T) ( $n = 9$ ), IVS3-48C/T (C:T) ( $n = 10$ ) and IVS3-48C/C (C:C) ( $n = 4$ ) of the FECH gene. The FECH activity was measured using homogenates. The activity of 100% is equivalent to  $67.2 \pm 6.5$  nmol Zn-mesoporphyrin formed/ $10^6$  cells/h at  $37^\circ\text{C}$  with IVS3-48T/T. \* $P < 0.01$ , C:T versus T:T; \*\* $P < 0.005$ , C:C versus T:T

HPLC with 5C18-5AR column ( $4.6 \times 150$  mm) (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). As shown in Fig. 1, the highest activity was observed in the genotype with IVS3-48T/T, a moderate level was shown with IVS3-48C/T, and the lowest level was with IVS3-48C/C. The FECH activity with IVS3-48C/C was only 38% of that with IVS3-48T/T. Then, we compared the FECH activities in EPP patients with those in healthy controls with IVS3-48C/C, C/T and T/T. As shown in Fig. 2, the activities in EPP patients relative to those of the controls were divided into three groups, which corresponded to 15, 35 and 64% of the controls, and these were dependent on the three genotypes. Various investigators have found that the FECH activities in EPP patients vary widely (8-45%), compared with those in controls [1, 9]. Some researchers reported that EPP seemed to exhibit



**Fig. 2** The FECH activity in EPP patients relative to that of healthy controls with IVS3-48C/T transition. The FECH activity in peripheral blood lymphocytes of patients with EPP (*M:C*) was measured by comparison with that of controls with IVS3-48T/T (*T:T*) ( $n = 4$ ), IVS3-48C/T (*C:T*) ( $n = 6$ ) and IVS3-48C/C (*C:C*) ( $n = 5$ ) of the gene. \*  $P < 0.01$ , *M:C/T:T* versus *M:C/C:C*; \*\* $P < 0.01$ , *M:C/C:T* versus *M:C/C:C*

autosomal recessive inheritance owing to the low enzyme activity [10]. We now demonstrate that this variation is derived from the three different genotypes of the *FECH* gene. Thus, heterozygotes with the low expression allele (IVS3-48C) in combination with a null allele would produce a small amount of FECH when compared with the normal group. Similarly, a low expression allele combined with a missense allele could explain the weak FECH activity observed in patients with EPP. Conversely, the FECH activities in healthy controls varied, the level of the relative FECH activities in EPP patients differed, depending on the different activities from the IVS3-48 genotypes of the *FECH* gene among controls. To estimate the frequency of IVS3-48C/T transition of the *FECH* gene in the Japanese population, analysis by single-strand conformation polymorphism (SSCP) using GeneGel Excel 12, 5/24 kit (GE Bioscience, Buckinghamshire, UK) was carried out with the genomic DNA of healthy volunteers. Of the 148 Japanese examined, the genotype with IVS3-48C/C was found in 32 (22%), IVS3-48C/T was in 68 (46%) and IVS3-48T/T was in 48

(32%). Thus, over half of the subjects have IVS3-48C. This value is similar to those reported for Asian people [2, 7]. Given that 10% of Caucasians have IVS3-48C, Asian people including Japanese face a higher risk of EPP. Although the reduced FECH activity is an important factor to diagnose EPP, it is difficult to evaluate EPP by FECH activity because of the high frequency of healthy controls with IVS3-48C in Asian populations.

**Acknowledgments** This work was supported in part by a Grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

## References

1. Taketani S, Fujita H. The ferrochelatase gene structure and molecular defects associated with erythropoietic protoporphyria. *J Bioenerg Biomembr.* 1995;27(2):231–8.
2. Gouya L, Martin-Schmitt C, Robreau AM, Austerlitz F, Da Silva V, Brun P, Simonin S, Lyoumi S, Grandchamp B, Beaumont C, Puy H, Deybach JC. Contribution of a common single-nucleotide polymorphism to the genetic predisposition for erythropoietic protoporphyria. *Am J Hum Genet.* 2006;78(1):2–14.
3. Taketani S, Inazawa J, Nakahashi Y, Abe T, Tokunaga R. Structure of the human ferrochelatase gene. Exon/intron gene organization and location of the gene to chromosome 18. *Eur J Biochem.* 1992;205(1):217–22.
4. Gouya L, Puy H, Lamoril J, Da Silva V, Grandchamp B, Nordmann Y, Deybach JC. Inheritance in erythropoietic protoporphyria: a common wild-type ferrochelatase allelic variant with low expression accounts for clinical manifestation. *Blood.* 1999;93(6):2105–10.
5. Gouya L, Puy H, Robreau AM, Bourgeois M, Lamoril J, Da Silva V, Grandchamp B, Deybach JC. The penetrance of dominant erythropoietic protoporphyria is modulated by expression of wildtype FECH. *Nat Genet.* 2002;30(1):27–8.
6. Schoenfeld N, Mamet R, Minder EI, Schneider-Yin X. A “null allele” mutation is responsible for erythropoietic protoporphyria in an Israeli patient who underwent liver transplantation: relationships among biochemical, clinical, and genetic parameters. *Blood Cells Mol Dis.* 2003;30(3):298–301.
7. Nakano H, Nakano A, Toyomaki Y, Ohashi S, Harada K, Moritsugu R, Takeda H, Kawada A, Mitsuhashi Y, Hanada K. Novel ferrochelatase mutations in Japanese patients with erythropoietic protoporphyria: high frequency of the splice site modulator IVS3-48C polymorphism in the Japanese population. *J Invest Dermatol.* 2006;126(12):2717–9.
8. Taketani S. Measurement of ferrochelatase activity. In: Maines MD, Costa LC, Reed DJ, Sassa S, Sipes JG, editors. 1999 Current protocol in toxicology, vol 1, Suppl 2. New York: Wiley, unit 8.7.1–8.7.8.
9. Elder GH, Gouya L, Whatley SD, Puy H, Badminton MN, Deybach JC. The molecular genetics of erythropoietic protoporphyria. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2009;5(2):118–26.
10. Sarkany RP, Alexander GJ, Cox TM. Recessive inheritance of erythropoietic protoporphyria with liver failure. *Lancet.* 1994;343(8910):1394–6.

