

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19770105

研究課題名（和文）

ヘム生合成に関与するポルフィリンのミトコンドリア集積機構の解明

研究課題名（英文）

Analysis of the mitochondrial accumulation of heme precursors for heme biosynthesis

研究代表者

加部 泰明 (Yasuaki Kabe)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20397037

研究成果の概要：

我々が開発してきたナノアフィニティビーズを用いたスクリーニングシステムにより、ヘム前駆体ポルフィリンの新規結合タンパク質として、ミトコンドリア内トランスポーターadenine nucleotide transporter (ANT)の同定に成功した。この結合情報を基盤として、経路が不明であったヘム前駆体のミトコンドリア集積機構を明らかとして、ANT がヘム生合成に重要な働きをすることを解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ポルフィリン、ヘム生合成、ミトコンドリア、トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、高効率・高純度かつ簡便に目的分子の単離・精製することが出来るアフィニティスクリーニング技術の開発を行って来た。この精製システムを用いる事により、従来困難であった薬剤などの低分子化合物に選択的に結合する標的タンパク質を、細胞や組織の粗抽出液などからワンステップで精製・同定することが可能である。この

ようなシステムを応用して、生体内分子であるヘムおよびこれに関連するポルフィリン誘導体の細胞内標的タンパク質を網羅的に同定することにより、これらの未知の生理機能の解明を行っている。この研究課題の一環として、ヘム前駆体ポルフィリンがミトコンドリア集積性を示す事に着目し、これらのミトコンドリアにおける標的タンパク質を同定することにより、その輸送メカニズムの解

明を目指して解析を行ってきた。

2. 研究の目的

ヘム (図1) は、中心部に鉄原子が配位したポルフィリン環構造を持つ化合物であり、生体内において酸素運搬 (ヘモグロビン) ミトコン

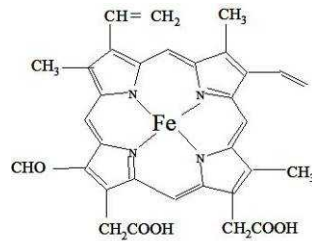


図1 ヘムの構造

ドリア呼吸、酸化還元反応など様々な生体反応に必須の補因子として働くことがよく知られている。我々はこれまでに、ヘムを始めとするポルフィリン誘導体が細胞内においてミトコンドリアに集積する特性に着目して、この分子メカニズムの解明を行ってきた (Kabe Y et al., J.Biol.Chem., 281(42):31729-31735, 2006)。

ヘムは細胞内において、8つのヘム合成酵素群による代謝を経て合成されるが、その合成経路は複雑で、細胞質中でポルフィリン母核構造を有するヘム前駆体が形成されて修飾され、これが細胞質からミトコンドリア内膜へと移行して最終的にヘムが合成される。このようにヘムの形成において、ヘム前駆体ポルフィリンのミトコンドリアへの移行・集積が必須であるが、その分子機構については全く不明であった。本研究では、独自に発見したポルフィリンのミトコンドリア集積機構に関する知見を基盤として、未知のヘム合成機構の解明を目的としている。

3. 研究の方法

ヘム前駆体ポルフィリンのミトコンドリア内標的タンパク質の同定

我々が開発してきたナノアフィニティビーズを用いて、ポルフィリン誘導体固定化ビーズを作製し、ラット肝臓ミトコンドリア抽出液からこれに結合するタンパク質の精製を行い、同定する。

ヘム前駆体のミトコンドリア集積能の解析

ラット肝臓のミトコンドリアを用いて、試験管内でヘム前駆体の取り込み実験を行い、上記で同定したトランスポーターに対する基質を加えることにより競合実験を行うことにより、ヘム前駆体のミトコンドリア輸送メカニズムについて生化学的な知見を得る。

ヘム前駆体トランスポーターのヘム生合

成に対する効果の解析

上記で得たトランスポーターを介したヘム前駆体ポルフィリンのミトコンドリア集積作用とヘム生合成系との相関を明確にするために、酵母を用いた遺伝学的解析を行う。具体的には、標的トランスポーター遺伝子を欠損させた酵母変異株を作製し、このヘム生合成 (細胞内ヘム量) の検討および、ヘム前駆体の蓄積・細胞内動態異常 (ミトコンドリア集積異常) を検討することにより、標的トランスポーターを介したヘム生合成系への関与を検証する。

