

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K05358

研究課題名(和文) 生体内遊離ヘムの計測と細胞内イメージング

研究課題名(英文) Development of a Heme Sensor Using Fluorescently Labeled Heme Oxygenase-1

研究代表者

坂本 寛 (Sakamoto, Hiroshi)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究者番号：70309748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の遊離ヘムは濃度依存的に異なる生理的機能を示すことから、その定量法の確立が求められている。我々はこれまでにヘムに高い親和性を示すヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)を母体として蛍光色素を化学修飾または蛍光タンパク質を融合したヘムセンサーを開発してきた。このセンサーはヘム-HO-1複合体に特有の吸収波長と蛍光タンパク質の蛍光波長との重なり起因するエネルギー移動による消光を検出原理としている。本研究では、これまでのセンサーを改良するとともにHO-1とシトクロムP450還元酵素との特異的分子間相互作用を利用したFRETヘムセンサーを開発した。また、細胞内ヘムのバイオイメーキングも検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、第2世代の蛍光タンパク質融合ヘムセンサーの検出範囲を拡大することができた。第2.5世代として開発した色調変化型センサーは、生細胞内で機能することが示唆された。また、第3世代として開発した2分子FRET型センサーはヘム濃度に対して応答することが示された。ヘムは酸化ストレスや癌、アルツハイマー等の疾患との関連性も指摘されていることから、本測定法により遊離ヘム動態の解明が促進されれば、各種疾患の新たな治療方法の発見に繋がることが期待される。ヘムの動態解明は、まさにケミカルバイオロジー的手法で切り開くことができる新しい研究領域と言える。

研究成果の概要(英文)：Since free heme in cells exhibits different physiological functions depending on its concentration, there is a need to establish a method for heme quantitation. We have previously developed a heme sensor based on heme oxygenase-1 (HO-1) by chemically modifying it with a fluorescent dye or fusing it with a fluorescent protein. The response of the heme sensor is based on the fluorescence quenching that occurs when heme binds to the enzyme. In this study, we improved the previous sensor and developed a FRET heme sensor that utilizes the specific intermolecular interaction between HO-1 and cytochrome P450 reductase. We also investigated bioimaging of intracellular heme using the sensor developed in this study.

研究分野：生物化学

キーワード：ヘム センサー プローブ FRET

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヘムは生体にとって必須な色素で、ヘム蛋白質に結合して様々な生理機能を担っている。一方蛋白質非結合型の遊離ヘムは、様々な濃度域で異なる生理活性を示すことがわかってきた。低濃度では細胞内の働きを制御しているが、濃度が上昇すると活性酸素の発生源となって様々な疾患に関与することが認められ、その動態の解明は病気の診断や治療につながると期待されている。しかし、これまで微量のヘムを正確に測定する方法がなかったため、遊離ヘムの細胞内濃度はよく知られていない。また、遊離ヘムの仮想的な貯蔵場所として「ヘムプール」が想定されているが、それが細胞のどこにあるかなどの遊離ヘムの動態についても明らかにされていないことが多かった。

2. 研究の目的

我々が独自に開発したヘムセンサーを用いて、遊離ヘムの細胞内動態を明らかにし、遊離ヘムが関与する生体反応をより深く理解することを目的とする。本センサーは、ヘム分解酵素であるヘムオキシゲナーゼ(HO-1)の酵素活性を消失させ、高いヘム結合能・選択性を保持した変異体を母体としている点で独創的であり(図1),1~100 nMのヘムを測定できる高い検出感度を有する。本研究では、さらに幅広い濃度域に対応するようセンサーを改良するとともに、HO-1の酸化還元パートナーであるシトクロムP450還元酵素(CPR)との特異的相互作用を利用した新規センサーの開発を試みる。そして、生体サンプル中の遊離ヘムを定量する測定系を確立し、さらに本センサーを細胞中のヘムを検出するプローブとしてバイオイメージング技術と組み合わせることによって、遊離ヘムの動態を *in situ* で観測する。

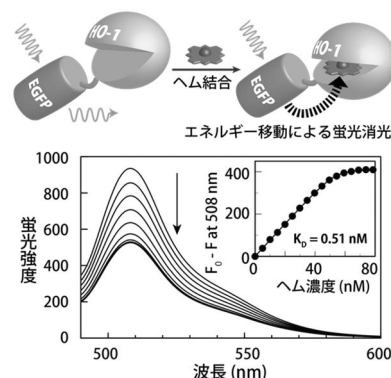


図1. 第2世代ヘムセンサーの概念図(上)とヘム添加による蛍光スペクトル変化(下)