## Porcine Ferrochelatase: The Relationship between Iron-Removal Reaction and the Conversion of Heme to Zn-Protoporphyrin

Tuan Thanh CHAU,<sup>1</sup> Mutsumi ISHIGAKI,<sup>1</sup> Takao KATAOKA,<sup>1</sup> and Shigeru TAKETANI<sup>1,2,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585, Japan

<sup>2</sup>Insect Biomedical Center, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585, Japan

Received February 2, 2010; Accepted April 19, 2010; Online Publication, July 7, 2010

[doi:10.1271/bbb.100078]

At the terminal step of heme biosynthesis, ferrochelatase (FECH) catalyzes the insertion of Fe<sup>2+</sup> into protoporphyrin to form heme. It is located on the inner membrane of the mitochondria of animals. The enzyme inserts divalent metal ions, including Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, and Zn<sup>2+</sup>, into porphyrins *in vitro*. We have reported that it can remove Fe<sup>2+</sup> from heme. To characterize the iron-removal reverse activity of FECH, we examined its properties in porcine liver and muscle mitochondria, and isolated porcine FECH cDNA. The amino acid sequence of porcine FECH showed high homology with bovine (91%), human (85%), mouse (87%), and rat (76%) equivalents. It was expressed in *Escherichia coli*, and purified, and the kinetic properties of the zinc-chelating and iron-removal activities were examined. Both activities peaked at 45 °C, but different optimal pH values, of 7.5–8.0 for zinc-ion insertion and 5.5–6.0 for the reverse reaction were found. The K<sub>m</sub> values for mesoporphyrin IX and Zn<sup>2+</sup> were 6.6 and 1.1 μM, respectively, and the K<sub>m</sub> for heme was 5.7 μM. The k<sub>cat</sub> value of the forward reaction was about 11-fold higher than that of the reverse reaction, indicating that the enzyme preferably catalyzes the forward reaction rather than the iron-removal reaction. Reverse activity was stimulated by fatty acids and phospholipids, similarly to the case of the forward reaction, indicating that lipids play a role in regulating both enzyme activities.

**Key words:** ferrochelatase; iron-removal reaction; Zn-protoporphyrin; porcine muscle mitochondria; cDNA cloning

At the terminal step of the heme-biosynthesis pathway, ferrochelatase (FECH) (EC 4.99.1.1), located on the inner membrane of the mitochondria, catalyzes the insertion of ferrous ions into protoporphyrin IX to form protoheme.<sup>1)</sup> FECH protein has a molecular mass of 40–42 kDa on SDS-PAGE analysis. Mammalian FECH is active as an homodimer, as analyzed by radiation inactivation and X-ray crystallography,<sup>2,3)</sup> and contains an iron-sulfur cluster as a functional group.<sup>3,4)</sup> Some lipids promote its enzyme activity,<sup>1,5)</sup> while this activity is inhibited by heavy metal ions, such as lead and mercury.<sup>1)</sup> Ferrous ions are the target of the enzyme

*in vivo*, while other divalent metal ions, including zinc, cobalt, and tin, are also utilized to form other metalloporphyrins *in vitro*.<sup>1,6)</sup>

Both the cDNA and the gene for FECH have been isolated and sequenced from micro-organisms, plants, and animals, including humans, the cow, the mouse, and the rat.<sup>2)</sup> The mammalian enzymes from humans, the bovine, the mouse and the rat have been expressed in the active form in *E. coli*. The kinetic properties of the enzyme were examined.<sup>1,2)</sup>

Although iron is an essential element for living cells, an excess of intracellular ferric ions can be toxic.<sup>7)</sup> Uncommitted heme in the cells is also very dangerous for the maintenance of living systems.<sup>8,9)</sup> Therefore, reutilization of iron, including degradation of the heme, catalyzed by heme oxygenase, is essential for the homeostasis of iron in cells. Recently, we reported that the removal of ferrous ions from heme occurred *in vivo*, and that FECH removed iron from heme *in vitro*,<sup>10)</sup> but the role of the reaction in removing iron *in vivo* is not clear.

