

令和 4 年 4 月 21 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06574

研究課題名(和文)新規メディカルガス一酸化炭素(CO)産生酵素の翻訳後修飾による活性調節機構

研究課題名(英文) Post-translational modifications regulating the activity and function of carbon monoxide synthase

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヘムオキシゲナーゼ(HO)は内因性一酸化炭素合成酵素として着目されている。HOは本来ミクロソーム酵素であるが、各種細胞内小器官において局在することを明らかにした。特に各種腫瘍細胞において、核内に局在するヘムオキシゲナーゼの存在が確認された。その核内に局在するヘムオキシゲナーゼは、C末端が排除されていること、複数のリジン残基がアセチル化されていること、複数の転写因子と相互作用してい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

一酸化炭素は生体毒として知られているが、生体内においても常時生じている。そのCO産出酵素の活性は厳密にコントロールされていると考えられているが、その詳細な制御機構は不明である。今回の研究結果において、CO産出酵素が各種癌細胞において核内に強発現していることを明らかにした。またその核内に局在するCO産出酵素は様々な翻訳後修飾を受けており、その翻訳後修飾の制御破綻が、がん増殖能と深く関係していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Heme oxygenase-1 (HO-1) is a heme-degrading enzyme anchored in the endoplasmic reticulum. HO-1 is highly expressed in various cancers and its nuclear localization is associated with the progression of some cancers. Nevertheless, the mechanism underlying HO-1 nuclear translocation and its pathological significance remain unclear. Here, we investigated the potential regulation of nuclear heme oxygenase-1 (HO-1) by post-translational modifications. 1) Heme and hypoxia treatment of A549, H1299, NIH313 and HCT116 resulted in HO-1 translocation to nuclei. 2) Nuclear HO-1 revealed two acetylation sites located at Lys243 and Lys256. 3) The acetylation is crucial for nuclear HO-1-enhanced tumor progression in vitro. 4) Nuclear HO-1 interacts with CREB-binding protein and nuclear factor erythroid2-related factor 2.

研究分野：生化学

キーワード：翻訳後修飾 一酸化炭素 核移行シグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、一酸化炭素(CO)には、抗炎症作用、抗酸化ストレス作用、抗増殖作用など細胞を保護する正の効果が次々と報告されている。CO は、ヘム分解の代謝産物として生体内で恒常的に産出されていることから、一酸化窒素同様、生理的に必須のガス状分子として認知されるようになった。一方で過剰の生成は生体毒となるため、CO の発生源である CO 産出酵素(HO)の発現および活性は厳密に制御されていると考えられるが、その詳細な制御メカニズムについては明らかではない。CO の生理作用に着目して、メディカルガス分子としての臨床活用や、CO 放出薬剤の開発が進んでいるが、CO が各組織において、どのようなシグナル伝達機構を介して抗炎症作用や細胞保護作用を発揮するかについては不明な点が多い。さらに、多様な病態と CO による細胞保護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ている。

2. 研究の目的

本研究では、HO を CO の発生源として捉え、活性のオン、オフのスイッチング機構を解明することを目的とし、以下の2点について検討を行った。

(1) HO の細胞内寿命と活性との相関を調べる： HO の発現異常が認められる疾患由来の細胞において、各種誘導剤、阻害剤存在下での HO の細胞内寿命を比較し、ヘム分解活性との相関を調べる。

(2) HO の活性制御因子を探索する： 誘導型 HO-1、非誘導型 HO-2 に特有の構造に着目し、質量分析法、部位特異的変異法を併用して分解シグナルの探索を行う。また関連タンパク質との相互作用を検討し、翻訳後修飾部位との関係について調べる。

3. 研究の方法

(1) 各種細胞(腫瘍細胞、神経細胞、血管内皮細胞、肝実質細胞)に HO の cDNA をトランスフェクトし、brefeldin A(細胞内輸送阻害剤)及び cycloheximide(タンパク質合成阻害剤)存在下で HO の半減期を western blot 法及び、Real-time PCR を利用して、mRNA の発現量も併せて検討した。

(2) 細胞内寿命を検討していく中で、特に各種腫瘍細胞においては、本来ミクロソーム酵素として知られる HO が、核内に多く局在していることが確認された。そこで、以降の研究は核内 HO に着目して研究を進めた。まず核内 HO の構造について検討を行った。3T3 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) 核移行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、3T3 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、部位特異的変異法を用いて HO 変異体を作成した。その変異体を 3T3 細胞にトランスフェクトし、細胞寿命、生物活性(CO 産出活性、転写活性)、腫瘍増殖作用について検討した。

