

令和元年6月10日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07307

研究課題名(和文) 翻訳後修飾によるヘムオキシゲナーゼの機能調節とその破綻による疾患発症との関係

研究課題名(英文) Post-translational modifications regulating the activity and function of heme oxygenase

研究代表者

東元 祐一郎 (Higashimoto, Yuichiro)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：40352124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヘムオキシゲナーゼ(HO-1)はミクロソーム酵素として知られていたが、1) renal cellをCo-PPIXで刺激した場合にはミトコンドリアに、A549、PC3をheminで刺激した場合には、ミトコンドリア、細胞質、核に、NIH3T3をhypoxiaで刺激すると核に、腹膜マクロファージをLPSで刺激すると、HOはカベオラに局在することを明らかにした。2) 核内に移行、局在したHO-1は、C-末端の膜結合部位がSer275とPhe276の間で切除されていること、3) 核内HO-1はLys243とLys256がアセチル化されていること、そのアセチル化が腫瘍進展に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘムオキシゲナーゼ(HO)は、生体内で代謝的にCOを生成する唯一の酵素であり、内因性のCOの大部分は、HO反応によって生成される。HOはこれまで小胞体膜結合型酵素として知られていたが、本研究では、各種疾患由来細胞においては、その局在性、活性発現が変化することが明らかになった。これによりHO-1の局在変化と活性異常が疾患発症と関連があることが示唆され、HO-1の発現と活性を制御することが疾患治療につながる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the subcellular localization and the potential regulation of heme oxygenase-1 (HO-1) by post-translational modifications. 1) An in silico analysis of the human HO-1 protein predicts a number of potential sites for post-translational modifications. 2) LPS and cadmium treatment of isolated murine peritoneal macrophages resulted in HO-1 translocation to caveolae. 3) Heme and hypoxia treatment of NIH313 and HCT116 resulted in HO-1 translocation to nuclei. 4) Co-PPX treatment of rat renal cell resulted in HO-1 translocation to mitochondria. 5) Nuclear HO-1 revealed two acetylation sites located at Lys243 and Lys256. 6) The acetylation is crucial for nuclear HO-1-enhanced tumor progression in vitro.

研究分野：生化学

キーワード：ヘムオキシゲナーゼ 翻訳後修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヘムオキシゲナーゼ(HO)は、生体内で不要になったヘムを分解し、鉄イオン、ビリベルジン、一酸化炭素を生成するミクロソーム酵素である。多様な病態とHOの細胞保護作用との関係が注目される一方で、過度のHO発現はむしろ炎症を助長し、細胞障害を引き起こすことや、慢性骨髄性白血病など一部の腫瘍細胞では異常発現したHOが腫瘍増殖機構の一役を担っていることが報告されるようになった。しかしながらHOの活性調節のメカニズムの詳細は不明である。

2. 研究の目的

これまでHOはミクロソーム酵素として知られていたが、カベオラやミトコンドリア内でのHO-1の発見に伴い、その局在が多様であることが報告されるようになった。そこで本研究では、各種条件下でのHO-1の細胞内局在を明らかにし、その細胞内移行、細胞内寿命、活性制御にどのような因子が関与しているのかを同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HO1とHO2およびその膜貫通領域を排除した可溶性酵素のcDNAをpcDNA31にサブクローニングし、A549, NIH3T3, PC3, HEK293T, renal cell にトランスフェクトし、各種誘導剤(hemin, hypoxia, Co-PPX, LPS)を用いて細胞を刺激した後、時間経過に伴うHO-1の細胞内局在について検討した。

(2) NIH3T3をhypoxiaで刺激すると核に優先的に局在することが明らかになったことをうけ、核内のHO-1に焦点をおいてその特徴について検討を行った。NIH3T3細胞をHypoxiaで刺激した後、免疫沈降法によってHO-1を単離し、Peptide-Mass-Fingerprinting法によるMS解析を行った。さらに、MS/MS解析によって詳細な配列解析を行った。