これまでに第1世代センサーの開発が終了し、第2世代の途中まで開発が進んでいる。本研究ではイメージング解析に必要となる第2世代の改良と第3世代の開発に取り組む(表1)。

表1. 各世代ヘムセンサーの特徴と開発状況

	第1世代	第2世代	第3世代
形態	蛍光色素を化学修飾したHO-1変異体	蛍光蛋白質を融合したHO-1変異体	蛍光蛋白質を融合したHO-1・CPRキメラ蛋白質
測定方法	蛍光消光	蛍光消光	蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)による蛍光発光
検出原理	HO-1にヘムが結合すると、ヘム吸収帯と重なる励起波長域を有する蛍光色素あるいは蛍光蛋白質がHO-1のヘム結合部位近傍にあるため、蛍光色素あるいは蛍光蛋白質からヘムへのエネルギー移動が起こり、蛍光が消光する	HO-1にヘムが結合すると、HO-1とCPRの特異的な蛋白質間相互作用が起こり、ドナーおよびアクセプター蛍光蛋白質が近接し、FRETが生じる	
長所	・蛍光団の種類が多く、最適化容易	・蛍光蛋白質とHO-1が1:1で結合しているため導入率は100% ・標的細胞内で発現可能	・発光型であるため、内部標準を必要としない
短所	・色素により導入率が異なる ・細胞内への導入困難	・消光型のためイメージングには内部標準が必要	・蛍光蛋白質の組み合わせおよび融合箇所等の検討が必要
開発状況	・基質結合部位のアミノ酸残基の置換によって、ヘム分解活性の消失とヘム親和性の向上を図った(開発終了)	・HO-1のN端に蛍光蛋白質を導入し、ヘム検出能を確認済み ・本研究課題で改良を行う	・本研究課題で新たに開発する
概念図	 <i>Anal. Biochem.</i> 2013 <i>Anal. Biochem.</i> 2015	 K18A H25A D140H/A K179A R183A アミノ酸変換による検出範囲拡大 エネルギー移動 内部標準の導入	 アクセプター ドナー FRET HO-1 CPR (ΔTGEE) 1. ヘム結合 2. 蛋白質-蛋白質間相互作用

3. 研究の方法

タンパク質の発現・精製:それぞれの目的タンパク質をコードした遺伝子を発現ベクター(pET-15b, pET-21) に導入した発現コンストラクトを用いて発現用大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換し, IPTG による発現誘導を行った。発現後, 菌体を回収し, 超音波破碎, 硫酸分画, 透析を行い, Ni アフィニティークロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。

ヘムセンサーのヘム結合能の確認:各センサータンパク質 5 μ M を含む溶液にヘミンを 0.1 当量ずつ滴定し, 紫外可視吸光スペクトル測定によりセンサーがヘムと複合体を形成するか確認した。

ヘムセンサーとしての機能評価:各タンパク質 50 nM を含む溶液にヘミンを 0.1 当量ずつ滴定し, 適切な波長の励起光における蛍光強度変化を測定した。ヘミン濃度に対する蛍光強度変化をプロットし, 非線形カーブフィッティング解析により K_d 値を算出した。

哺乳細胞での機能評価:COS-7 細胞に EGFP - D140H または YFP - D140H - CFP を一過的に発現させ, 任意の濃度のヘミンで処理を行い, 共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて蛍光画像を撮影し, ImageJ による画像解析を行った。

4. 研究成果

A 第2世代ヘムセンサー(蛍光蛋白質融合型 HO-1)の改良

広い濃度域のヘムに対応するヘム親和性の異なるセンサーの開発:以前の研究で HO-1 のヘムとの相互作用部位であるアミノ酸残基 Lys18, Lys179, Arg183, His25 を Ala 置換したところ, ヘム親和性が低下することを見出している。そこで, EGFP - D140H にこれらの変異を導入し, EGFP - D140H/K179A, EGFP - D140H/K179A/R183A, EGFP - D140H/K18A/K179A/R183A, EGFP - D140H/H25A を作製し, ヘム親和性の変動を確認した。さらに, HO-1 の酵素活性部位を His ではなく Ala に置換したプローブ EGFP-D140A も作製し, EGFP - D140A および, EGFP - D140A に上記の変異を導入したプローブについてもヘム親和性を確認した(表2)。