The red pigment of cured ham is usually due to nitrosomyoglobin, a product of the thermal treatment of meat with nitrite. Nitrosamines can be generated in that process during storage or shelving period.<sup>11,12)</sup> Therefore, nitrite-free ham is a preferred alternative. Dry-cured ham (Parma ham), which is nitrite-free, is made from porcine muscle with only sea salt at a suitable temperature for long periods.<sup>13)</sup> The main component of the red pigment of the ham has been found to be Zn-protoporphyrin,<sup>10,14)</sup> a pigment stable under air exposure and heating.<sup>15)</sup> Although the mechanism involved in the formation of Zn-protoporphyrin during the production of dry ham is unclear, formation in the muscle may be related to mitochondria and enzyme catalysis.<sup>16)</sup> Very recently, we found that FECH is involved mainly in the formation of Zn-protoporphyrin *via* iron-removal reverse reaction,<sup>10)</sup> but little attention has been paid to the characteristics and kinetic properties of the reverse reaction of FECH.

Here, we characterized FECH in porcine liver and muscle mitochondria. Then we isolated the FECH cDNA, the actively expressed enzyme in *E. coli*, and purified it. The catalytic properties of the forward and reverse reactions were compared.

The nucleotide sequence will appear in the Genbank/DDBJ Nucleotide Sequence Database under accession no. AB530166.

† To whom correspondence should be addressed. Fax: +81-75-724-7789; E-mail: taketani@kit.ac.jp

Abbreviations: FECH, ferrochelatase; SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; MDH, malate dehydrogenase

## Materials and Methods

**Materials.** Restriction endonucleases and DNA-modifying enzymes were obtained from Takara (Tokyo) and Toyobo (Tokyo). Mesoporphyrin IX, protoporphyrin IX, and Zn-protoporphyrin were from Frontier Scientific (Logan, UT). Hemin-imidazole was prepared as previously described.<sup>10</sup> Pig kidney LLC-PK1 cells were obtained from the Japan Cell Bank (Saitama, Japan). Porcine livers and muscles were generously donated by Itoh Ham Inc. (Moriya, Japan). The antibodies for ferrochelatase used were as described previously<sup>17</sup> and the antibodies for malate dehydrogenase (MDH) were obtained from Calzyme Laboratories (San Luis, CA). All other chemicals used were of analytical grade.

**Isolation of mitochondria.** Pig muscle and liver were suspended in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.25 M sucrose (6.0 ml/g) and homogenized at 4°C. The homogenates were centrifuged at 600 × g for 10 min at 4°C, and then the supernatants were centrifuged at 12,000 × g for 10 min at 4°C. After they were washed twice, the pellets (mitochondrial fraction) were dissolved with the above solution and stored at -20°C. The protein concentration was measured by the method of Lowry *et al.*<sup>18</sup> or that of Bradford,<sup>19</sup> using BSA as standard.

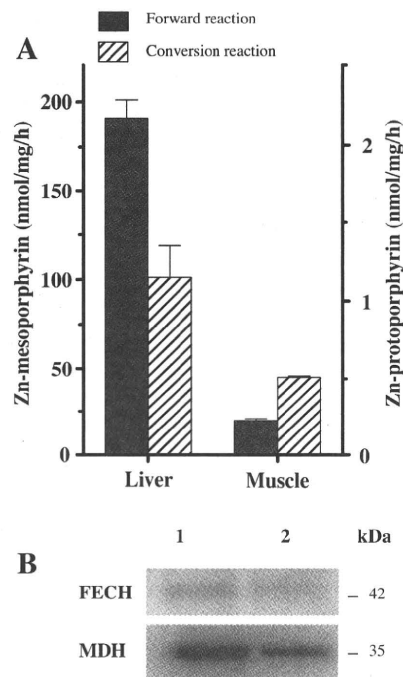
**DNA cloning.** Total RNA was isolated from LLC-PK1 cells using RNAsol Super (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), and poly(A)<sup>+</sup>-rich RNA was obtained with oligo(dT) cellulose (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Single-strand cDNA was synthesized using an oligo(dT) primer (GE Healthcare). For isolation of porcine FECH cDNA, several primers for PCR were designed on the basis of the cDNA of human, mouse, and bovine FECH. The primers finally used for DNA amplification were as follows: forward (PoF1: 5'-AAGAATTCAATGCTTTTCAGTCCGGCACA-3'), and reverse (PoR: 5'-AAAAGCTTCACAGCTGGCTGGT-3'). After PCR was completed, the product was separated on a 1.1% agarose gel, digested with *EcoRI* and *HindIII*, and ligated into *EcoRI/HindIII*-digested pBluescript II KS<sup>+</sup> vector (Stratagene, La Jolla, CA). The inserted fragment of the plasmid was confirmed by determining the nucleotide sequence.

**Expression of porcine FECH.** To express porcine FECH in bacteria, the cDNA was amplified with a second forward primer (PoF2: 5'-AAGAATTCAAGCCCCAACTTCAAGT-3') and the reverse primer PoR described above. The resulting DNA fragment was ligated into *EcoRI/HindIII*-digested pET carrying His-tagged expression vector (Merk, Darmstadt, Germany), and the plasmid obtained was transferred to *E. coli*, BL21. The bacteria were grown in LB medium for 16 h, and then the culture medium was diluted by 10-fold in fresh LB medium. The enzyme was expressed with 0.3 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside at 30°C for 2 h.