(5) 核内 HO と相互作用するタンパク質の有無を調べるため、酵母 two-hybrid 法および核内 HO を強発現させた細胞抽出液からの免疫沈降法を用いて結合タンパク質のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) HO の細胞局在について検討した結果、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。3T3 細胞を hypoxia で刺激すると核に優先的に局在することがわかった。さらに、A549、DU145 腫瘍細胞においては、核内に HO が強く発現していることが確認された。

(2) 核内 HO に着目し、3T3 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 C 末端の配列が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。

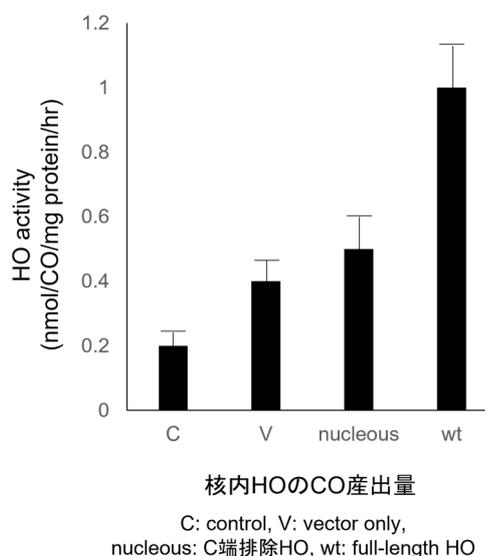
(3) 核内 H0 の酵素活性を検討した。3T3 細胞を Hypoxia で刺激した前後で比較した結果、Hypoxia で刺激後の CO 産生量は刺激前の 40% 程度まで減少することがわかった。さらに、野生型 wt の H0 と C 末端を排除した H0 をトランスフェクトしたものの細胞抽出物を使用して、CO 産生量を比較した結果、C 末端を排除した H0 をトランスフェクトしたものの CO 産生量は野生型の 33% 程度に減少していることが確認された (右図)。

(4) 核内 H0 のヘム分解活性が低下していることをうけ、H0 の転写活性について調べた。転写活性は、市販のキット (TransSignal Protein/DNA array I) を用いて検討した。その結果、AP-1, AP-2, CBF, STAT1, STAT3, STAT4 の転写活性を上昇させることがわかった。この結果から、核内 H0 は、ヘム分解活性に関与するのではなく、転写因子の活性化に寄与していることが確認された。

(5) 3T3 細胞を Hypoxia で刺激した後、免疫沈降法によって H0-1 を単離し、MS/MS 解析を行った結果、Lys243 と Lys256 がアセチル化されていることが明らかになった。そこで、これらの点変異体 (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。

(6) 核内 H0 と相互作用するタンパク質の有無を調べるため、酵母 two-hybrid 法を用いて結合タンパク質のスクリーニングを行った。その結果、核内 H0 と相互作用する可能性があるタンパク質を 56 種類同定した。その中には、H0 のアセチル化に関与していると考えられる、CREB-binding protein (CBP)、p300 が含まれていた。そこで、C 末端を排除した H0 と、CBP、p300 とを HEK293 細胞にトランスフェクトして、リジンのアセチル化の有無を検討した結果、CBP および p300 を強発現させた系では、H0 のリジンがアセチル化されることが確認された。また、先ほどの点変異体 (K243A/K256A) を強発現させた系では、リジンのアセチル化は認められなかった。このことから、核内 H0 のアセチル化は CEB/p300 系を介して行われていることが確認された。さらに、K243A/K256A 変異体は、野生型 H0-1 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。

