

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19423

研究課題名（和文）細胞内遊離ヘム：細胞増殖／細胞分化を関連付けるシグナル機能の解析

研究課題名（英文）Intracellular labile heme: signaling function in cell differentiation and proliferation

研究代表者

菅井 学（Sugai, Manabu）

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：90303891

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：細胞分化過程におけるフリーヘムのシグナル伝達機能は、最近登場したばかりの新しい概念であり、それを裏付ける生理学的証拠は、私たちを含む2つの研究グループによって提供された。しかし、信頼性の高いフリーヘムセンサーがまだないため、その関連性を正確に評価することは難しい状況にある。このプロジェクトでは、さまざまな種類の細胞内のシグナル伝達分子としてのフリーヘムの生理学的役割を検証および調査することを目的として、新規のフリーヘムセンサーを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘムに結合する転写因子（分化、老化、リズムに関わる）が多数見出されたため、細胞分化や細胞機能制御因子としてのヘムの役割に注目が集まっている。最近生理的条件下でヘムが分化制御因子として機能していることを申請者を含む二つのグループが明らかにした。このヘムによる分化制御機能の一般性をさらに詳細に解析するためには、実際に生体内で制御因子として機能している「細胞内遊離ヘム」を感度良く特異的に検出するプローブを開発することが必要である。本研究課題において開発に成功したことから、ようやく「細胞内遊離ヘム」の生理的機能を明らかにすることが可能になったと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The signaling function of free-heme in cell differentiation processes is a new concept that has only recently emerged and the supporting physiological evidences for it were provided by the two research groups, including us. However, its relevance cannot be evaluated precisely because a reliable free-heme sensor is not yet available. In this project, we developed free-heme sensor to verify and examine the physiological role of free-heme as a signaling molecule within various types of cells.

研究分野：分子生物学 分子免疫学

キーワード：ヘム 細胞分化 細胞増殖

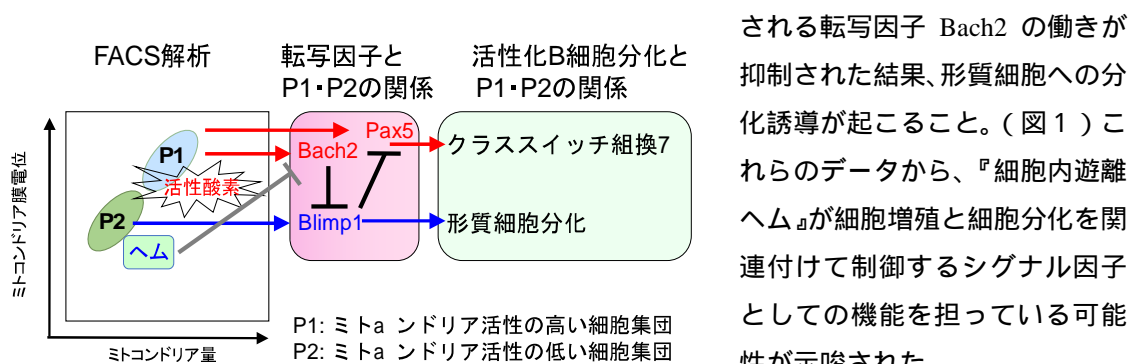
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞が分化する際、細胞増殖の変化を伴うことは広く知られている事実である。例えば、増殖(分裂)していない血液幹細胞から様々な血液細胞を生み出すためには、血液幹細胞が増殖することが必要である。さらに増殖する血液幹細胞から生み出される様々な血液細胞の前駆細胞は、それぞれの系列に固有の細胞増殖能を持つことも知られているが、細胞増殖と分化を関連付けて制御する分子機構の詳細は不明である。細胞にとって最も基本的な性質である細胞増殖と細胞分化の関係を正しく理解し、その作動原理の全体像を明らかにすることは、重要な課題の一つである。この課題の解明には、細胞増殖と細胞分化を関連付けて制御している新しい因子の同定が必要であると考えられるが、そういった機能を担う因子を同定しようとする試みは今のところ成功していない。