**Purification of recombinant ferrochelatase.** The cells were harvested by centrifugation and suspended in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.1% Tween 20, 20 mM imidazole, and 0.3 M NaCl. They were disrupted by sonication and centrifuged at 5,000 × g at 4°C for 10 min. The supernatants were shaken with Ni<sup>2+</sup>-NTA beads (Qiagen, Valencia, CA), and washed 3 times with the above solution. The enzyme was eluted with 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10% glycerol, 0.1% Tween 20, 0.25 M imidazole, and 0.3 M NaCl.

**Immunoblotting.** The proteins were analyzed by SDS-PAGE, and stained with Coomassie Brilliant Blue or electroblotted onto a polyvinylidenedifluoride membrane. Immunoblotting was carried out using anti-ferrochelatase as primary antibody.<sup>16</sup>

**Enzyme assay.** FECH activity was determined by measuring the insertion of zinc into mesoporphyrin, as described previously.<sup>20</sup> For examination of the reverse activity of FECH, a reaction mixture containing 10  $\mu$ M hemin-imidazole, 2 mM ascorbic acid and 10 mM potassium phosphate buffer (pH 5.5) in a final volume of 1.0 ml in a Thunberg vacuum tube was used. The dissolved gas was removed *in vacuo*. The reaction was carried out at 45°C for 1 h. To measure the conversion of heme to zinc-protoporphyrin, 20  $\mu$ M zinc ions was added to the reaction mixture. After incubation, the protoporphyrin or zinc-protoporphyrin formed was measured fluorophotometrically.<sup>10</sup>



**Fig. 1.** Characterization of Porcine FECH in the Muscle and Liver, and the Activity of Porcine Liver and Muscle FECH.

**A.** For the forward reaction, liver and muscle mitochondria were incubated with 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% Tween 20, 15  $\mu$ M mesoporphyrin IX, and 40  $\mu$ M zinc acetate in a final volume of 200  $\mu$ l at 37°C for 60 min. The formation of Zn-mesoporphyrin was measured. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. For the conversion of heme to Zn-protoporphyrin, a reaction mixture containing liver or muscle mitochondria (0.2–1.0 mg, protein), 10 mM potassium phosphate buffer, pH 5.5, 10  $\mu$ M hemin-imidazole, 50  $\mu$ M zinc acetate, and 200  $\mu$ M NADH was used, in a final volume of 1.0 ml. The reaction was carried out at 45°C for 60 min. The formation of Zn-mesoporphyrin or Zn-protoporphyrin was measured. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. **B.** Immunoblot analysis. Immunoblotting was performed with liver (lane 1) and muscle (lane 2) mitochondria, using anti-FECH and anti-MDH as the primary antibodies. Liver and muscle mitochondria (5  $\mu$ g of protein) loaded into slots were used.

## Results

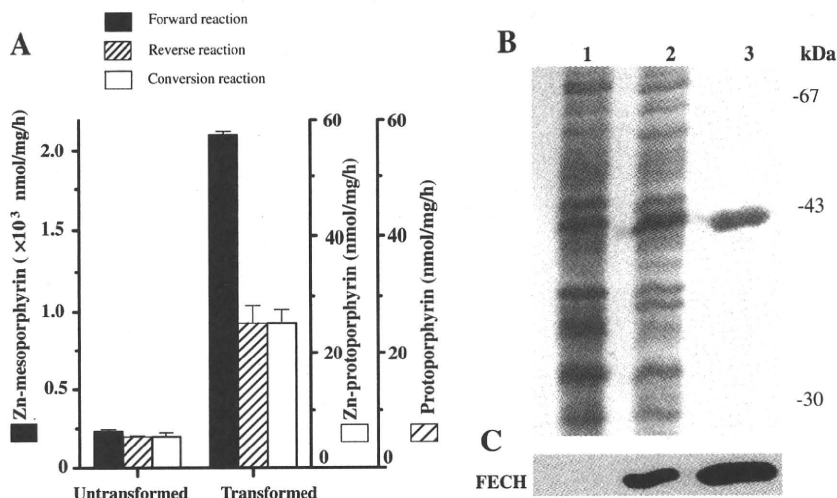
### Characterization of FECH in porcine liver and muscle

To characterize muscle FECH, mitochondria were isolated from porcine liver and muscle by centrifugation and FECH activity was examined. The formation of Zn-mesoporphyrin in the muscle mitochondria was much lower than in the liver mitochondria (Fig. 1A). We also examined the reverse activity of FECH by measuring the conversion of heme to Zn-protoporphyrin. The conversion activity in the muscle mitochondria was about 40% of that in the liver mitochondria (Fig. 1A). Then the proteins in the mitochondria were analyzed by SDS-PAGE and transferred onto a membrane, and immunoblotting was performed using antibodies for bovine FECH and for the mitochondrial matrix protein, MDH (Fig. 1B). The results indicated that FECH was expressed in both tissues, and the amount of FECH in the muscle was low as compared with that of the hepatic enzyme.

