

平成 21 年 3 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18770121
 研究課題名（和文）ヘムオキシゲナーゼのカベオリンによる機能制御機構の解明と CO 新規受容体の探索
 研究課題名（英文）Regulation of heme oxygenase activity by caveolin
 研究代表者
 東元 祐一郎（HIGASHIMOTO YUICHIRO）
 久留米大学・医学部・准教授
 研究者番号：40352124

研究成果の概要：細胞内のヘムを分解し、同時に生体内信号としての役割が注目されている一酸化炭素を生成する酵素、ヘムオキシゲナーゼ(HO)の活性が、複数のタンパク質間ネットワークを介して厳密に制御されていることを複数の分光学的手法を用いて明らかにした。さらに P450 還元酵素、ビリベルジン還元酵素との相互作用部位を同定し、新規シグナル伝達制御因子カベオリンによって HO 活性が可逆的に阻害されることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	900,000	0	900,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	210,000	3,010,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：酵素の作用機作と調節

1. 研究開始当初の背景

生体内において、一酸化窒素(NO)のみならず一酸化炭素(CO)が、シグナル伝達分子として働き、抗炎症作用や血管拡張作用など様々な生物作用を有することが明らかになりつつある。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 にはストレス応答で誘導される HO-1 と非誘導型の HO-2 の 2 つのアイソザイムが知られており、特に脳や神経系で多く発現している HO-2 は、シグナル伝達分子 CO の発生源として注目されている。一方で、過剰

の CO 生成は生体毒となるため、CO の生成、特に非誘導型の HO-2 の活性は厳密に制御されていると考えられるが、その制御機構は不明である。

2. 研究の目的

ヘムオキシゲナーゼの活性制御は、基質結合、生成物遊離にともなう複数のタンパク質ネットワークを介して行われていると考えられる。そこで今回、ヘム代謝系を構成する 2 つの還元酵素 (P450 還元酵素 (CPR), ビリベルジン還元酵素 (BVR)) との会合・解離の他、シグナル伝達系を構成するタンパク質群

との相互作用機構について検討することを目的とした。特にカベオリンは、形質膜をはじめ種々の生体膜上に存在する新規シグナル伝達制御タンパク質として注目されており、NO合成酵素もカベオリンとの相互作用によって活性制御が行われていることに着目し、H0とカベオリンとの相互作用及び結合部位の同定を行い、H0活性への影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) H0とその関連タンパク質の発現と精製：H0-1, H0-2, CPR, BVRの可溶性酵素を大腸菌で大量発現させ、各種クロマトグラフィーによって精製した。カベオリンは会合性の高い膜タンパク質であるため、GST及びHisタグを利用した融合タンパク質系での発現を試み、アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。

(2) H0とその関連タンパク質との相互作用解析：H0-1とCPR, BVR, カベオリンとの相互作用を表面プラズモン共鳴法を用いて検討した。さらにH0とCPR, BVRとの複合体の結晶化を試みた。

(3) 質量分析法によるペプチドマッピング：質量分析法により、H0とCPR, BVR, カベオリン間の相互作用部位の同定を試みた。さらに、同定した結合部位の変異酵素を作成し、ヘム分解活性、反応中間体の分光学的性質を調べた。

(4) CO新規受容体の探索：肝細胞、神経細胞、内皮細胞を μM オーダーのCOを添加した培養液で培養し、培養後の細胞抽出液を2次元電気泳動法によりマッピングした。コントロール細胞と比較することにより、CO処理によって発現量が増加（あるいは減少）したタンパク質を、データベース処理及び質量分析法を用いて同定することを検討した。

4. 研究成果

(1) caveolinによるH0の活性制御メカニズムを検討するため、野生型caveolin(1-178)と膜結合部分を排除したcaveolin(1-101)を大腸菌により大量発現し、精製した。caveolin存在下でH0-1とH0-2の活性を測定した結果、H0-1, H0-2ともに、カベオリンの添加量に依存して、ビリルビンの生成量が低下することが明らかになった。H0とカベオリンの結合部位を詳細に同定する目的で、種々のcaveolinペプチドをFmoc固相合成法により合成した。その結果、caveolin(82-101)がH0活性を著しく阻害することが明らかになった。さらに、H0とcaveolinとの結合を表面プラズモン共鳴法を用いて検討した結果、caveolin(1-101)とapo体のH0-1は、 10^{-6}M オーダーの K_D 値で結合することが明らかになった。また、apo体のH0-1は、caveolin(82-