4. 研究成果

ヘム前駆体のミトコンドリア内標的タンパク質の同定

ヘムおよびヘム前駆体プロトポルフィリンIX (PP IX) を固定化したアフィニティビーズを作製し、ミトコンドリア抽出液からこれに結合するタンパク質を精製した。この結果、ヘムおよびPP IXの両者に特異的に結合するバンドが得られ (図2)、これをMSスペクトルで同定した所、ミトコンドリア内膜中のトランスポーターの一つadenine nucleotide transporter (ANT) である事が分かった。

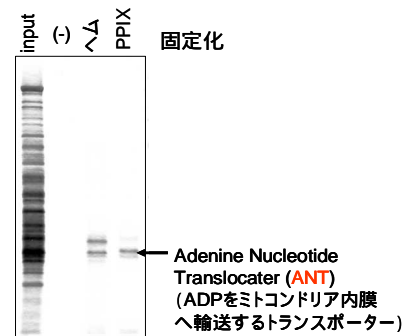


図2 ヘム前駆体の標的タンパク質の精製

ANTを介したヘム前駆体のミトコンドリア集積作用の解析

上記のスクリーニングで同定されたANTは、細胞質のADPをミトコンドリア内膜中へ輸送するトランスポーターである事が知られている。そこで、ANTを介したヘム前駆体のミトコンドリア集積作用を検討するために、ラット肝臓から単離したミトコンドリアを用いて、PP IXのミトコンドリア取り込み活性におけるADPとの相関について解析した。この結果、PP IXおよびヘムは、GDP, CDPやAMPなどの他の核酸では影響を受けないが、ADPと競合的にミトコンドリアへ移行することが分かり、やはりヘム前駆体はANTを介してミトコンドリア

へ集積されることが強く示唆された。

ANTのヘム生合成における役割

真核細胞中におけるトランスポーターを介した、ヘムおよびヘム前駆体のミトコンドリア内への運搬能ならびにヘム生合成系への関与について評価するために、酵母の数種のトランスポーター欠損株を作成に成功した。これらの欠損株の内、特にANTの発現を欠損させた変異株において顕著なヘム合成の減少と、ヘム前駆体の細胞内での蓄積が起ることを見出した。

以上の研究結果から、ANTがヘム前駆体ポルフィリンをミトコンドリア内に輸送することにより、ヘム生合成に関与することが強く示唆された。また、これらの成果は、学術誌PLoS ONE(27号、2008年)に掲載され高い評価を受けている。

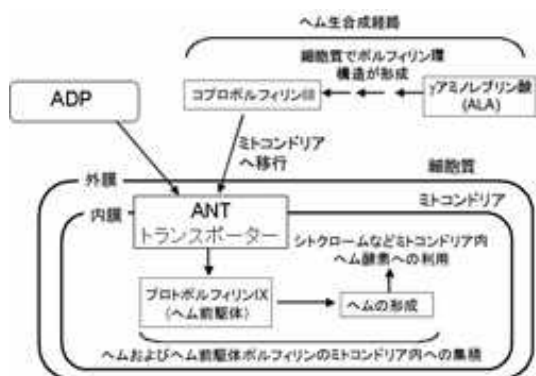


図3 ヘム前駆体ポルフィリンのミトコンドリア集積機構のモデル

このような新たなヘム生合成経路の解明は学術的な興味にとどまらず、ヘム代謝異常性疾患(ポルフィリン症)の診断・治療への応用展開も期待出来る。ポルフィリン症はヘム生合成経路の異常により発症する遺伝性疾患であり、これまでヘム合成酵素群に焦点を絞って解析がなされてきたが、遺伝性変異がヘム合成酵素群に該当しない症例も多く、未だ医学的治療法が確立されていない難治性疾患である。ポルフィリンのミトコンドリア集積機構に関する知見や、これを基盤としたヘム生合成系の調節機構の基礎的な解析は、ポルフィリン症の未知の発症要因の解明や、これを応用した新たな診断・治療法の開発へと発展することが期待される。

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)

1, Kuramori C, Azuma M, Kume K, Kaneko Y, Inoue A, Yamaguchi Y, Kabe Y, Hosoya T, Kizaki M, Suematsu M, Handa H. Capsaicin binds to prohibitin 2 and displaces it from the mitochondria to the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun.* 379(2):519-525, 2009. (査読有り)

