

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770130

研究課題名（和文）翻訳開始因子キナーゼのヘム結合・リン酸化・分解によるダイナミクス

研究課題名（英文）The role of heme-binding, phosphorylation, and degradation in heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α kinase (HRI)

研究代表者

五十嵐 城太郎 (IGARASHI JOTARO)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：80375162

研究成果の概要（和文）：翻訳開始因子キナーゼ HRI の分子レベルでの活性調節機構を明らかにするために、ヘム結合部位・自己リン酸化部位の同定、及びプロテアソームによる分解を解析した。1) マウスの他、ヒト、ラット、ゼブラフィッシュ HRI をクローニングした。ヘム結合部位は Cys-Pro 配列からなるヘム制御モチーフと関係する。2) マウス HRI を用いて LC-MS/MS 解析により、33 カ所のリン酸化部位を同定した。変異導入実験より、活性に重要なリン酸化部位は、Tyr193, Thr485, Thr490 である。3) 培養細胞中の HRI の動態を分析すると、HRI は速やかに分解されていた。試験管内実験において、HRI は 20S プロテアソームによって分解された。

研究成果の概要（英文）：Heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) kinase (HRI), functions in response to heme concentration. Under normal conditions, heme binds to HRI and blocks its function. However, during heme shortage, heme dissociates from the protein, and autophosphorylation subsequently occurs. The molecular mechanism of heme-binding, autophosphorylation, and degradation in HRI remained to be established. In the present study, 1) we demonstrate that His119/His120 and Cys411 are the axial ligands for heme in human HRI, as well as mouse HRI. 2) With the aid of mass spectroscopy we identified 33 phosphorylated sites in mouse HRI overexpressed in *Escherichia coli*. We further generated 30 enzymes with mutations at the phosphorylated residues and examined the catalytic activities. The activities of Y193F, T485A, and T490A mutants were significantly lower than that of wild-type protein. Accordingly, we suggest that Tyr193, Thr485, and Thr490 are essential residues in the catalysis. 3) Due to degradation of HRI in cultured cell, we show that HRI degradation is induced by 20S proteasome *in vitro*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物無機化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ヘム、自己リン酸化、プロテアソーム、結晶化

1. 研究開始当初の背景

赤血球成熟の過程において、ヘモグロビンの合成は熱ショック、ヘム不足などのストレ

スに応答して調節されている。特に、脱核後の網状赤血球では、核による転写調節が不可能となり、ヘモグロビン合成は翻訳レベルで

調節を受けることになる。

ヘム調節インヒビター (HRI) は、真核生物翻訳開始因子 2 α (eIF2 α) を基質とするセリン・スレオニンキナーゼであり、ミトコンドリアでのヘム生産量に応じてヘモグロビンの生産量を調節する鍵酵素である。すなわち、網状赤血球がヘム不足に陥ると、HRI は自己リン酸化によって活性化し、eIF2 α をリン酸化することで、ヘモグロビンの合成を停止させる。

HRI の役割については、標準的な生化学・分子生物学の教科書にも記述されている。しかし、30 年以上にわたる HRI の研究にも関わらず、HRI の活性調節機構について分子レベルでの理解は十分ではない。

私たちの研究グループでは、マウス HRI が Cys409 と His119/His120 によってヘムと結合することを明らかにした (*J. Biol. Chem.* 283: 18782 (2008))。また、ヘムを 1 等量結合し、N 末端ドメインとキナーゼドメインに由来するアミノ酸残基と結合することを示した (*Biochemistry* 45: 9894 (2006))。一方、ヘムに一酸化窒素 (NO) が結合すると、タンパク質とヘムとの配位結合が切れ、活性化することも解明した (*J. Biol. Chem.* 279: 15752 (2004))。