H0 は従来ミクロソーム酵素としてヘムの代謝に関与することは知られていたが、今回の研究結果から、H0 の配列中には核移行シグナルが存在し、各種腫瘍細胞中ではむしろ核内 H0 の含有量が多いことが明らかになった。核内 H0 は各種転写因子と相互作用することによって、腫瘍細胞の増殖を制御している可能性があることが示唆された。またその転写活性やタンパク質間相互作用は、H0 配列内のリジンのアセチル化など翻訳後修飾によって制御されていることも明らかになった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Koga Y, Sotokawauchi A, Higashimoto Y, Nishino Y, Hashizume N, Kakuma T, Akiba J, Tanaka Y, Matsui T, Yagi M, Yamagishi SI.	4. 巻 9932311
2. 論文標題 DNA-Aptamer Raised against Receptor for Advanced Glycation End Products Improves Survival Rate in Septic Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oxid. Med. Cell. Longev.	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2021/9932311. eCollection 2021.	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 Takemoto M, Sakamoto H, Higashimoto Y, Taira J.	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 Sotokawauchi A, Matsui T, Higashimoto Y, Nishino Y, Koga Y, Yagi M, Yamagishi SI.	4. 巻 18
2. 論文標題 DNA aptamer raised against receptor for advanced glycation end products suppresses renal tubular damage and improves insulin resistance in diabetic mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diab. Vasc. Dis. Res.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1479164121990533.	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 Hiromura M, Mori Y, Terasaki M, Kushima H, Saito T, Osaka N, Yashima H, Ohara M, Fukui T, Matsui T, Yamagishi SI.	4. 巻 18
2. 論文標題 Glucose-dependent insulinotropic polypeptide inhibits cardiac hypertrophy and fibrosis in diabetic mice via suppression of TGF- 2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diab. Vasc. Dis. Res.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1479164121999034.	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 Tsuruhisa S, Matsui T, Koga Y, Sotokawauchi A, Yagi M, Yamagishi SI.	4. 巻 22
2. 論文標題 Pigment epithelium-derived factor inhibits advanced glycation end product-induced proliferation, VEGF and MMP-9 expression in breast cancer cells via interaction with laminin receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncol. Lett.	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12890.	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 Sotokawauchi, A., Nakamura, N., Matsui, T., Higashimoto, Y., Yamagishi, S.I.	4. 巻 21
2. 論文標題 Glyceraldehyde-derived pyridinium evokes tubular cell damage via RAGE interaction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 2604-2611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21072604	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 Higashimoto, Y., Yoneda, T., Motomiya, Y.	4. 巻 2
2. 論文標題 Heparin and amyloid -2 microglobulin.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Clin. Case Rep.	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31579/2690-4861/019	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 Honda, H., Tanaka, K., Michihata, T., Shibagaki, K., Yuza, T., Hirao, K., Tomosugi, N., Ganz, T., Higashimoto, Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Erythropoiesis stimulating agents are associated with serum fibroblast growth factor 23 metabolism in patients on hemodialysis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin.Kidney.J.	6. 最初と最後の頁 943-949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ckj/sfaa042. eCollection 2021 Mar	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 Higashimoto, Y., Tanaka, K., Matsui, T., Sakaguchi, T., Yamagishi, S.I., Motomiya, Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Fibroblast growth factor 23 contributes to regulation of hepcidin/ferroportin axis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Austin J. Pharmacol. Ther.	6. 最初と最後の頁 1-5
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 -

1. 著者名 Yabuuchi, J., Ueda, S., Yamagishi, S-I, Nohara, N., Nagasawa, H., Wakabayashi, K., Matsui, T., Higashimoto Y., Kadoguchi, T., Otsuka, T., Gohda, T., Suzuki, Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Association of advanced glycation end products with sarcopenia and frailty in chronic kidney disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 17647-17659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-74673-x	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 Sotokawauchi A, Matsui T, Higashimoto Y, Yamagishi SI.	4. 巻 16
2. 論文標題 Fructose causes endothelial cell damage via activation of advanced glycation end products-receptor system.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diab. Vasc. Dis. Res.	6. 最初と最後の頁 556-561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1479164119866390	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 Nakamura N, Matsui T, Nishino Y, Sotokawauchi A, Higashimoto Y, Yamagishi SI.	4. 巻 2019
2. 論文標題 Long-Term Local Injection of RAGE-Aptamer Suppresses the Growth of Malignant Melanoma in Nude Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Oncol.	6. 最初と最後の頁 387601-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/7387601	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中賢治、本宮善恢、江里口雅裕、東元祐一郎
2. 発表標題 FGF23はヘプシジン・フェロポーチン鉄代謝制御系に影響を与えるか
3. 学会等名 第65回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松井孝憲、東元祐一郎、外川内亜美、山岸昌一
2. 発表標題 終末糖化産物（AGE）及びその受容体（RAGE）をターゲットとしたDNAアプタマーは動物モデルの悪性黒色腫の増殖を抑制する
3. 学会等名 第5回日本核酸医薬学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古賀義法、外川内亜美、東元祐一郎、松井孝憲、八木実、山岸昌一
2. 発表標題 APTAMER RAISED AGAINST RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS (RAGE) IMPROVES SURVIVAL RATE IN SEPTIC MICE
3. 学会等名 32nd International Symposium on Pediatric Surgical Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井孝憲、東元祐一郎、外川内亜美、山岸昌一
2. 発表標題 マウス皮下に移植した悪性黒色腫の増殖は終末糖化産物(AGE)及びその受容体(RAGE)のDNAアプタマーにより抑制しうる
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 外川内亜美、松井孝憲、東元祐一郎、山岸昌一
2. 発表標題 フルクトース由来終末糖化産物のアプタマーはフルクトースが引き起こす内皮細胞障害を抑制しうる
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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	坂口 達也 (Sakaguchi Tatsuya) (00757031)	久留米大学・医学部・助教 (37104)	
研究分担者	松井 孝憲 (Matsui Takanori) (10425233)	久留米大学・医学部・講師 (37104)	

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
---------	---------