

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770152

研究課題名（和文）小胞体関連分解 (ERAD) によるヘムオキシゲナーゼの機能制御機構の解明

研究課題名（英文） The role of the ubiquitin-proteasome pathway in heme oxygenase system

研究代表者

東元 祐一郎 (HIGASHIMOTO YUICHIRO)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：40352124

研究成果の概要（和文）：ヘムオキシゲナーゼ (HO) は、細胞内のヘムを分解し、生体内信号としての役割が注目されている一酸化炭素を生体内で生成する唯一の酵素である。本研究では、HO 活性のタンパク質レベルでの制御機構を解明することを目的とし、特に小胞体関連分解系に着目して検討を行った。その結果、HO-1 と HO-2 がともに高度にユビキチン化されることを明らかにした。また、HO に特異的に結合するユビキチンリガーゼを質量分析法によって同定した。

研究成果の概要（英文）：The present study investigated the cellular mechanism underlying the degradation of heme oxygenase (HO), an endoplasmic reticulum-anchored protein. High molecular weight ubiquitin conjugates were co-immunoprecipitated with HO from HEK293 cells after proteasome inhibition, and HO ubiquitination was confirmed in HEK293 cells overexpressing His-tagged HO and HA-tagged ubiquitin. HO specific ubiquitin-ligase was also identified using mass spectrometry.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
平成 22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 23 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ヘムオキシゲナーゼ、小胞体関連分解 (ERAD)

1. 研究開始当初の背景

HO は、生体内で不要になったヘムを分解し、鉄イオン、ビリルビン、CO を生成するミクロソーム酵素である。近年、HO によるヘム分解を単なる代謝の終末ではなく、新たな生理活性物質生成の出発点として再定義し直す生理学的研究が盛んに行われている。HO には 2 つのアイソザイム (HO-1, HO-2) が存在するが、様々な酸化ストレスによって誘導される HO-1 は、高い抗酸化作用を示すビリルビ

ンを産生する生体防御機構の重要な因子として広く認識されるようになった。また、HO-1 の発現を特異的に制御する抑制性転写因子 Bach-1 が発見されるなど、HO-1 の機能制御は mRNA レベルで厳密に制御されていることが報告されている。一方、脳や神経系で多く発現している非誘導型の HO-2 は、シグナル伝達分子 CO の発生源として注目されているが、HO-2 についての酵素学的知見はほとんど無く、部分的な立体構造しか知られてい

ないため、その詳細については不明の点が多い。最近、海馬神経細胞において、HO-2 がリン酸化されることによって活性化され、CO を介した神経防御機能を発揮するという報告がなされた (Boehning *et al.*, *Neuron*, **40**, 129 (2003))。しかしながら、何故 HO タンパク質のリン酸化によって CO 生成能が上がり、神経細胞保護効果を示すようになるのかについては不明のままである。

2. 研究の目的

小胞体関連分解 (ER associated protein degradation; ERAD) は、小胞体品質管理機構の一つであり、小胞体の内腔に生じたミスフォールディングタンパク質を小胞体からサイトゾルに逆輸送し、サイトゾルにおいてユビキチンを付加したのち、プロテアソームによって分解するシステムである。近年、ERAD 系の役割は、異常タンパク質の品質管理だけではなく、小胞体膜上に存在する代謝酵素群の down regulation にも関与していることが明らかになった。これは、HO が主として小胞体に局在している酵素であることから、非誘導型の HO-2 の活性も ERAD 系によって制御されている可能性があることを強く示唆する。そこで本研究では、HO 活性のオン、オフのメカニズムを生化学的アプローチによって解明することを目的とする。特に、HO タンパク質の細胞内寿命と、それを制御するユビキチン分解との関係を明らかにし、HO の細胞内寿命を決定する因子の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) HO の細胞内寿命 (life-time) の検証 : 各種細胞 (神経細胞、血管内皮細胞、肝クッパー細胞、肝実質細胞) に HO-1 と HO-2 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 法によって調べる。さらに、leupeptin (リソソーム阻害剤) や MG132 (プロテアソーム阻害剤) 存在下で同様の実験を行い、分解に及ぼす影響を検討する。