申請者は活性化B細胞の分化方向を決定するメカニズムの解析から以下のことを明らかにした。

活性化B細胞はミトコンドリア活性の違いで二つの細胞集団(P1とP2)に分類されること。ミトコンドリア活性の変化は細胞増殖の変化に先行して起こること。ミトコンドリア活性の高い細胞(P1)ではクラススイッチ組換えが誘導され、低い細胞(P2)では形質細胞分化が誘導されること。ミトコンドリア活性の高い細胞(P1)では、活性酸素の産生が亢進し、この活性酸素がヘムの合成を抑制すること。ヘム合成が盛んなP2細胞では、ヘムによって機能が抑制



される転写因子 Bach2 の働きが抑制された結果、形質細胞への分化誘導が起こること。(図1)これらのデータから、『細胞内遊離ヘム』が細胞増殖と細胞分化を関連付けて制御するシグナル因子としての機能を担っている可能性が示唆された。

図1 活性化B細胞のミトコンドリア染色によるFACS解析：

活性化B細胞は二つの細胞集団に分かれた。それぞれの領域をP1,P2と名付けた。

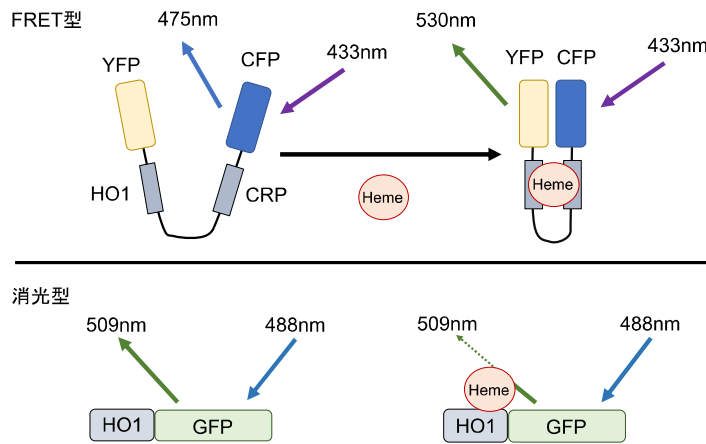
2. 研究の目的

『細胞が分化する際、細胞増殖の変化を伴う』といった、昔から知られている現象の分子の実態を明らかにすることを目的とした研究提案である。申請者は、増殖と分化を結びつける候補機能分子として『細胞内遊離ヘム』に注目した。細胞増殖能の変化に先行して変動する『細胞内遊離ヘム』が、生体内で分化制御因子として機能している可能性を検証する。

3. 研究の方法

シグナリング分子としての機能を持つことが推定される、タンパク質に結合していない『細胞内遊離ヘム』だけを選択的に定量することは困難である。また、一つの細胞内のヘムの定量でさえ、感度的に難しいといった問題がある。これらの問題を解決することを目的として、蛍光タンパク質を用いたヘムプローブを作成し、一つの細胞内に存在する『細胞内遊離ヘム』を生きたまま検出できる新しい手法の開発を目指し以下の実験を計画した。

ヘム分解酵素である HO-1 の酵素活性を失活させた変異体を用いて消光型もしくは FRET 型プローブを作成する(図2)。FRET 型は、HO-1 にヘム依存的に結合する CRP を連結したプローブを作成し、ヘムによる構造変化を FRET で検出する。消光型は、ヘムが特定の波長の光を吸収することを利用する。ここで用いるヘムプローブタンパク質は、P2A と呼ばれる self-cleaving peptide を介して波長の異なる別の蛍光タンパク質(図3では BFP)と結合したものが完成形となる。翻訳後に切断されるこの蛍光タンパク質の蛍光強度に対するヘムプローブの蛍光強度を調べる事