2. 研究の目的

分子レベルにおける HRI の活性調節機構を詳細に検討するために、以下の 4 つのサブテーマを設定した。

(1) HRI のヘム制御モチーフ (Cys-Pro) の役割

HRI のヘム結合部位として同定された Cys-Pro 配列は、哺乳動物 (マウス、ヒト、ラットなど) では保存されているが、ニワトリ、アフリカツメガエル及びゼブラフィッシュでは保存されていない。そこで、これらの HRI を単離精製し、ヘム結合能、酵素活性を哺乳動物 HRI と比較検討する。

(2) HRI のリン酸化・脱リン酸化

大腸菌を用いて発現、精製を行った HRI は既に自己リン酸化しており、リン酸化が HRI に与える影響を評価できない。そこで、活性・リン酸化型 HRI に対して脱リン酸化酵素を使って、不活性・非リン酸化型 HRI を調製する。非リン酸化型 HRI を用いて、ヘムによる阻害機構、自己リン酸化反応の解析を行う。また、自己リン酸化部位と考えられる Ser/Thr もしくは Tyr 残基の同定を目指す。

(3) HRI のタンパク質分解による不活性プロテアソーム阻害剤によって HRI の活性が上昇するとの報告がある (Yerlikaya *et al. Biochem. J.* 412: 579 (2008))。これは、ヘム不足によって活性化した HRI はユビキチン-プロテアソーム系を介して分解され、不活

性化される可能性を示すものである。そこで、培養細胞を用いて HRI のリン酸化状態、HRI のユビキチン化、プロテアソームを介した HRI の分解が行われるかを検討する。

(4) HRI の立体構造解析

4 種類の eIF2 α キナーゼの中、PKR, GCN2, PERK のキナーゼドメインは X 線結晶構造解析によって立体構造が明らかにされた

(Dey *et al. Cell* 122: 901 (2005); Padyana *et al. J. Biol. Chem.* 280: 29289 (2005); Cui *et al. Acta Crystallogr. D* in press (2011))。しかし、HRI の立体構造は未だに解析されていない。HRI の詳細な分子機構を明らかにする上で、HRI の構造情報は必要不可欠である。そこで、HRI の立体構造解析を目指したタンパク質の結晶化を行う。結晶化にはアポ型とヘム結合型と両方を用いて、ヘム結合による構造変化の解明を目指す。

3. 研究の方法

図 1 には現在提唱されている HRI の活性化・不活性化機構についてモデルを示している。

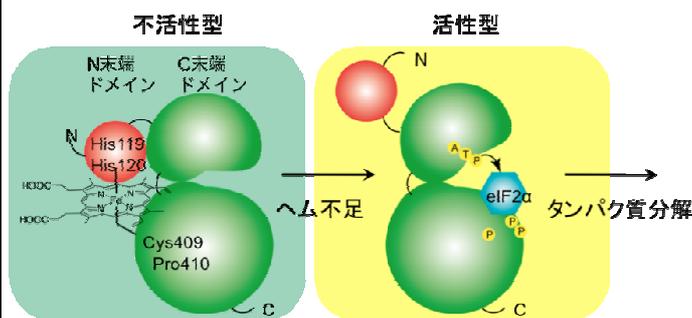


図 1: HRI のドメイン構造と活性化モデル
ヘムが結合した不活性型 (左) は、ヘムの解離に伴い、自己リン酸化によって活性化型 (右) へと変化する。その後、HRI はタンパク質分解によって不活性化すると考えられる。赤、緑がそれぞれ N 末端ドメイン、C 末端キナーゼドメイン

(1) マウス HRI の他、ヒト、ラット、ゼブラフィッシュ HRI の遺伝子を手し、大腸菌での発現ベクターを作製した。大腸菌を用いて各種 HRI の大量発現を行い、精製を行った。また、ヒト HRI については、ヘム結合に関与すると考えられる Cys 及び His 残基の変異体種類の変異体を作製し、そのヘム結合性を吸収スペクトルから測定した。

(2) 脱リン酸化 HRI の調整には λ フェージ由来プロテインフォスファターゼ (New England Biolabs) を使用した。HRI の自己リン酸化部位の同定は、HRI をトリプシンで消化し、リン酸化ペプチドを Ga-IMAC カラムを用いて濃縮し、LC-MS/MS 解析を行った。