### Cloning of porcine FECH cDNA

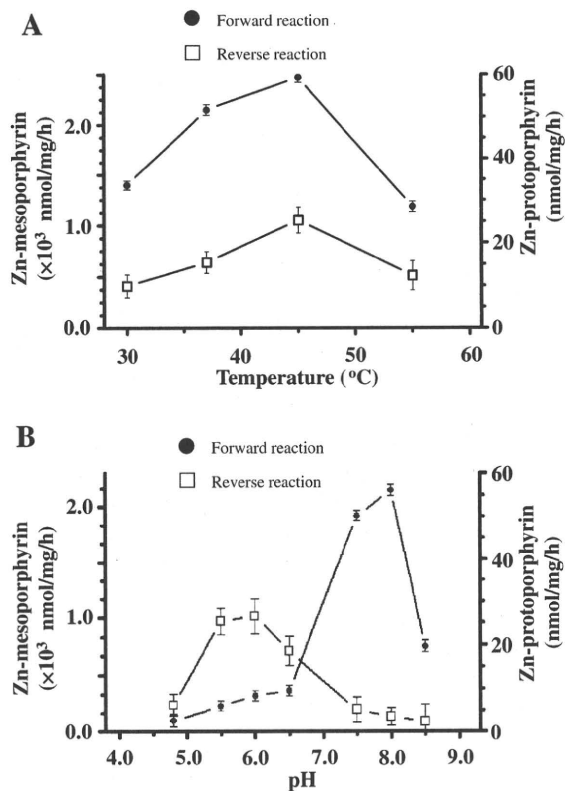
To isolate porcine FECH cDNA, mRNA was isolated from kidney LLC-PK1 cells, and PCR using specific