(3) 核に移行するタンパク質の多くは、リジン残基がアセチル化されることが知られている。そこで、NIH3T3をHypoxiaで刺激した後、免疫沈降法によってHO-1を単離し、Peptide-Mass-Fingerprinting法を行った。

(4) 同定した核移行シグナル部位、およびアセチル化部位に相当するアミノ酸残基について、部位特異的変異体を用いてHO1変異体を作成した。その変異体をNIH3T3にトランスフェクトし、細胞寿命、生物活性、腫瘍増殖作用について検討した。

4. 研究成果

(1) 各種誘導剤を用いて、HO-1の細胞局在について検討した結果、Rat renal cellをCo-PPXで刺激した場合にはミトコンドリアに、A549, PC3をheminで刺激した場合には、それぞれミトコンドリア、細胞質、核に局在することが明らかになった。また、NIH3T3をhypoxiaで刺激すると核に優先的に局在することを明らかにした。さらに、マウス腹膜マクロファージをLPSで刺激すると、HO-1はカベオラに優先的に局在することを明らかにした。

(2) A549細胞、およびNIH3T3細胞をHypoxiaで刺激した後、免疫沈降法によってHO-1を単離し、Peptide-Mass-Fingerprinting法によるMS解析を行った。その結果、核に局在するHO-1は膜結合部分が完全に排除されていることが確認された。MS/MS解析によって詳細な配列解析を行った結果、Ser275とPhe276のアミノ酸間で切断されていることが明らかになった。

(3) NIH3T3をHypoxiaで刺激した後、免疫沈降法によってHO-1を単離し、Peptide-Mass-Fingerprinting法およびMS/MS解析を行った。その結果、Lys243とLys256がアセチル化されていることが明らかになった。

(4) 点変異体(S275A, F276L)を作成し、この変異体をA549細胞にトランスフェクトし、Hypoxiaで刺激した後、HO-1の局在を調べた結果、核内への局在は観測されなかった。また、核内局在HOのアセチル化部位であるLys243とLys256の変異体(K243A/K256A)を作成し、その性質を調べた結果、野生型よりも細胞内寿命が長くなることが確認された。さらに、K243A/K256A変異体は、野生型HO-1に比べて癌細胞増殖能が著しく抑制されることがわかった。この結果より、核内HO-1のLys243とLys256のアセチル化が腫瘍増殖に寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)

Nakamura, K., Sakaguchi, M., Matsubara, H., Akagi, S., Sarashina, T., Ejiri, K., Akazawa, K., Nakagawa, K., Yoshida, M., Miyoshi, T., Ogo, T., Oto, T., Toyooka, S., Higashimoto, Y., 以下2名: Crucial Role of RAGE in Inappropriate Increase of Smooth Muscle

Cells from Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *PLoS One*, 13: 1-11, (2018) 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0203046.

Kaifu, K., Ueda, S., Nakamura, N., Matsui, T., Obara, N., Ando, R., Kaida, Y., Nakata, M., Toyonaga, M., Higashimoto, Y., 以下 4 名: Advanced glycation end products evoke inflammatory reactions in proximal tubular cells via autocrine production of dipeptidyl peptidase-4. *Microvasc. Res.* 120, 90-93 (2018) 査読有 DOI: 10.1016/j.mvr.2018.07.004.

Taguchi, K., Yamagishi, S.I., Yokoro, M., Ito, S., Kodama, G., Kaida, Y., Nakayama, Y., Ando, R., Yamada-Obara, N., Asanuma, K., Matsui, T., Higashimoto, Y., 以下 4 名: RAGE-aptamer attenuates deoxycorticosterone acetate/salt-induced renal injury in mice. *Sci. Rep.* 8, 2686-2698, (2018) 査読有 DOI: 10.1038/s41598-018-21176-5.

Fukasawa, K., Higashimoto, Y., Ando, Y., Motommiya, Y.: Selection of DNA aptamer that blocks the fibrillogenesis of a proteolytic amyloidogenic fragment of 2m. *Ther. Apher. Dial.* 22, 61-66, (2018) 査読有 DOI: 10.1111/1744-9987.12591.