ヘミン滴定による蛍光スペクトル測定によって K_d 値を求めたところ, 塩基性アミノ酸の Ala 置換による顕著な親和性の低下が見られなかった。そこで, HO-1 の酵素活性部位 Asp140 を Ala に置換した EGFP - D140A および EGFP - D140A/K179A, EGFP - D140A/K179A/R183A, EGFP - D140A/K18A/K179A/R183A を作製し, ヘム親和性を調べたところ, EGFP-D140H と比べて 1/10 ~ 1/20 倍の低下を確認した。EGFP - D140A/K18A/K179A/R183A では, ヘム親和性がミリモラーのレベルまで低下した。これにより, 遊離ヘムの検出範囲を拡大できた。

表2. 第2世代ヘムセンサーのヘム親和性

第2世代ヘムセンサー	K_d (nM)
EGFP - D140H	0.39
EGFP - D140H/K179A	0.91
EGFP - D140H/K179A/R183A	0.55
EGFP - D140H/K18A/K179A/R183A	3.1
EGFP - D140H/H25A	N.D.
EGFP - D140A	4.05
EGFP - D140A/K179A	2.78
EGFP - D140A/K179A/R183A	7.94
EGFP - D140A/K18A/K179A/R183A	N.D.

N.D.: not detected

細胞内ヘムのイメージングのための内部標準内蔵センサー(第2.5世代)の開発:従来の消光型センサーはヘム量を蛍光強度変化で評価しているため, センサーの発現量とヘムの増減を同一に評価してしまい, 正確な定量を困難にすることが考えられる。そこで, 蛍光強度変化ではなく, FRET による色調変化を検出するため, HO-1 の N 端に黄色蛍光タンパク質(YFP)を, C 端にシアン色蛍光タンパク質(CFP)を融合させたセンサー(YFP - D140H - CFP)を行作製した。

YFP - D140H - CFP を用いた *in vitro* での機能評価において, 異なる濃度のセンサーがヘミン依存的な蛍光強度比(YFP/CFP 比)の変化を示したことから, ヘム検出が可能であることが示唆された。哺乳細胞での機能評価において, ヘミン添加により YFP/CFP 比が減少したことから, YFP-D140H-CFP は色調変化型ヘムセンサーとして哺乳細胞で利用可能であると考えられる。

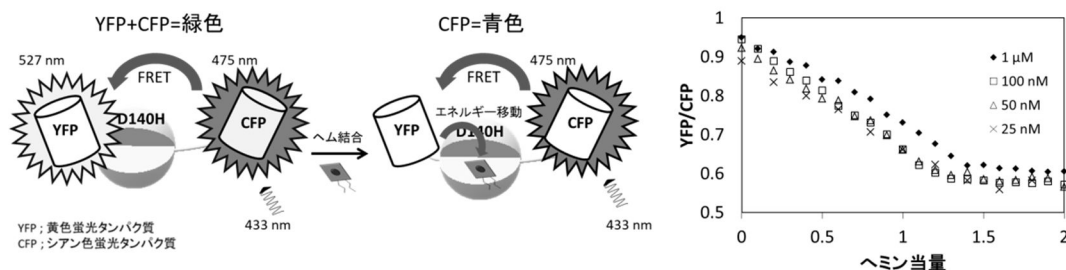
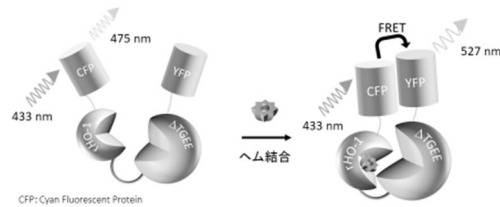


図2. YFP - D140H - CFP の設計と色調変化。(左)センサーの分子設計と検出原理。(右)ヘミン添加に伴う CFP 励起時の蛍光スペクトル測定から算出した蛍光強度比 YFP/CFP. 励起光; 433 nm センサー濃度; 25 nM ~ 1 μ M.