101)に対しても同様の K_D 値で結合することがわかった。さらに、H0とヘムとの結合性を検討するため、カベオリン存在下、非存在下でH0にヘムを滴定し、その間の吸収スペクトルを測定した。その結果、カベオリンは、基質ヘムと競合的にH0に結合することが明らかになった。

(2) H0とCPR, BVRとの相互作用部位を質量分析法によって検討した。まず、H0を無水酢酸でアセチル化すると、NADPHとCPRを電子供給系とした時、反応速度の著しい低下が観測された。一方、CPR存在下でアセチル化したH0は、その活性を維持していた。アセチル化したH0をトリプシンで消化し、MALDI-TOF MSによって、アセチル化部位の同定を試みた。その結果、H0単独でアセチル化した場合、H0の14個のリジン残基中、11個がアセチル化されることがわかった。CPR存在下でH0をアセチル化した場合、Lys-149とLys-153がアセチル化を受けず、保護されていることがわかった。これらの残基を変異させた酵素では、H0活性が著しく低下することから、この2つのリジン残基はCPRとの相互作用に重要であることが示唆された。一方、BVR存在下でH0をアセチル化した場合、H0中のリジン残基の保護は観測されなかった。

(3) 質量分析法によって同定したCPRとの相互作用に関与しているH0上の2つのLysをアラニンに置換した変異酵素を作成し、その性質を検討した。精製したH0変異体のヘム代謝活性を測定した結果、NADPHとCPRを電子供給系とした場合、K149AとK153Aでは、そのH0活性が著しく低下することがわかった。一方、非特異的なelectron donorであるアスコルビン酸を電子供給系として用いた場合、何れの変異酵素も野生型と同等の活性を示した。これらのアミノ酸残基の役割を詳細に検討するために、H0変異体と基質ヘムとの複合体を作成した。今回作成したH0変異体は何れも基質であるヘムと1:1で結合した。ヘム結合型の吸収スペクトルは、何れも野生型のそれと類似していたことから、これらの変異体は野生型と同様な構造を維持していることが示唆された。作成したH0-ヘム複合体を用いて、ヘムの分解速度を測定した。CPRを電子供給系として用いた場合、K149AとK153Aでは、同一条件下において、ソーレー帯の減少及び、酸素化型の生成速度が著しく遅くなることがわかった。数時間経過後もビリベルジンは生成せず、ヘムの分解が中間過程で停止していることが示唆された。還元剤としてアスコルビン酸を用いた場合は、すべての変異酵素において野生型と同様にヘムからビリベルジンへの代謝が速やかに進行したことから、Lys-149とLys-153がNADPH-CPR系でのヘム代謝活性に重要な役割をしていることが明らかになった。そこで

CPR からの電子伝達におけるこれらのアミノ酸の役割を探るため、HO-1 と CPR との相互作用を表面プラズモン共鳴法を用いて検討した。その結果、K149A 及び K153A の変異酵素では、CPR との結合が約 7 倍 ($K_D = 17 \mu\text{M}$) 低下していた。以上のことから、Lys-149, Lys-153 とともに CPR との相互作用に重要であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

東元祐一郎, *In vitro* selection of DNA aptamers against advanced glycation end-products. 久留米医学会雑誌, 査読無, 71, (2008) 247-253

Kida, Y., Higashimoto, Y., 以下 2 名, A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kappaB through protease-activated receptors. *Cell Microbiol.*, 査読有, 10 (2008) 1491-1504

Nakashima, S., Higashimoto, Y., 以下 2 名, Interaction between Heme and Synthetic Peptides Containing Heme Regulatory Motifs of Rat Heme Oxygenase -2. *Peptide Science 2007*, 査読有, 44 (2008) 249-250

Higashimoto, Y., Sugishima, M., Sato, H., 以下 4 名, Mass spectrometric identification of lysine residues of heme oxygenase-1 that are involved in its interaction with NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 367 (2008) 852-858