によって、細胞内遊離ヘムを定量する。ヘムに対する親和性の異なる複数のヘムプローブを作成し、それらのヘムプローブが全身で発現するトランスジェニックマウスを作成することによって、シグナリング因子としての『細胞内遊離ヘム』の機能を評価することを目指す。

図2 各種ヘムセンサーのデザイン

4. 研究成果

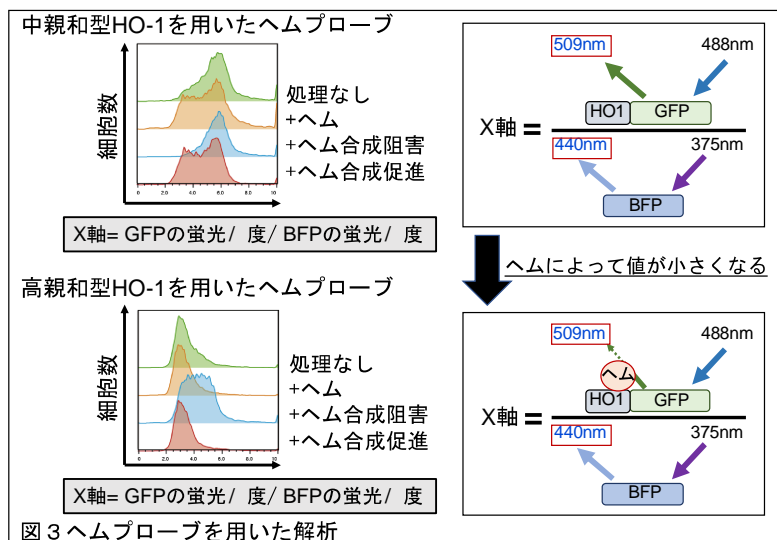


図3 ヘムプローブを用いた解析

FRET 型のヘムプローブであるが、検出システムとしては消光型より優れていると考え精力的に実験を進めたが、適切に FRET を誘導できる融合タンパク質の作成には至らなかった。消光型ヘムプローブでは、ヘムに対する親和性の異なる様々な HO-1 分子を用いてヘムプローブを作成し、『細胞内遊離ヘム』を定量する

予備実験を行なった。図3はその実験結果の一部である。HEK293T 細胞にヘムプローブを一過性に発現させ、細胞内ヘムの量を増減させる処理による細胞内遊離ヘム量の相対的变化を測定し、ヘムプローブによる『細胞内遊離ヘム』検出の妥当性を評価した。ヘムに対する親和性が中等度のプローブでは、ヘムの添加やヘム合成の促進によって、細胞内遊離ヘム量の増加が観察された。また、ヘム合成阻害剤の添加により細胞内遊離ヘム量の減少が観察された。ヘムに対する親和性が強いプローブでも基本的には同様の結果が得られている。これらのヘムプローブを発現するトランスジェニックマウスを作成し、様々な組織における『細胞内遊離ヘム』量の違いが検出できることを確認するところまで終了している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Murashima-Suginami A., Kiso H., Tokita Y., Mihara E., Nambu Y., Uozumi R., Tabata Y., Bessho K., Takagi J., Sugai M., Takahashi K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Anti-USAG-1 therapy for tooth regeneration through enhanced BMP signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabf1798
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abf1798	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 Takahashi Katsu, Kiso Honoka, Murashima-Suginami Akiko, Tokita Yoshihito, Sugai Manabu, Tabata Yasuhiko, Bessho Kazuhisa	4. 巻 40
2. 論文標題 Development of tooth regenerative medicine strategies by controlling the number of teeth using targeted molecular therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 00130-x
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-020-00130-x	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 Utsunomiya Akira, Chino Takenao, Utsunomiya Natsuko, Luong Vu Huy, Tokuriki Atsushi, Naganuma Tatsuro, Arita Makoto, Higashi Kiyoshi, Saito Koichi, Suzuki Noriyuki, Ohara Ayako, Sugai Manabu, Sugawara Koji, Tsuruta Daisuke, Oyama Noritaka, Hasegawa Minoru	4. 巻 140
2. 論文標題 Homeostatic Function of Dermokine in the Skin Barrier and Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 838 ~ 849.e9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2019.09.011	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 Katsuhiko Itoh, Gen Kondoh, Hitoshi Miyachi, Manabu Sugai, Yoshiyuki Kaneko, Satsuki Kitano, Hitomi Watanabe, Ryota Maeda, Akihiro Imura, Yu Liu, Chizuru Ito, Shigeyoshi Itoharu, Kiyotaka Toshimori, and Jun Fujita	4. 巻 12
2. 論文標題 Dephosphorylation of protamine 2 at serine 56 is crucial for murine sperm maturation in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaao7232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.aao7232	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 Kiso H., Takahashi K., Mishima S., Murashima-Suginami A., Kakeno A., Yamazaki T., Asai K., Tokita Y., Uozumi R., Sugai M., Harada H., Huang B., MacDougall M., Bessho K.	4. 巻 98
2. 論文標題 Third Dentition Is the Main Cause of Premolar Supernumerary Tooth Formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 968 ~ 974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034519858282	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 該当する