B 蛋白質-蛋白質間相互作用を利用した発光型ヘムセンサー（第3世代）の構築

1 分子型センサーの開発：FRET 型センサーとして、HO-1 と HO-1 のレドックスパートナータンパク質である CPR の融合タンパク質をデザインした。ヘム分解の際、HO-1 は CPR と相互作用することが明らかとなっており、以前の研究でホロ型 HO-1 と CPR の変異体 (Δ TGEE) の共結晶構造が解かれている。本研究では、HO-1 と Δ TGEE の相互作用を利用し、HO-1 - Δ TGEE 融合タンパク質の両端に CFP と YFP を融合させたセンサー (CFP - HO-1 - Δ TGEE - YFP) を作製し、HO-1 - Δ TGEE 相互作用により生じる FRET による色調変化を利用して、細胞内の遊離ヘムの動態を追跡可能なバイオセンサーの開発を行った。



CFP - HO-1 - Δ TGEE - YFP を作製し、CFP 励起状態で蛍光スペクトルを測定したところ、ヘミン滴下前から 527 nm における YFP の蛍光のピークが観測され、ヘミン非存在下ですでに FRET が生じていることが示唆された。その後、ヘミン濃度が増大するに応じて、CFP と YFP の蛍光強度がともに減少した。以前蛍光タンパク質を融合させた HO-1 にヘミンを滴下すると、蛍光タンパク質のエネルギーが HO-1 に結合したヘムに吸収されることが観測されており、FRET ドナーである CFP の蛍光エネルギーが、HO-1 に結合したヘムに吸収されたことにより、CFP と YFP の蛍光がともに減少したと考えられた。

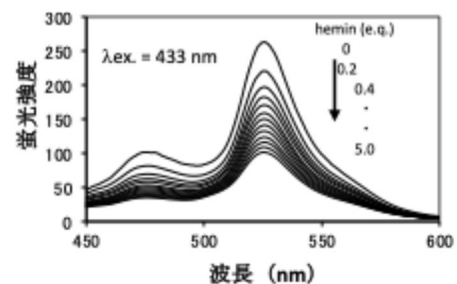
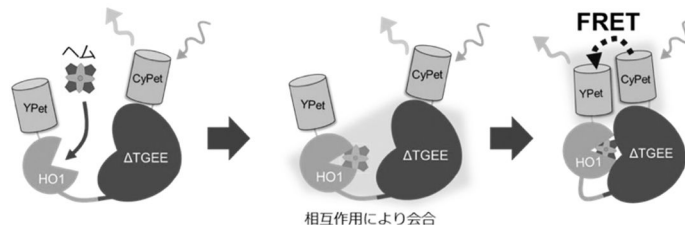


図3.ヘミン滴下ごとの蛍光スペクトル(センサー濃度; 50 nM, 測定波長; 450 - 600 nm, 励起波長; 433 nm)

次に、CFP からヘムへのエネルギー吸収を回避するために蛍光蛋白質の配置を入れ替えたセンサー (YFP - HO-1 - Δ TGEE - CFP) について検討を行った。



90 nM センサーのヘミン滴定を蛍光スペクトルで観測したところ、ヘミン添加前から CFP に加えて YFP の蛍光がみられ、既に FRET が起こっていることが示唆された(図4)。ヘミン添加に伴って CFP の蛍光が減少したが、YFP の蛍光の増強は見られなかった。また、このセンサーは凝集体を形成しやすく、溶液中で長時間安定に存在できない欠点があった。これは融合タンパク質の分子量の大きさに起因すると考えられた。

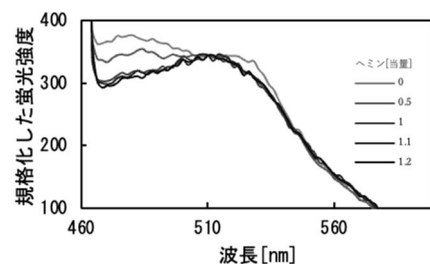
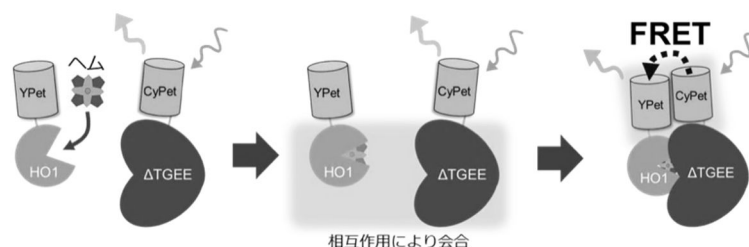