(2) HO-2 の N 末端と分解シグナルとの関係 : HO 配列をコンピュータプログラムで解析した結果、HO-2 の N 末端部分には短寿命タンパク質に特有の PEST 配列が含まれていることが明らかになった。そこで、N 末端配列欠損体を作成し、細胞内での半減期の変化を SDS-PAGE、western blot 法により検討する。

(3) *in vitro* & *in vivo* ubiquitination assay : ウサギ網状赤血球の細胞抽出液には、ユビキチン化に必要な因子群を豊富に含んでいることを利用し、試験管内で HO をユビキチン化反応させた後、SDS-PAGE、抗ユビキチン抗体で検出することによって HO のユビキチン化の有無を確認する。さらにユビキ

チン化した HO を質量分析法によるペプチドマッピングすることによって、正確なユビキチン化部位の同定を行う。

(4) HO-2 の HRM と分解シグナルとの関係 : HRM は、ヘム制御モチーフとして知られているが、その役割については不明である。近年、IRP2 内の HRM がヘムと酸素によって酸化されてユビキチンリガーゼによって認識される領域として働き、IRP2 を分解へ至らしめるということが報告され、HRM の新たな生理機能として注目されている。そこで、HO-2 の HRM 中の Cys を Ala に置換した変異体を作成し、細胞内での安定性について調べる。さらに、HRM ドメインを bait とした yeast two-hybrid 法を用いて HO-2 を選択的に識別するユビキチンリガーゼの同定を試みる。

4. 研究成果

(1) HO の分解が ERAD 系を介するのかどうかを検証するため、まず、哺乳細胞系での HO の強発現系の構築を試みた。まず HO-1 および HO-2 の cDNA を pcDNA3.1/His-TOPO vector に組み込み、HEK293 ヘトランスフェクトした。その細胞抽出液を SDS-PAGE 後、抗 HO-1 および抗 HO-2 抗体でウエスタンブロットしたところ、目的タンパク質が強発現されていることが確認された。

(2) Cycloheximide (タンパク質合成阻害剤) 存在下で、HO-1 の細胞内寿命を評価した結果、そのターンオーバーの半減期は約 8 時間ということが明らかになった。HO-2 の半減期はさらに短いことも確認された。

(3) HO-1 と HO-2 がユビキチン化反応をうけるのどうかを検討するため、HO-1 と HO-2 の膜結合部分を排除した HO-1(1-263) および HO-2(1-292) を大腸菌により大量発現し精製した。ウサギ網状赤血球の細胞抽出液を用いて *in vitro* ubiquitination assay を行ったところ、HO-1、HO-2 ともに、ユビキチン化されることが明らかになった。HeLa S100 溶解液を使用した系でも同様の結果が確認された。また、興味深いことに、HO に特異的に結合し、HO 活性を競合的に阻害するタンパク質 caveolin-1 (*Biochemistry*, **50**, 6824-6831 (2011)) も同様に高度にユビキチン化されることがわかった。ユビキチン化した HO を質量分析法によるペプチドマッピングすることによって、正確なユビキチン化部位の同定を試みたが、現在までのところ正確な修飾部位の同定には至っていない。

(4) HO-2 に特有の構造である、N 末端側の延長配列に着目し、分解シグナルの探索を行った。Human HO-2 の 1-20 アミノ酸残基の N 末端に Cys 残基を導入したペプチド Cys-hHO-2(1-20) を Fmoc 法により合成した。合成ペプチドを SulfoLink resin に固定化し、プラセンタ抽出液と混合させ、尿素処理によ

って結合タンパク質を溶出した。SDS-PAGE によって確認した結果、いくつかのタンパク質の特異的な結合が見られた。同様に、HO-2 の cDNA を pcDNA/His-TOPO vector に組み込み、HEK293 細胞にトランスフェクトして作成した細胞抽出液を用いて同様の実験を行った。質量分析法によるペプチドマッピングを行った結果、HO-2 に特異的に結合するタンパク質を 6 種類同定することに成功した。