1. 著者名 Nitta Akari, Hori Kazuya, Tanida Isei, Igarashi Ayumi, Deyama Yasuyo, Ueno Takashi, Kominami Eiki, Sugai Manabu, Aoki Koji	4. 巻 508
2. 論文標題 Blocking LC3 lipidation and ATG12 conjugation reactions by ATG7 mutant protein containing C572S	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 521 ~ 526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.158	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 Yamazaki Yuji, Nambu Yukiko, Ohmae Masashi, Sugai Manabu, Kimura Shunsaku	4. 巻 16
2. 論文標題 Immune responses against Lewis Y tumor-associated carbohydrate antigen displayed densely on self-assembling nanocarriers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 8095 ~ 8105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8OB01955J	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 Isobe Yu, Takahashi Katsu, Kiso Honoka, Nakao Kazumasa, Ikeno Masayuki, Koyama Noriaki, Sugai Manabu, Shimizu Akira, Haga Hironori, Bessho Kazuhisa	4. 巻 93
2. 論文標題 Direct evidence for the age-dependent demise of GNAS -mutated cells in oral fibrous dysplasia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 133 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2018.05.018	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 Mori Kentaro, Nakamura Harumi, Kurooka Hisanori, Miyachi Hitoshi, Tamada Kota, Sugai Manabu, Takumi Toru, Yokota Yoshifumi	4. 巻 38
2. 論文標題 Id2 Determines Intestinal Identity through Repression of the Foregut Transcription Factor Irx5	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00250-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00250-17	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 Saito Kazuyuki, Takahashi Katsu, Huang Boyen, Asahara Masakazu, Kiso Honoka, Togo Yumiko, Tsukamoto Hiroko, Mishima Sayaka, Nagata Masaki, Iida Machiko, Tokita Yoshihito, Asai Masato, Shimizu Akira, Komori Toshihisa, Harada Hidemitsu, MacDougall Mary, Sugai Manabu, Bessho Kazuhisa	4. 巻 8
2. 論文標題 Loss of Stemness, EMT, and Supernumerary Tooth Formation in Cebp ^{+/+} Runx2 ^{+/+} Murine Incisors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 23515-y
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23515-y	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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	南部 由希子 (Nambu Yukiko) (70580380)	福井大学・学術研究院医学系部門・准教授 (13401)	
研究分担者	林 達成 (Hayashi Tatsunari) (80781111)	福井大学・学術研究院医学系部門・特命助教 (13401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	坂本 寛 (Sakamoto Hiroshi) (70309748)	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