図4. YFP-HO-1- Δ TGEE-CFP (90 nM) のヘミン滴定における蛍光スペクトル変化

2 分子型センサーの開発：1 分子型ではドナーとアクセプターの距離が近いことが示唆された。また、可溶性にも問題があった。そこで、一分子型ヘムセンサーの HO1 - Δ TGEE 間を切り離して 2 分子化し、ヘム添加前は FRET が生じず、ヘム存在下でのみ FRET が生じることを想定した YFP - HO1 および Δ TGEE - CFP からなる 2 分子型ヘムセンサーを開発した。



2分子型FRETヘムセンサーに既知濃度のヘム溶液を添加した時の蛍光スペクトルや蛍光強度を測定し、ヘム濃度と蛍光強度変化の関係から機能評価を行った。その結果、ヘムの添加によりCFPの477 nmの蛍光強度が低下し、YFPの525 nmの蛍光強度が上昇したことから、FRETを生じることが示唆された。ヘミンと本センサーの相互作用について、ヘミン濃度に対するYFPとCFPの蛍光強度比の解析から解離定数は1.6 nMと推定された。上記の結果より、YPet-HO-1とTGEE-CFPはヘム存在下で複合体を形成し、FRETを生じることが示唆され、ヘムセンサーとしての応用が期待される。

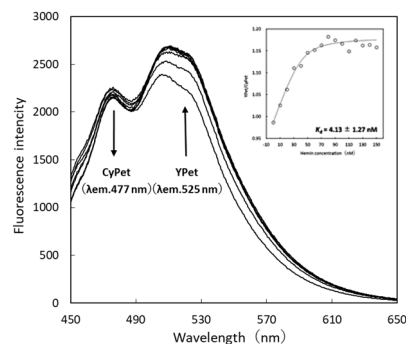


図5. 二分子型FRETヘムセンサーにヘミンを滴定した時の蛍光スペクトル変化

A 生体由来サンプル中ヘム測定方法の確立

血清サンプル中の遊離ヘムの精密な定量に向け、非特異的に結合したヘムの遊離処理について検討を行うとともに、生体物質に非特異的に結合して存在するヘムの量を評価するために、消光したヘムセンサーの蛍光を回復させる新たな利用法の検討も行った。

ヘミンとウシ血清アルブミンを共存させた非特異結合ヘムのモデルを用いたところ、非イオン性界面活性剤(Tween20, Triton X-100)によってヘムを遊離できる可能性が示唆された(図6左)。また、生体サンプルに吸着されるヘム量を評価する方法として、ヘムで飽和したセンサーからのヘムの遊離に起因する蛍光回復が指標として利用可能であることが示された(図6右)。

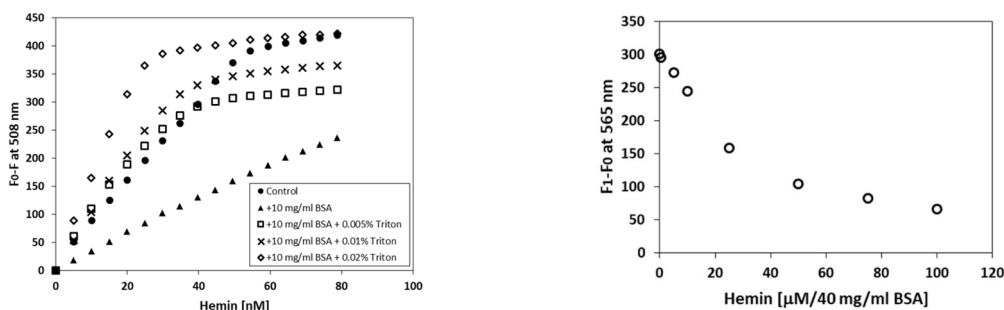


図6. 血清サンプル中の遊離ヘム定量およびセンサーの新規利用法の検討。(左) Triton X-100 処理ヘミン/BSA サンプル滴定時の蛍光強度減少幅の比較。(右) BSA 共存ヘミン濃度別蛍光増大幅の比較。BSA に共存させたヘミン濃度に対し、サンプル1回滴定時の蛍光強度の増大幅 $F_1 - F_0$ をプロットした。