Porcine	1	MLSVGTNMAAALRS	GA	VL	LD	LLVYGGSRACQP	WR	CS	GM	AAAA	--	EAVQHARSPK	QV	58																																																
Bovine	1	-----MAAALRS	AG	VLLR	DR	LLYGGSRACQ	PR	RC	SG	AATA	AAAA	TETAQRARS	PK	53																																																
Human	1	M	RS	L	G	A	N	M	A	A	A	L	R	A	G	V	L	L	R	D	P	L	A	S	S	S	W	R	V	C	Q	P	W	R	W	K	S	G	A	A	A	A	A	V	T	T	E	A	H	A	Q	A	K	P	Q	V	60					
Mouse	1	M	L	S	A	S	A	N	M	A	A	A	L	R	A	G	A	L	L	R	E	P	L	V	H	G	S	S	R	A	C	Q	P	W	R	C	S	G	A	A	V	A	A	T	T	E	K	V	-	H	H	A	K	T	T	K	P	Q	A	59		
Rat	1	M	A	V	L	G	C	-----	A	C	R	L	V	-	L	V	R	C	G	S	P	V	L	C	L	S	S	L	-	R	R	O	S	T	-	A	T	A	A	A	F	N	T	-	A	T	-	-	P	E	T	47										
Porcine	59	Q	T	G	N	R	K	P	K	T	G	I	L	M	N	M	G	G	P	E	T	V	G	E	V	Q	D	F	L	R	R	L	F	D	D	L	M	S	L	P	I	O	N	K	L	G	P	F	I	A	K	R	R	T	P	K	I	Q	118			
Bovine	54	Q	P	G	N	R	K	P	R	T	G	I	L	M	N	M	G	G	P	E	T	V	E	E	V	Q	D	F	L	R	L	F	D	D	L	M	L	P	V	O	D	K	L	G	P	F	I	A	K	R	R	T	P	K	I	Q	113					
Human	61	Q	Q	K	R	K	P	K	T	G	I	L	M	N	M	G	G	P	E	T	L	G	D	V	H	D	F	L	R	L	F	D	R	D	L	M	L	P	I	O	N	K	L	A	P	F	I	A	K	R	R	T	P	K	I	Q	120					
Mouse	60	Q	P	E	R	R	K	P	K	T	G	I	L	M	N	M	G	G	P	E	T	L	G	E	V	Q	D	F	L	R	L	F	D	R	D	L	M	L	P	I	O	N	K	L	A	P	F	I	A	K	R	R	T	P	K	I	Q	119				
Rat	48	K	-	E	S	R	K	P	K	T	G	I	L	M	N	M	G	G	P	E	K	L	E	D	V	H	D	F	L	R	L	F	M	D	T	D	L	M	L	P	V	O	N	K	L	G	P	F	I	A	K	R	R	T	P	K	I	Q	106			
Porcine	119	E	Q	Y	R	R	I	G	G	G	S	P	I	K	M	W	T	R	K	Q	A	E	G	M	V	K	L	D	E	L	S	P	H	T	A	P	H	K	Y	I	G	F	R	Y	V	H	P	L	T	E	E	A	I	E	M	E	R	D	178			
Bovine	114	E	Q	Y	R	R	I	G	G	G	S	P	I	K	M	W	T	S	K	Q	E	G	M	V	K	L	D	E	L	S	P	H	T	A	P	H	K	Y	I	G	F	R	Y	V	H	P	L	T	E	E	A	I	E	M	E	R	D	173				
Human	121	E	Q	Y	R	R	I	G	G	G	S	P	I	K	I	W	T	S	K	Q	E	G	M	V	K	L	D	E	L	S	P	N	T	A	P	H	K	Y	I	G	F	R	Y	V	H	P	L	T	E	E	A	I	E	M	E	R	D	180				
Mouse	120	E	Q	Y	R	R	I	G	G	G	S	P	I	K	M	W	T	S	K	Q	E	G	M	V	K	L	D	E	L	S	P	A	T	A	P	H	K	Y	I	G	F	R	Y	V	H	P	L	T	E	E	A	I	E	M	E	R	D	179				
Rat	107	E	Q	Y	S	K	I	G	G	G	S	P	I	K	A	W	T	M	Q	E	G	M	V	K	L	D	E	M	C	P	D	T	A	P	H	K	F	I	G	F	R	Y	V	H	P	L	T	E	E	A	I	E	L	M	E	K	D	166				
Porcine	179	G	L	E	R	A	I	A	F	T	Q	Y	P	Q	Y	S	C	S	T	T	G	S	S	L	N	A	I	Y	R	Y	N	E	V	G	K	P	T	M	K	W	S	T	I	D	R	W	P	T	H	L	L	I	O	C	F	A	D	H	238			
Bovine	174	G	L	E	R	A	V	A	F	T	Q	Y	P	Q	Y	S	C	S	T	T	G	S	S	L	N	A	I	Y	R	Y	N	E	V	G	R	K	P	T	M	K	W	S	T	I	D	R	W	P	T	H	L	L	I	O	C	F	A	D	H	233		
Human	181	G	L	E	R	A	I	A	F	T	Q	Y	P	Q	Y	S	C	S	T	T	G	S	S	L	N	A	I	Y	R	Y	N	O	V	G	R	K	P	T	M	K	W	S	T	I	D	R	W	P	T	H	L	L	I	O	C	F	A	D	H	240		
Mouse	180	G	L	E	R	A	I	A	F	T	Q	Y	P	Q	Y	S	C	S	T	T	G	S	S	L	N	A	I	Y	R	Y	N	E	V	G	Q	K	P	T	M	K	W	S	T	I	D	R	W	P	T	H	L	L	I	O	C	F	A	D	H	239		
Rat	167	G	V	E	R	A	V	A	F	T	Q	Y	P	Q	Y	S	C	S	T	T	G	S	S	L	N	A	I	Y	R	Y	S	N	R	A	D	R	P	K	M	R	S	V	I	D	R	W	P	T	H	L	L	I	O	C	F	A	E	H	226			
Porcine	239	I	L	K	E	L	D	H	F	P	P	E	K	R	E	V	V	I	L	F	S	A	H	S	L	P	M	S	V	V	N	R	G	D	P	Y	P	Q	E	V	G	A	T	V	O	R	V	M	D	K	L	G	Y	S	N	P	Y	R	L	V	298	
Bovine	234	I	L	K	E	L	D	H	F	P	P	E	K	R	E	V	V	I	L	F	S	A	H	S	L	P	M	S	V	V	N	R	G	D	P	Y	P	Q	E	V	G	A	T	V	O	R	V	M	D	K	L	G	Y	S	N	P	Y	R	L	V	293	
Human	241	I	L	K	E	L	D	H	F	P	L	E	K	R	E	V	V	I	L	F	S	A	H	S	L	P	M	S	V	V	N	R	G	D	P	Y	P	Q	E	V	S	A	T	V	O	K	V	M	E	R	C	N	P	Y	R	L	V	300				
Mouse	240	I	L	K	E	L	N	H	F	P	E	E	K	R	E	V	V	I	L	F	S	A	H	S	L	P	M	S	V	V	N	R	G	D	P	Y	P	Q	E	V	G	A	T	V	H	K	V	M	E	K	L	G	Y	P	N	P	Y	R	L	V	299	
Rat	227	V	R	N	E	L	D	K	F	P	V	E	K	R	D	V	V	I	L	F	S	A	H	S	L	P	L	S	V	V	N	R	G	D	P	Y	P	L	E	V	G	A	T	V	O	R	V	M	D	R	L	G	H	C	N	P	Y	R	L	V	286	
Porcine	299	W	Q	S	K	V	G	P	M	P	W	L	G	P	Q	T	D	E	A	I	K	G	L	C	E	R	G	R	K	N	I	L	L	V	P	I	A	F	T	S	D	H	I	E	T	L	Y	E	L	D	I	E	Y	S	Q	V	L	G	S	E	C	358
Bovine	294	W	Q	S	K	V	G	P	M	P	W	L	G	P	Q	T	D	E	A	I	K	G	L	C	E	R	G	R	K	N	I	L	L	V	P	I	A	F	T	S	D	H	I	E	T	L	Y	E	L	D	I	E	Y	S	Q	V	L	A	S	E	C	353
Human	301	W	Q	S	K	V	G	P	M	P	W	L	G	P	Q	T	D	E	S	I	K	G	L	C	E	R	G	R	K	N	I	L	L	V	P	I	A	F	T	S	D	H	I	E	T	L	Y	E	L	D	I	E	Y	S	Q	V	L	A	K	E	C	360
Mouse	300	W	Q	S	K	V	G	P	M	P	W	L	G	P	Q	T	D	E	A	I	K	G	L	C	E	R	G	R	K	N	I	L	L	V	P	I	A	F	T	S	D	H	I	E	T	L	Y	E	L	D	I	E	Y	S	Q	V	L	A	Q	K	C	359
Rat	287	W	Q	S	K	V	G	P	M	A	W	L	G	P	Q	T	D	E	V	I	K	G	L	C	O	R	G	K	R	N	I	L	L	V	P	I	A	F	T	S	D	H	I	E	T	L	H	E	L	D	I	E	Y	S	Q	V	L	G	E	V	346	
Porcine	359	G	A	E	N	I	R	R	A	E	S	L	N	G	N	P	L	F	S	K	A	L	A	D	L	V	H	S	H	I	Q	S	N	E	R	C	S	T	Q	L	T	L	S	C	P	L	C	V	N	P	V	C	R	E	T	K	S	F	F	T	S	418
Bovine	354	G	L	E	N	I	R	R	A	E	S	L	N	G	N	P	L	F	S	K	A	L	A	D	L	V	H	S	H	L	Q	S	K	E	R	C	S	T	Q	L	T	L	S	C	P	L	C	V	N	P	T	C	R	E	T	K	S	F	F	T	S	413
Human	361	G	V	E	N	I	R	R	A	E	S	L	N	G	N	P	L	F	S	K	A	L	A	D	L	V	H	S	H	I	Q	S	N	E	L	C	S	K	Q	L	T	L	S	C	P	L	C	V	N	P	V	C	R	E	T	K	S	F	F	T	S	420
Mouse	360	G	A	E	N	I	R	R	A	E	S	L	N	G	N	P	L	F	S	K	A	L	A	D	L	V	H																																			