Nakamura, N., Matsui, T., Ishibashi, Y., Sotokawauchi, A., Fukami, K., Higashimoto, Y., Yamagishi, S.: RAGE-aptamer inhibits the growth and liver metastasis of melanoma in nude mice. *Mol. Med.*, 23, 295-306, (2017) 査読有 DOI: 10.2119/molmed.2017.00099.

Ishibashi, Y., Matsui, T., Nakamura, N., Sotokawauchi, A., Higashimoto, Y., Yamagishi, S.: Methylglyoxal-derived hydroimidazolone-1 evokes inflammatory reactions in endothelial cells via an interaction with RAGE. *Diabetes Vasc. Dis. Res.*, 14, 450-453, (2017) 査読有 DOI: 10.1177/1479164117715855.

Matsui, T., Higashimoto, Y., Nishino, Y., Nakamura, N., Fukami, K., Yamagishi, S.: RAGE-aptamer Blocks the Development and Progression of Experimental Diabetic Nephropathy. *Diabetes*, 66, 1683-1695, (2017) 査読有 DOI: 10.2337/db16-1281.

Ishibashi, Y., Matsui, T., Abe, Y., Sakaguchi, T., Higashimoto, Y., Yamagishi, S.: N-butanol extracts of noni suppress advanced glycation end products (AGEs)-induced inflammatory and thrombotic reactions in endothelial cells through its anti-oxidative properties. *BMC Complement Altern Med.*, 17, 137-143, (2017) 査読有 DOI: 10.1186/s12906-017-1641-3.

Taira, J., Kida, Y., Inatomi, K., Komatsu, H., Higashimoto, Y., Sakamoto, H.: Phosphorylation of clustered serine residues in the N-terminus of BPS domain negatively regulates formation of the complex between human Grb14 and insulin receptor. *J. Biochem.*, 162, 113-122, (2017) 査読有 DOI: 10.1093/jb/mvx007.

Yamagishi, S., Matsui, T., Ishibashi, Y., Abe, Y., Sakaguchi, T., Higashimoto, Y.: Phytochemicals against advanced glycation end products (AGEs) and the receptor system. *Curr. Pharm. Des.*, 23, 1135-1141, (2017) 査読有 DOI: 10.2174/1381612822666161021155502.

Fukasawa, K., Higashimoto, Y., Motommiya, Y., Uji, Y., Ando, Y.: Influence of heparin molecular size on the induction of C-terminal unfolding in 2-microglobulin. *Mol. Biol. Res. Commun.*, 5, 224-231, (2016) 査読有 DOI: 10.22099/mbr.2016.3866.

Ishibashi, Y., Matsui, T., Taira, J., Higashimoto, Y., Yamagishi, S.: Protective Role of PEDF-Derived Synthetic Peptide against Experimental Diabetic Nephropathy. *Horm. Metab. Res.*, 48, 613-619, (2016) 査読有 DOI: 10.1055/s-0042-108448.

〔学会発表〕(計 21 件)

松井孝憲、中村信孝、東元祐一郎、山岸昌一「終末糖化産物受容体(RAGE)アプタマーは動物の糖尿病腎症の発症・増悪と悪性黒色腫の増殖・転移を阻害する」第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 29 日

坂口達也、東元祐一郎「発現関連遺伝子群による包括的な遺伝子機能推定法の開発」第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 28 日

坂口達也、東元祐一郎「発現関連遺伝子群による遺伝子の影響範囲推定法の開発」第 7 回生命医薬情報学連合大会 2018 年 9 月 19 日

松井孝憲、東元祐一郎、中村信孝、山岸昌一「終末糖化産物受容体(RAGE)アプタマーは動物モデルの糖尿病性腎症の発症・増悪、悪性黒色腫の増殖・転移を抑制する」第 4 回日本核酸医薬学会年会 2018 年 7 月 10 日

東元祐一郎、深澤伽音、安東由喜雄、本宮善恢「Selection of DNA Aptamer that Block the Fibrillogenesis of a Proteolytic Amyloidogenic Fragment of 2m (N6 2m)」第 4 回日本核酸医薬学会年会 2018 年 7 月 10 日