Sato, H., Higashimoto, Y., Sakamoto, H., 以下 5 名, Electrochemical reduction of ferrous -verdoheme in complex with heme oxygenase-1., *J. Inorg Biochem.* 査読有, 101 (2007) 1394-1399

Higashimoto, Y., Yamagishi, 以下 5 名, *In vitro* selection of DNA aptamers that block toxic effects of AGE on cultured retinal pericytes., *Microvasc Res.*, 査読有, 74 (2007) 65-69

Sugishima, M., Higashimoto, Y., 以下 5 名, X-ray Crystallographic and Biochemical Characterization of the Inhibitory Action of an Imidazole- Dioxolane Compound on Heme Oxygenase. *Biochemistry*, 査読有, 46 (2007) 1860- 1867

Higashimoto, Y., Sato, H., Sakamoto, H., 以下 3 名, The reaction of heme- and verdoheme-heme oxygenase-1 complexes with FMN-depleted NADPH-cytochrome P450

reductase: Electrons required for verdoheme oxidation can be transferred through a pathway not involving FMN. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 281 (2006) 31659-31667

Asanomi, Y., Higashimoto, Y., Chuman, Y., 以下 3 名, K., Fibrillar and Granular Aggregation of G334V Mutant p53 Tetramer Peptide. *Peptide Science 2005*, 査読有, 42 (2006) 397-398

Higashimoto, Y., Asanomi, Y., Takakusagi, S., Lewis, M.S., 以下 5 名, Unfolding, Aggregation, and Amyloid Formation by the Tetramerization Domain from Mutant p53 Associated with Lung Cancer. *Biochemistry*, 査読有, 45 (2006) 1608-1619

[学会発表](計 33 件)

東元祐一郎、杉島正一、以下 4 名「質量分析法によるヘムオキシゲナーゼと NADPH-シトクロム P450 還元酵素・ビリベルジン還元酵素との相互作用解析」第 81 回日本生化学会大会(BMB2008)、2008 年 12 月 10 日、神戸

古賀真也、東元祐一郎、野口正人、坂本寛「ヘムオキシゲナーゼ-1 を応用した新型バイオセンサーの開発」第 81 回日本生化学会大会(BMB2008)、2008 年 12 月 10 日、神戸

佐藤秀明、東元祐一郎、以下 5 名「CO 配位型ベルドヘム-ヘムオキシゲナーゼ複合体のオキサポルフィリン環の還元」第 81 回日本生化学会大会(BMB2008)、2008 年 12 月 10 日、神戸

杉島正一、佐藤秀明、東元祐一郎、以下 5 名「Crystal structure of rat verdoheme-heme-oxygenase-1 complex」第 81 回日本生化学会大会(BMB2008)、2008 年 12 月 10 日、神戸

岩崎浩之、大村昇、東元祐一郎、以下 2 名「ラット heme-oxygenase-1 のヘム結合の熱力学的特性にイオン強度が及ぼす影響」第 81 回日本生化学会大会(BMB2008)、2008 年 12 月 10 日、神戸

中島正太、高尾研司郎、東元祐一郎、以下 2 名「ラットヘムオキシゲナーゼ-2 由来 HRM ペプチドのヘム相互作用解析」第 81 回日本生化学会大会(BMB2008)、2008 年 12 月 10 日、神戸

中島正太、東元祐一郎、野口正人、坂本寛「ラットヘムオキシゲナーゼ-2 が持つヘム調節モチーフの機能解析」第 45 回ペプチド討論会、2008 年 10 月 29 日、東京

坂本寛、東元祐一郎、杉島正一、野口正人「Surface plasmon resonance and mass

spectrometric analysis of protein-protein interaction in heme degradation system」The 1st Japan-Korea joint symposium on bio-microsensing technology, 2008年5月23日、北九州

東元祐一郎、杉島正一、以下3名「質量分析法によるヘムオキシゲナーゼとNADPH-シトクロム P450 還元酵素・ピリベルジン還元酵素との相互作用解析」平成20年度日本生化学会九州支部例会、2008年5月18日、福岡

中島正太、東元祐一郎、以下2名「ラット由来ヘムオキシゲナーゼ-2が持つヘム調節モチーフの機能解析」平成20年度日本生化学会九州支部例会、2008年5月18日、福岡