**Fig. 3.** The Molecular Properties of Recombinant Porcine FECH Expressed in *E. coli*.

A, FECH activity. Supernatants obtained by centrifugation from control (lane 1) and FECH-expressing *E. coli* (lane 2) were used to measure the forward, reverse, and conversion reactions, which were performed similarly to the description in the legend to Fig. 1. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of triplicated experiments. B, SDS-PAGE analysis. The proteins in the supernatants as above (lanes 1 and 2) and FECH purified using Ni-NTA beads (lane 3) were analyzed by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue. C, Immunoblot analysis. Immunoblotting was performed using anti-FECH as the primary antibody.



**Fig. 4.** Characterization of Forward and Reverse Reactions of Recombinant FECH.

A, effects of temperature (A) and pH (B). FECH activity was measured with mesoporphyrin IX and zinc acetate for the forward reaction. The reverse reaction was performed using hemin-imidazole as substrate. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of duplicate experiments.

5.7  $\mu\text{M}$  and 31.4  $\text{min}^{-1}$  respectively, suggesting that FECH proceeded readily in the forward reaction.

Previous studies<sup>1,5,21</sup> have found that FECH activity increases owing to various lipids including fatty acids and phospholipids. To determine the effects of fatty

**Table 1.** Kinetics of FECH

Parameter	Forward reaction*		Reverse reaction*
	Mesoporphyrin IX	Zinc	Hemin
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$6.6 \pm 0.2$	$1.1 \pm 0.1$	$5.7 \pm 0.2$
$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$400.0 \pm 38.0$		$31.4 \pm 2.4$
$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$60.7 \pm 6.0$	$351.2 \pm 45.7$	$5.5 \pm 0.5$

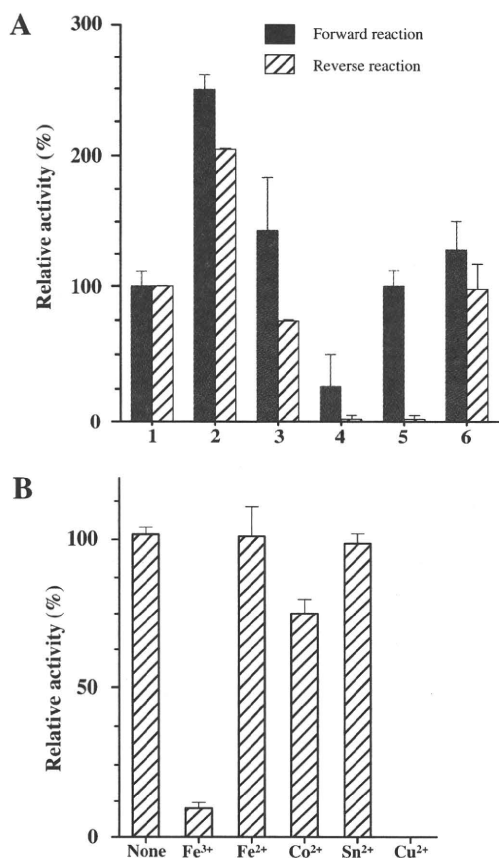
\*The assay conditions used were as described in "Materials and Methods." Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of 2-4 experiments.

acids on iron-removal reverse activity, we added sodium palmitate to the reaction mixture. Upon increasing the concentration of sodium palmitate to 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , the forward and reverse activities increased concentration-dependently, and the rates of the forward and reverse reactions increased 2.5-fold and 2.0-fold in the presence of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sodium palmitate, respectively (Fig. 5A). Other fatty acids such as stearic acid and oleic acid showed activities similar to those of palmitic acid. At 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , phosphatidylcholine, the rate of forward activity increased while that of the reverse reaction decreased. Lysophosphatidylcholine slightly activated forward activity, but inhibited reverse activity. Sphingomyelin and lysophosphatidic acid markedly inhibited reverse but not forward activity.

Finally, we examined the effects of heavy metal ions on iron-removal reverse activity. As shown in Fig. 5B, the reaction was markedly inhibited by ferric and cubic ions, but ferrous, cobaltic, and tin ions had no effect.