(3) 培養細胞にはマウス由来 MEL、NIH3T3

細胞を用いた。20S プロテアソームは Enzo Life Sciences より購入した。

(4) ヘムの結合に伴う構造変化を明らかにするために、アポ型、ヘム結合型 HRI の両方に対して、市販のスクリーニングキットを用いて結晶化条件を約 700 種類検討した。

4. 研究成果

(1) ヘムの濃度を感知する上で重要な役割を果たす Cys-Pro 配列 (ヘム制御モチーフ) はマウス、ヒト、ラットにおいて保存されている。しかし、ゼブラフィッシュでは Pro-Cys 配列となっている。マウス以外に、ヒト及びゼブラフィッシュ HRI を大腸菌内で発現し、精製を行った。大腸菌で発現、精製を行った HRI は、培地 1 L 当たり約 1 mg の収量で得られた。また、精製 HRI は既に自己リン酸化した、活性型であった。ヘムを再構成した HRI の吸収スペクトルは、ヒトではマウスと比較して差はほとんど見られなかったが、ゼブラフィッシュではマウスと異なる結果を得た。ヒト HRI については Cys411 と His119 または His120 がヘムの軸配位子である可能性が部位特異的変異体の解析から示唆された。

(2) λ プロテインフォスファターゼを用いて、脱リン酸化した HRI を調製した。ATP を加えて再び自己リン酸化する反応、及びヘムによる eIF2 α キナーゼ活性の阻害を調べた。ヘムは eIF2 α リン酸化だけでなく、HRI の自己リン酸化にも阻害作用を及ぼすことが明らかになった (図 2)。

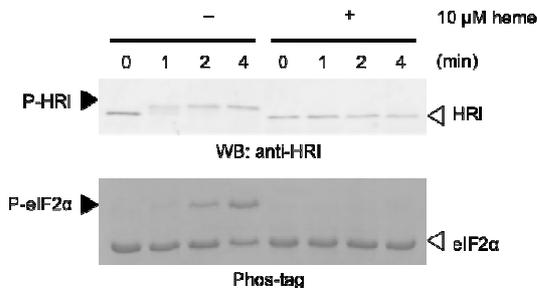


図 2: 脱リン酸化型 HRI の自己リン酸化と基質 eIF2 α リン酸化

ヘム非存在下では、HRI の自己リン酸化に続き eIF2 α のリン酸化が起こる (左)。一方、ヘム存在下では、自己リン酸化・eIF2 α リン酸化が阻害される (右)。上段は HRI の自己リン酸化を HRI 抗体で検出、下段は Phos-tag アクリルアミドゲルを用い、eIF2 α のリン酸化に伴うバンドシフトを検出した。

LC-MS/MS 解析の結果、33 カ所のリン酸化部位を同定した。Ser, Thr のみならず Tyr のリン酸化も確認された。また、これらのリン酸化部位の役割について、個々の Ser, Thr を Ala

へ、Tyr を Phe へと置換した変異体を作製し、活性測定を行ったところ、活性化ループ内の Thr485, Thr490、及び二量体界面に位置すると予想される Tyr193 のリン酸化が HRI の活性に必須であることがわかった (図 3)。

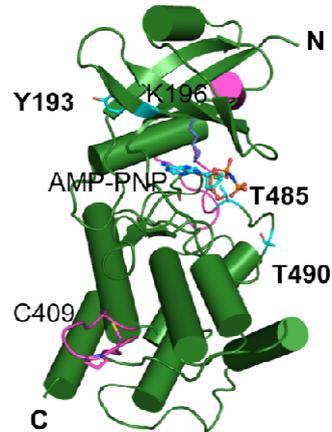


図 3: HRI キナーゼドメインのホモロジーモデル

活性調節に重要な自己リン酸化部位 (Tyr193, Thr485, Thr490) をシアン、ヘム結合に重要な Cys409 はマゼンタで示した。

(3) 培養細胞中の HRI の動態を調べるために、MEL 細胞を用いて、内在性 HRI の検出を試みたが、低レベルの発現しか検出できなかった。また、NIH3T3 細胞を用いて、HRI の発現を行ったが、HRI がタンパク質分解を受けている可能性が示唆された。次に、HRI の不活性化について、タンパク質分解の可能性を検討するために、組換え HRI を基質として用い、プロテアソームによる分解反応を測定した。その結果、HRI はユビキチン非依存的に 20S プロテアソームによって分解されることがわかった。