(5) ERAD 系の分解には、標的タンパク質を小胞体からサイトゾル内へ移行させるための因子、p97/Ufd1/Npl4 複合体の関与が必須とされている。そこで、HO-2 の分解が ERAD 系を介するのかどうかを検証するため、HEK293 細胞に、タグを付加した HO とユビキチンをトランスフェクトし、強発現させた。その細胞抽出液を抗 HO 抗体で免疫沈降させたところ、p97 と Ufd1 が HO と共に共沈してくることを確認した。

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 9 件)

- ① Taira, J., Sugishima, M., Kida, Y., Oda, E., Noguchi, M., and Higashimoto, Y., Identification of essential amino acid residues involved in the interaction of heme oxygenase-1 with caveolin-1., *Peptide Science*, 査読有, **48**, 35-38 (2012)
- ② Tsurusawa, R., Koga, S., Higashimoto, Y., 以下 2 名, Role of proline in heme regulatory motifs in heme oxygenase-2., *Peptide Science*, 査読有, **48**, 159-160 (2012)
- ③ Taira, J., Sugishima, M., Kida, Y., Oda, E., Noguchi, M., and Higashimoto, Y., Caveolin-1 is a competitive inhibitor of heme oxygenase-1 (HO-1) with heme: Identification of a minimum sequence in caveolin-1 for binding to HO-1., *Biochemistry*, **50**, 査読有, 6824-6831 (2011)
- ④ Sato, H., Higashimoto, Y., 以下 6 名, Reduction of oxaporphyrin ring of CO-bound α -verdoheme complexed with heme oxygenase-1 by NADPH-cytochrome P450 reductase., *J. Inorg. Chem.*, 査読有, **105**, 289-296 (2011)
- ⑤ Taira, J., Kida, Y., Yamaguchi, H., Kuwano, K., Higashimoto, Y. and Kodama, H., Modifications on amphiphilicity and cationicity of unnatural amino acid containing peptides for the improvement of antimicrobial activity against pathogenic bacteria., *J. Pept. Sci.*, 査読有, **16**, 607-612 (2010)
- ⑥ Kitano, S., Higashimoto, Y., 以下 7 名,

An improved anion-exchange high-performance liquid chromatography method for measuring oxidized form of LDLs in human plasma., *Ann. Clin. Biochem.*, 査読有, **47**, 460-466 (2010)

- ⑦ Ueda, T., Koga, S., Higashimoto, Y., 以下 2 名, Heme binding analysis of heme regulatory motifs of rat heme oxygenase-2., *Peptide Science*, 査読有, **47**, 237-238 (2010)
- ⑧ Sato, H., Sugishima, M., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., 以下 4 名, Crystal structure of rat haem oxygenase-1 in complex with ferrous verdohaem: presence of a hydrogen-bond network on the distal side., *Biochem. J.*, 査読有, **419**, 339-345 (2009)
- ⑨ Nakashima, S., Higashimoto, Y., 以下 2 名, Functional analysis of heme regulatory motifs of rat heme oxygenase-2., *Peptide Science*, 査読有, **45**, 217-220 (2009)

[学会発表] (計 40 件)

- ① 原田二郎、原田英理砂、東元祐一郎、以下 6 名「ヘム結合時にヘムオキシゲナーゼ表面で揺らぐアミノ酸はどのような機能をもつのか？」第 92 回日本化学会春季年会、2012 年 3 月 26 日、横浜
- ② 奥田真孝、山本真平、杉島正一、東元祐一郎、以下 3 名「ヘムオキシゲナーゼ-1 とヘムの結合の熱力学的解析~静電相互作用と配位結合」2011 日本生物物理学会九州支部例会、2011 年 12 月 4 日、福岡
- ③ 平順一、杉島正一、木田豊、小田えり子、野口正人、東元祐一郎「カベオリン-1 によるヘムオキシゲナーゼ-1 の阻害において重要なアミノ酸残基の特定」第 48 回ペプチド討論会、2011 年 9 月 27 日、札幌
- ④ 原田二郎、原田英理砂、東元祐一郎、以下 6 名「ヘムオキシゲナーゼのタンパク質分子表面で揺らぐアミノ酸残基 R85 の変異体から考察される電子伝達系」第 26 回生体機能関連化学シンポジウム、2011 年 7 月 14 日、筑波
- ⑤ 福嶋祐也、東元祐一郎、以下 4 名「ヘムオキシゲナーゼ-2 とシトクロム P450 還元酵素の相互作用の検討」第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、京都
- ⑥ 平順一、杉島正一、木田豊、小田えり子、野口正人、東元祐一郎「カベオリン-1 によるヘムオキシゲナーゼ-1 の阻害機構」第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、京都
- ⑦ 原田二郎、原田英理砂、東元祐一郎、以下 6 名「ヘムオキシゲナーゼの変異体の解析から考察される電子伝達経路」第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、京都
- ⑧ 清水翔、井上浩義、東元祐一郎「アルリアルキルアミン-N-アセチル転移酵素の SNP