岩崎浩之、大村昇、野口正人、東元祐一郎、以下2名「ラット Heme oxygenase-1 のヘム結合の熱力学的特性に与えるイオン強度変化の影響」平成20年度日本生化学会九州支部例会、2008年5月18日、福岡

堤由佳、新村理、東元祐一郎、以下2名「ヒト Heme oxygenase-1 遺伝子の SNPs によるアミノ酸置換が酵素機能に与える影響」平成20年度日本生化学会九州支部例会、2008年5月18日、福岡

鈴居詠之郎、古賀真也、東元祐一郎、以下2名「蛍光ラベル化した Heme oxygenase-1 を利用したヘムセンサーの開発」平成20年度日本生化学会九州支部例会、2008年5月18日、福岡

中尾 亮太、堤 由佳、東元 祐一郎、以下3名「クライオ電子顕微鏡法によるヘムオキシゲナーゼ-1・シトクロム P450 還元酵素複合体の結合様式の解明」第45回日本生物物理学会年会、2007年12月21日、横浜

堤由佳、岩竹麻理子、新村理、東元祐一郎、以下2名「ヒト heme oxygenase-1 のヘム分解活性および立体構造に対するアミノ酸置換を伴う SNPs の影響」第80回日本生化学会大会(BMB2007)、2007年12月12日、横浜

大村昇、田中知子、小松秀幸、東元祐一郎、以下2名「ラットヘムオキシゲナーゼ-1によるヘム結合のカロリメトリー解析」第80回日本生化学会大会(BMB2007)、2007年12月12日、横浜

中島正太、東元祐一郎、以下2名「ラットヘムオキシゲナーゼ-2のヘム調節モチーフ含有ペプチドのヘムとの相互作用」第80回日本生化学会大会(BMB2007)、2007年12月12日、横浜

佐藤秀明、東元祐一郎、坂本寛、野口正人「Electrochemical reduction of ferrous-verdoheme-rat heme oxygenase-1 complex」第80回日本生化学会大会(BMB2007)、2007年12月12日、横浜

Takahashi, K., Harada, S., Higashimoto, Y., 以下2名「The role of zinc in peptidyl amidoglycolate lyase reaction」第80回日本生化学会大会(BMB2007)、2007年12月12日、横浜

Higashimoto, Y., Yamagishi, S., 以下3名「In vitro selection of DNA aptamers that block toxic effects AGE on cultured retinal pericytes」第43回欧州糖尿病学会議 EASD2007、9月17日、Amsterdam

21 東元祐一郎、佐藤秀明、杉島正一、以下2名「FMN 欠失 NADPH-シトクロム P450 還元酵素を用いたヘムオキシゲナーゼ反応における電子授受機構の検討」第7回日本蛋白質科学会年会、5月24日、仙台

22 中島正太、東元祐一郎、野口正人、坂本 寛「ラットヘムオキシゲナーゼ-2のヘム調節モチーフの合成とヘムとの相互作用」平成19年度日本生化学会九州支部例会、5月19日、宮崎

23 佐藤秀明、東元祐一郎、坂本寛、野口正人「ベルドヘム-ヘムオキシゲナーゼ複合体の電気化学的還元」平成19年度日本生化学会九州支部例会、5月19日、宮崎

24 杉島正一、東元祐一郎、以下5名「イミダゾール-ジオキソレン化合物によるヘムオキシゲナーゼの阻害機構」平成19年度日本生化学会九州支部例会、5月19日、宮崎

25 中尾良太、堤由佳、東元祐一郎、以下3名「クライオ電子顕微鏡法によるヘムオキシゲナーゼ-1・シトクロム P450 還元酵素複合体の結合様式の解明」平成19年度日本生化学会九州支部例会、5月19日、宮崎

〔産業財産権〕

取得状況（計1件）

名称：細胞または組織内の AGE-2 を免疫組織化学的に検出する方法およびそのためのキット

発明者：東元祐一郎、山岸昌一、竹内正義、井上浩義

権利者：久留米大学

種類：特開

番号：2008-224453(P2008-224453A)

取得年月日：2008年9月25日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東元祐一郎 (HIGASHIMOTO YUICHIRO)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：40352124