(4) HRI の立体構造を明らかにするために、ヒト、マウス、ラット及びゼブラフィッシュの HRI を用い、ヘムを含まないアポ型酵素について、700 種類の条件探索を行ったところ、ヒット条件が得られた (図 4)。



図 4: 全長型 HRI の結晶

回折データを収集したものの、低分解能のため構造解析は難しく、分解能向上のため結晶化条件の最適化を行っている。

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 Igarashi, J., Kobayashi, K., Matsuoka, A.: A hydrogen-bonding network formed by the B10-E7-E11 residues of a truncated hemoglobin from *Tetrahymena pyriformis* is critical for stability of bound oxygen and nitric oxide detoxification. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 16: 599-609 (2011). 査読:有
- ② Igarashi, J., Sasaki, T., Kobayashi, N., Yoshioka, S., Matsushita, M., Shimizu, T.: Autophosphorylation of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α kinase, HRI, and the role of the modification in catalysis. *FEBS J.*, 278: 918-928 (2011). 査読:有
- ③ Hayasaka, K., Kitanishi, K., Igarashi, J., Shimizu, T.: Heme binding characteristics of the isolated PAS-B domain of mouse Per2, a transcriptional regulatory factor associated with circadian rhythms. *Biochim. Biophys. Acta*, 1814: 326-333 (2011). 査読:有
- ④ Kobayashi, K., Tanaka, A., Takahashi, H., Igarashi, J., Ishitsuka, Y., Yokota, N., Shimizu, T.: Catalysis and oxygen binding of *Ec* DOS, a heme-based oxygen-sensor enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, 148: 693-703 (2010). 査読:有
- ⑤ Kitanishi, K., Kobayashi, K., Kawamura, Y., Ishigami, I., Ogura, T., Nakajima, K., Igarashi, J., Tanaka, A., Shimizu, T.: Important roles of Tyr43 at the putative heme distal side in oxygen recognition and stability of the Fe(II)-O₂ complex of YddV, a globin-coupled heme-based oxygen sensor diguanylate cyclase. *Biochemistry*, 49: 10381-10393 (2010). 査読:有
- ⑥ Kitanishi, K., Igarashi, J., Shimizu, T.: Thiolate with α -lipoic acid remedies depressive behavior of mice induced by methyl-mercury. *Curr. Top. Toxicol.*, 6: 23-29 (2010). 査読:無
- ⑦ Ji, H., Tan, S., Igarashi, J., Li, H., Derrick, M., Martásek, P., Roman, L., Vásquez-Vivar, J., Poulos, T. L., Silverman, R. B.: Selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors and the prevention of cerebral palsy. *Ann. Neurol.*, 65: 209-217 (2009). 査読:有
- ⑧ Ito, S., Igarashi, J., Shimizu, T.: The FG loop of a heme-based gas sensor enzyme, *Ec* DOS, functions in heme binding, autoxidation and catalysis. *J. Inorg. Biochem.*, 103: 1380-1385 (2009). 査読:

有

- ⑨ Ito, S., Araki, Y., Tanaka, A., Igarashi, J., Wada, T., Shimizu, T.: Role of Phe113 at the distal side of the heme domain of an oxygen-sensor (*Ec* DOS) in the characterization of the heme environment. *J. Inorg. Biochem.*, 103: 989-996 (2009). 査読:有
- ⑩ Igarashi, J., Li, H., Jamal, J., Ji, H., Fang, J., Lawton, G., Silverman, R. B., Poulos, T. L.: Crystal structures of constitutive nitric oxide synthases in complex with de novo designed inhibitors. *J. Med. Chem.*, 52: 2060-2066 (2009). 査読:有