2, Kuramori C, Hase Y, Hoshikawa K, Watanabe K, Nishi T, Hishiki T, Soga T, Nashimoto A, Kabe Y, Yamaguchi Y, Watanabe H, Kataoka K, Suematsu M, Handa H. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate targets glycogen debranching enzyme and affects glycogen metabolism in rat testis. *Toxicol Sci.* 109(1):143-151, 2009. (査読有り)

3, Sakamoto S, Kabe Y, Hatakeyama M, Yamaguchi Y, Handa H. Development and application of high performance affinity beads: toward chemical biology and drug discovery. *Chem Rec.* 9(1):66-85, 2009. (査読有り)

4, Yoshida M, Kabe Y, Wada T, Asai A, Handa H. A new mechanism of 6-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-3-hydroxy-7H-indeno(2,1-c)quinolin-7-one dihydrochloride (TAS-103) action discovered by target screening with drug-immobilized affinity beads. *Mol Pharmacol.* 73(3):987-994, 2008. (査読有り)

5, Suzuki M, Furukawa S, Kuramori C, Sawa C, Kabe Y, Nakamura M, Sawada J, Yamaguchi Y, Sakamoto S, Inouye S, Handa H. Development of a chemical screening system using aqueorin-fused protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 368(3):600-605, 2008 (査読有り)

6, Ando K, Hirao S, Kabe Y, Ogura Y, Sato I, Yamaguchi Y, Wada T, Handa H. A new APE1/Ref-1 dependent pathway leading to reduction of NF- κ B and AP-1, and activation of their DNA-binding activity. *Nucleic Acids Res.* 36(13):4327-4336, 2008. (査読有り)

7, Azuma M*, Kabe Y*, Kuramori C, Kondo M, Yamaguchi Y, Handa H. (*double first

authorship) Adenine nucleotide translocator transports haem precursors into mitochondria. PLoS ONE. 3(8):e3070, 2008. (査読有り)

8, Zou GM, Karikari C, Kabe Y, Handa H, Anders RA, Maitra A. The Ape-1/Ref-1 redox antagonist E3330 inhibits the growth of tumor endothelium and endothelial progenitor cells: therapeutic implications in tumor angiogenesis. J Cell Physiol. 219(1):209-218, 2008. (査読有り)

9, Hase Y, Tatsuno M, Nishi T, Kataoka K, Kabe Y, Yamaguchi Y, Ozawa N, Natori M, Handa H, Watanabe H. Atrazine binds to F1F0-ATP synthase and inhibits mitochondrial function in sperm. Biochem Biophys Res Commun. 366(1):66-72, 2008. (査読有り)

10, Iizumi Y, Sagara H, Kabe Y, Azuma M, Kume K, Ogawa M, Nagai T, Gillespie PG, Sasakawa C, Handa H. The enteropathogenic E. coli effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. Cell Host Microbe. 2(6):383-392, 2007. (査読有り)

〔学会発表〕(計4件)

1, 加部泰明, 「HSP27 を介したヘム毒性に対する生体防御機構」第31回日本分子生物学会年会、神戸(2008年12月9日)(口頭&ポスター発表)

2, 加部泰明, 「赤血球分化におけるヘム毒性に対する生体防御機構」第3回ケミカルバイオロジー学会、東京(2008年6月18日)(口頭&ポスター発表)

3, 加部泰明, 「ヘム刺激による赤血球分化における細胞防御機構の解析」第30回日本分子生物学会年会、横浜(2007年12月14日)(ポスター発表)

4, 加部泰明, 「ヘム生合成に関わるヘム前駆体のミトコンドリア集積機構の解析」第3回ケミカルバイオロジー学会、京都(2007年5月9日)(ポスター発表)

〔図書〕(計2件)

1, Yasuki Kabe, Mamoru Hatakeyama, Kousuke Nishio and Hiroshi Handa, Novel application of affinity beads, 「Chemical

Biology/Chemical Genetics」CMC press, in press, 2009.

2, 加部泰明, 半田宏、ナノアフィニティ磁性ビーズを用いたケミカルバイオロジー戦略、蛋白質核酸酵素、共立出版、52, pp1637-1642, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加部 泰明 (Yasuaki Kabe)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 20397037

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し