B 細胞内ヘムのバイオイメーjing解析

一過的にヘムセンサーを細胞内に発現させると、発現量のばらつきによって定量が困難になることが懸念される。そこでまず、発現量の変動が生細胞におけるヘムの定量に及ぼす影響を考慮するため、EGFP-D140H(第2世代センサー)の一過性発現細胞株を作製し、発現量変動が緩やかな時間域を探索した。そしてヘム生合成を亢進する5-アミノレブリン酸(5-ALA)で処理し、生細胞内においてヘム濃度変化に基づいた蛍光消光が起こるのかを検討した。

哺乳細胞へのトランスフェクション後72時間までEGFP-D140Hの発現量は増大し、その後はほぼ一定であった。2 mM 5-ALAで処理した細胞の蛍光強度と未処理の細胞の蛍光強度の間に有意な差は生じなかったが、50 mM 処理では、蛍光強度が約60%減少し、未処理の細胞の蛍光強度との間に有意な蛍光強度差が生じた。細胞ライセート中のヘム量は、50 mM 5-ALA 処理によって約2倍上昇していたことから、この蛍光強度減少は生細胞内ヘム濃度上昇によって生じたことが示唆された。しかし、このとき培地のpH変化が生じて細胞死が起きた可能性がある。

同様の実験をYFP-D140H-CFP(第2.5世代センサー)を用いて行ったところ、5 mM 5-ALAの添加によって蛍光強度に変化が見られなかった。そこで、培地中に終濃度10 μMとなるようにヘミンを添加し、24時間で蛍光顕微鏡を用いて観察後、ライセートの蛍光スペクトルを測定し、蛍光強度比YFP/CFPを算出した。蛍光画像から明らかな色調の変化は観察されなかったが、ライセートの蛍光スペクトルから算出したYFP/CFP値のわずかな減少が観察された。