平順一、武本美沙希、上岡歩美、東元祐一郎、坂本寛「ヘムオキシゲナーゼ-2 に対するカ

ベオリン-1 由来ペプチドのヘミン競合的な結合と酵素活性阻害」平成 30 年度日本生化学会九州支部例会 2018 年 7 月 1 日

坂口達也、東元祐一郎「マイクロアレイのメタ解析による遺伝子の持つ機能範囲の推定」平成 30 年度日本生化学会九州支部例会 2018 年 7 月 1 日

下川千寿、城田沙織、佐藤秀明、杉島正一、原田二郎、東元祐一郎、Mario Amzel、野口正人「癌代謝物である 2-ヒドロキシグルタル酸がヒト由来ペプチド C 末端アミド化酵素 PAM に与える影響」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 7 日

坂口達也、東元祐一郎「マイクロアレイのメタ解析による色素上皮由来因子 PEDF の関連遺伝子探索」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 7 日

深澤伽音、東元祐一郎、安東由喜雄、本宮善恢「変異型 2 ミクログロブリン(N6 2m)特異的 DNA アプタマーによるアミロイド凝集抑制効果の検討」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 6 日

東元祐一郎「核酸アプタマーのスクリーニングと医薬診断薬としての可能性」東邦大学医学部微生物・感染症学講座セミナー 2017 年 8 月 25 日

東元祐一郎「血清中のエリスロフェロンの測定と夾雑物質の有無」医療法人翠悠会研究セミナー 2017 年 7 月 29 日

東元祐一郎「核酸アプタマーの医薬診断薬としての可能性」第 71 回久留米医学会総会 2017 年 4 月 21 日

東元祐一郎「変異型 2 ミクログロブリン特異的アプタマーによる透析アミロイドシスの抑制効果」第 3 回アプタマー勉強会 2017 年 3 月 25 日

東元祐一郎、尾嶋亜弥子、小田えり子、松井孝憲、山岸昌一「AGE アプタマーはバルーンにより損傷したラット頸動脈中における新生血管内膜の過形成を抑制する」第 2 回日本核酸医薬学会年会 2016 年 11 月 16 日

松井孝憲、東元祐一郎、山岸昌一「終末糖化産物受容体 (RAGE) の DNA アプタマーはラットの糖尿病腎症を改善する」第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 26 日

田口顕正、山岸昌一、松井孝憲、東元祐一郎、浅沼克彦、上田誠二、深水圭「RAGE-DNA aptamer は AGEs-RAGE 系を抑制し MR 活性腎障害を改善する」第 59 回日本腎臓学会学術総会 2016 年 6 月 17 日

田中賢治、東元祐一郎、深澤伽音、本宮康樹、益田眞理、大貫雅弘、本宮善恢「エリスロフェロン測定系での血清中夾雑タンパクの影響」第 61 回日本透析医学会学術集会・総会 2016 年 6 月 10 日

田口顕正、山岸昌一、松井孝憲、東元祐一郎、浅沼克彦、上田誠二、深水圭「RAGE-DNA APTAMER IMPROVES MR-ASSOCIATED RENAL INJURY THROUGH RAC1-MEDIATED MR ACTIVATION」第 53 回欧州腎臓学会・欧州透析移植学会 2016 年 5 月 22 日

東元祐一郎、尾嶋亜弥子、小田えり子、松井孝憲、山岸昌一「AGE アプタマーのバルーン障害後血管リモデリングに対する効果」第 89 回日本薬理学会年会 2016 年 3 月 10 日

⑳ 田口顕正、山岸昌一、東元祐一郎、中山陽介、浅沼克彦、山本靖彦、上田誠二、深水圭「RAGE-DNA アプタマーは Rac1-MR 経路を抑制しアルドステロン誘導性ポドサイト障害を改善する」第 45 回日本心脈管作動物質学会 2016 年 2 月 5 日

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松井 孝憲

ローマ字氏名：MATSUI TAKANORI

所属研究機関名：久留米大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：10425233

研究分担者氏名：坂口 達也

ローマ字氏名：SAKAGUCHI TATSUYA

所属研究機関名：久留米大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：00757031

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。