[学会発表] (計 18 件)

- ① Igarashi, J., Sasaki, T., Iwashita, J., Shimizu, T.: Molecular mechanism of NO-induced catalytic activation of mouse heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α kinase, HRI. **Pacificchem 2010 Congress.** Honolulu, HI, USA. (2010/12/16).
- ② 五十嵐城太郎, 佐々木健彦, 清水透. ヘム調節インヒビター (HRI) のヘム・リン酸化による活性調節機構. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 82 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010). 神戸. (2010/12/10).
- ③ Igarashi, J., Sasaki, T., Iwashita, J., Shimizu, T.: NO-induced activation of a heme-sensor, eIF2 α kinase, in association with binding to cysteine and heme. **6th International Conference, Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide.** Kyoto, Japan. (2010/6/15).
- ④ 五十嵐城太郎, 佐々木健彦, 清水透. ヘム調節インヒビター (HRI) のヘム・リン酸化による反応制御機構. 日本生化学会東北支部第 76 回例会・シンポジウム. 福島. (2010/5/8).
- ⑤ Igarashi, J., Shimizu, T.: Heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α kinase associated with protein translation. **Gordon Research Conference on Protein Cofactors, Radicals and Quinones.** Ventura, CA, USA. (2010/1/24-29).
- ⑥ 五十嵐城太郎, 佐々木健彦, 岩下隼, 清水透. ヘム調節インヒビター (HRI) の活性調節機構:ヘム結合及びリン酸化について. 第 82 回日本生化学会大会. 神戸. (2009/10/22).
- ⑦ Igarashi, J., Matsuoka, A.: Oxygen stability and crystal structure of *Tetrahymena* truncated hemoglobin. **14th International Conference on Biological Inorganic**

Chemistry (ICBIC14). Nagoya, Japan. (2009/7/29).

- ⑧ Igarashi, J., Murase, M., Shimizu, T.: The heme-binding site of the heme-regulated inhibitor (HRI), and the role of heme regulatory motif in heme sensing. **16th International Conference on Cytochrome P450, Biochemistry, Biophysics, Functional Genomics.** Nago, Japan. (2009/6/23).
- ⑨ 五十嵐城太郎, 岩下隼, 佐々木健彦, 清水透. ヘム調節インヒビター (HRI) の一酸化窒素による活性調節機構: S-ニトロシル化の検討. **第9回日本NO学会学術集会.** 静岡. (2009/5/8).

[図書] (計3件)

- ① Igarashi, J., Kitanishi, K., Shimizu, T.: Emerging Role of Heme as a Signal and the Gas-Sensing Site: Heme-Sensing and Gas-Sensing Proteins. **Handbook of Porphyrin Science** (Kadish, K. M., Smith, K. M., Guilard, R. Eds.) pp. 399-460, World Scientific (Hackensack, NJ, USA) 2011.
- ② 五十嵐城太郎, 清水透. シトクロムP450. **酵素利用技術体系** (小宮山眞 編) pp. 597-601, エヌ・ティー・エス (東京) 2010.
- ③ 五十嵐城太郎, 清水透. 他のヘムーチオレート蛋白質の構造と機能. **P450の分子生物学** 第2版 (大村恒雄, 石村巽, 藤井義明 編) pp. 77-83, 講談社 (東京) 2009.

[その他]

ホームページ等

<http://www.tagen.tohoku.ac.jp/labo/shimizu/>

http://db.tohoku.ac.jp/whois/Tunv_Title_All.php?user_num=z8/Pz8/Pz8/Mz8zH&sel1=1&sel2=1&sel3=1&sel4=0&page=1&lang=J

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 城太郎 (IGARASHI JOTARO)
東北大学・多元物質科学研究所・助教
研究者番号: 80375162