次に、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて、上記と同様の操作によりトランスフェクション後の48時間が経過した時点で終濃度10 μMとなるようにヘミンを添加し、1時間のインキュベーション後に観察を行った。その結果、CFPの励起によってFRETが生じていることが示唆された。ImageJによる画像解析から算出した相対的なYFP/CFPの蛍光強度比は、ヘミンを添加していない細胞では1時間経過後に増加が見られた。一方でヘミン添加では僅かに減少が見られた。したがって、YFP-D140H-CFPは外因的に増加したヘムによって色調の変化を示すため、細胞内遊離ヘム検出のためのバイオセンサーとして利用できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takemoto Misaki, Sakamoto Hiroshi, Higashimoto Yuichiro, Taira Junichi	4. 巻 60
2. 論文標題 Complex Formation of Heme Oxygenase-2 with Heme Is Competitively Inhibited by the Cytosolic Domain of Caveolin-1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2300 ~ 2308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.1c00247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugishima M., Taira J., Sagara T., Nakao R., Sato H., Noguchi M., Fukuyama K., Yamamoto K., Yasunaga T., Sakamoto H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Conformational equilibrium of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase is essential for heme oxygenase reaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox9080673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Junichi Taira, Keisuke Yoshida, Misaki Takemoto, Kousaku Hanada, Hiroshi Sakamoto	4. 巻 25
2. 論文標題 Dephosphorylation of clustered phosphoserine residues in human Grb14 by protein phosphatase 1 and its effect on insulin receptor complex formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Peptide Science	6. 最初と最後の頁 e3207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/psc.3207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taira J., Nagano T., Kitamura M., Yamaguchi M., Sakamoto H., Aoki S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Structural modification of a novel inhibitor for mycobacterium enoyl-acyl carrier protein reductase assisted by in silico structure-based drug screening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Mycobacteriology	6. 最初と最後の頁 12-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/ijmy.ijmy_184_19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taira J., Umei T., Inoue K., Kitamura M., Berenger F., Sacchettini J.C., Sakamoto H., Aoki S..	4. 巻 73
2. 論文標題 Improvement of the novel inhibitor for Mycobacterium enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA): a structure-activity relationship study of KES4 assisted by in silico structure-based drug screening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 372-381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-020-0293-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keisuke Yoshida, Junichi Taira, Hideyuki Komatsu, Hiroshi Sakamoto	4. 巻 1
2. 論文標題 Identification of Protein Phosphatases Involved in Dephosphorylation of Phosphoserines in Human Grb14 BPS Domain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peptide Science 2018	6. 最初と最後の頁 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 徳永 誠、藤田美海、黒田 翔、平 順一、坂本 寛
2. 発表標題 ヘムオキシゲナーゼ1のヘム捕捉における膜局在の影響とヘムシャペロンの関与
3. 学会等名 令和4年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田圭介、杉島正一、平 順一、坂本 寛
2. 発表標題 ヘムオキシゲナーゼ1とシトクロムP450還元酵素の複合体形成を利用した二分子間FRETヘムセンサーの開発
3. 学会等名 第28回 日本生物工学会九州支部 佐賀大会（2022）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武本美沙希, 平順一, 東元祐一郎, 坂本寛
2. 発表標題 分析用超遠心を用いたヘムオキシゲナーゼ2とカベオリン1の細胞内領域の複合体形成の親和性解析
3. 学会等名 2019年度 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武本美沙希, 平順一, 東元祐一郎, 坂本寛
2. 発表標題 カベオリン-1によるヘムオキシゲナーゼ-2の酵素活性の競合阻害および超遠心分析による複合体形成の解析
3. 学会等名 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長濱和樹, 中島音海, 平順一, 小松英幸, 坂本寛
2. 発表標題 細胞内遊離ヘムの検出濃度レンジ拡大に向けたヘムバイオプローブの親和性の改変
3. 学会等名 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉島正一, 佐藤秀明, 和田啓, 平順一, 坂本寛, 山本健
2. 発表標題 NADP添加によるNADPH-シトクロムP450還元酵素とヘムオキシゲナーゼ間の相互作用増大の構造的要因
3. 学会等名 平成30年度 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田和也, 井之上実希, 平順一, 小松英幸, 杉島正一, 坂本寛
2. 発表標題 ヘム分解関連酵素間の特異的相互作用を基盤とする分子内FRETヘムプローブの開発
3. 学会等名 平成30年度 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平順一, 武本美沙希, 上岡歩美, 東元祐一郎, 坂本寛
2. 発表標題 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
3. 学会等名 平成30年度 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平順一, 相良達哉, 杉島正一, 坂本寛
2. 発表標題 構造変化を伴うNADPH-シトクロムP450還元酵素とヘムオキシゲナーゼ-1の複合体形成の沈降平衡法による解析
3. 学会等名 平成30年度 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井之上実希, 松田和也, 平順一, 小松英幸, 杉島正一, 坂本寛
2. 発表標題 ヘムオキシゲナーゼ1とシトクロムP450還元酵素の相互作用を利用した分子内FRETヘムセンサーの開発
3. 学会等名 第42回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長濱和樹, 中島音海, 平順一, 小松英幸, 坂本寛
2. 発表標題 ヘムオキシゲナーゼ-1を基盤としたヘムバイオプローブのヘム親和性の改変
3. 学会等名 第42回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武本美沙希, 平順一, 坂本寛
2. 発表標題 カベオリン-1スキファールドドメインによるヘムオキシゲナーゼ-2酵素活性の競合的阻害
3. 学会等名 第42回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田圭佑, 平順一, 小松英幸, 坂本寛
2. 発表標題 Grb14 BPSドメインのセリン残基クラスターの脱リン酸化に關与するホスファターゼの探索
3. 学会等名 第42回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Sakamoto, Junichi Taira, Masakazu Sugishima
2. 発表標題 Structure and Mechanism of Heme Degrading Enzyme and its Application for Detecting Heme
3. 学会等名 The 17th Akabori Conference (German-Japanese Symposium on Peptide Science) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池永康幸, 祁答院涉, 田下美沙貴, 平順一, 小松英幸, 坂本寛
2. 発表標題 細胞内における一過的遺伝子導入に起因する蛍光消光型ヘムプローブの発現量変動とその改善
3. 学会等名 第25回 日本生物工学会九州支部 鹿児島大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keisuke Yoshida, Junichi Taira, Hideyuki Komatsu, Hiroshi Sakamoto
2. 発表標題 Identification of Protein Phosphatases Involved in Dephosphorylation of Phosphoserines in Human Grb14 BPS Domain
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平 順一 (Taira Junichi) (20549612)	九州工業大学・大学院情報工学研究院・准教授 (17104)	
研究分担者	森本 雄祐 (Morimoto Yusuke) (50631777)	九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授 (17104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------