## Discussion

We characterized porcine FECH located in the liver and muscle mitochondria. The amount and activity of FECH in the muscle mitochondria were low compared with those in the hepatic mitochondria. In addition to



**Fig. 5.** Effects of Lipids (A) and Metal Ions (B) on FECH Activity. The forward and reverse reactions were performed similarly to the description in the legend to Fig. 4, but without (lane 1) or with sodium palmitate (lane 2), phosphatidylcholine (lane 3), sphingomyelin (lane 4), lysophosphatidylcholine (lane 5), and lysophosphatidic acid (lane 6). Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

Zn<sup>2+</sup>-chelating activity, NADH-dependent conversion of heme to Zn-protoporphyrin was observed in the muscle and liver mitochondria. The conversion from heme to Zn-protoporphyrin was found to include the following three reactions: reduction of heme, removal of ferrous ions from the heme, and insertion of zinc ions into protoporphyrin.<sup>10</sup> Methemoglobin reductase catalyzes the reduction of the ferric ions of heme and oxidized hemoprotein,<sup>22,23</sup> and the ferrous ions in heme can be removed by FECH. When heme was chemically reduced with reducing reagents, the iron-removal reaction of heme occurred with the porcine recombinant FECH, indicating that ferrous ions in heme are removed by the FECH reaction.

cDNAs and genes of FECH have been isolated from bacteria, fungi, plants, and mammals.<sup>2</sup> The amino acid sequence of porcine FECH showed high homology with those of mammalian FECH. The metal-chelating activity of FECH is well documented. It is evident that porcine FECH exhibits iron-removal activity as well as conversion of heme to Zn-protoporphyrin, since both activities were detected with purified recombinant FECH. We have reported that bacterial and yeast FECH exhibited reverse activity, suggesting that the reversible reaction of FECH is a general property.<sup>10</sup> The present data indicate that the  $k_{cat}$  value of the reverse iron-

removal activity was much lower than that of the zinc-chelating activity, indicating that FECH functions in heme biosynthesis. Hence the formed heme is utilized as a prosthetic group of cytochromes and myoglobin in muscle. Otherwise, considering that the conversion of heme to Zn-protoporphyrin did not proceed at higher pH levels at which the zinc-chelating reaction occurs, the rate-limiting step of the formation of Zn-protoporphyrin from heme was the iron-removal reaction.

Ham is produced mainly using pig muscle. Although the pigment of cured ham is nitrate-binding myoglobin, dry ham consists mainly of Zn-protoporphyrin.<sup>13</sup> We and others have reported that the reverse reaction of ferrochelatase, namely, removal of iron from heme, occurs *in vitro*.<sup>10,16</sup> Therefore, hemoprotein-heme, including myoglobin and hemoglobin, becomes a substrate of the removal reaction of FECH,<sup>10</sup> and the protoporphyrin thus produced can be utilized in the formation of Zn-protoporphyrin, a major pigment of dry-cured ham. The enzyme naturally utilizes ferrous ions as a substrate *in vivo*, but additionally inserts divalent metal ions such as zinc and cobaltic ions into porphyrin rings *in vitro*.<sup>1,6</sup> Thus zinc-chelating activity is essential for the formation of the pigment of dried ham *in vitro*, but the utilization of ferrous ions to form heme in cells is tightly controlled.<sup>9</sup>

The present data indicate that the formation of Zn-protoporphyrin from heme was markedly activated by fatty acids, including palmitic acid. Phospholipids, including phosphatidyl choline, and lysophosphatidyl choline had various effects on the formation of Zn-protoporphyrin. It is well known that the metal-chelating activity of FECH is markedly activated by fatty acids and phospholipids.<sup>1,21</sup> The mechanism of activation of both reactions by fatty acids is not clear, but it is possible that a specific environment dependent on the species of the lipid groups of the mitochondrial inner membrane<sup>5</sup> influences the reversible reaction of FECH.

Since divalent metal ions, including Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, and Cu<sup>2+</sup>, can be inserted into porphyrin rings to form the corresponding metalloporphyrins, they inhibited FECH activity to different degrees *via* competitive inhibition.<sup>6</sup> Heavy metal ions can bind with SH-groups in the catalytic domain of the enzyme, and then the activity is inhibited.<sup>24,25</sup> The present data indicate that the reverse reaction was strongly inhibited by Cu<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup>, but not by Fe<sup>2+</sup>, Sn<sup>2+</sup>, or Co<sup>2+</sup>. Thus, the sensitivity of the reverse reaction for divalent cations was different from that of the forward reaction.

The present data indicate that FECH in porcine muscle is an active enzyme catalyzing the metal-ion chelating and iron-removal reactions. Other investigators<sup>26</sup> have reported that the formation of Zn-protoporphyrin in Parma ham significantly increased after a curing time of 40 weeks, in which pig leg was incubated with salt at 1.0–1.5 °C for the first 10 weeks, suggesting that FECH is not involved in its formation. It is possible that zinc chelation occurs by non-enzymatic reactions,<sup>27,28</sup> or that porcine FECH is partially involved. Since the removal of iron from heme occurs only by a chemical reaction under strongly acidic conditions,<sup>29</sup> the removal reaction must be enzymatic. Furthermore, lead poisoning or iron deficiency causes an accumulation of Zn-protoporphyrin, and the possibility that the