による活性への影響」第 48 回化学関連支部合同九州大会、2011 年 7 月 9 日、北九州

⑨ 義原俊、古賀真也、東元祐一郎、以下 3 名「ヘム分解活性をもたないバイオヘムセンサーの設計と開発」平成 23 年度日本生化学会九州支部例会、2011 年 5 月 21 日、久留米

⑩ 奥田真孝、山下耕平、東元祐一郎、以下 3 名「ヘムオキシゲナーゼ-1 のヘム結合における静電的相互作用の熱量解析による評価」平成 23 年度日本生化学会九州支部例会、2011 年 5 月 21 日、久留米

⑪ 原田二郎、原田英里砂、東元祐一郎、以下 6 名「ヘムオキシゲナーゼの分子表面で揺らぐアミノ酸残基の変異体解析」平成 23 年度日本生化学会九州支部例会、2011 年 5 月 21 日、久留米

⑫ 下川千寿、東元祐一郎、以下 3 名「ヒト由来アポ型アミド化酵素の金属再構成体を用いた反応解析」平成 23 年度日本生化学会九州支部例会、2011 年 5 月 21 日、久留米

⑬ 古賀真也、東元祐一郎、以下 2 名「Sensitive heme sensor using fluorescent-labeled heme oxygenase-1」第 83 回日本生化学会大会、2010 年 12 月 14 日、神戸

⑭ 平順一、杉島正一、小田えり子、野口正人、東元祐一郎「カベオリンによるヘムオキシゲナーゼ-1 の活性阻害および阻害機構の解明」平成 22 年度日本生化学会九州支部例会、2010 年 5 月 22 日、鹿児島

⑮ 山崎一樹、古賀真也、東元祐一郎、以下 4 名「蛍光ラベル化 H0-1 を用いたヘムセンサーにおける蛍光色素導入箇所の検討」平成 22 年度日本生化学会九州支部例会、2010 年 5 月 22 日、鹿児島

⑯ 福嶋祐也、吉永篤史、東元祐一郎、以下 4 名「ヘムオキシゲナーゼ-2 とシトクロム P450 還元酵素の結合様式の検討」平成 22 年度日本生化学会九州支部例会、2010 年 5 月 22 日、鹿児島

⑰ 佐藤秀明、杉島正一、坂本寛、東元祐一郎、以下 2 名「ベルドヘム-ヘムオキシゲナーゼ-1 複合体の構造解析」第 90 回日本化学会春季年会、2010 年 3 月 26 日、大阪

⑱ 上田友美、古賀真也、東元祐一郎、以下 2 名「ヘムオキシゲナーゼ-2 に含まれるヘム調節モチーフのヘム結合様式」第 46 回ペプチド討論会、2009 年 11 月 4 日、北九州

⑲ 古賀真也、東元祐一郎、以下 3 名「微量ヘム定量法に向けたバイオセンサーの開発」第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、神戸

⑳ 岩崎浩之、杉島正一、東元祐一郎、以下 3 名「ラットヘムオキシゲナーゼ-1 と基質ヘムとの結合における誘導適合モデルのカロリメトリー解析」第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、神戸

㉑ 吉永篤史、東元祐一郎、以下 4 名「ヘム

オキシゲナーゼ-2 とシトクロム P450 還元酵素との相互作用におけるヘムと NADP(H) の影響」第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、神戸

㉒ 佐藤秀明、杉島正一、坂本寛、東元祐一郎、野口正人「 α -ベルドヘム-ヘムオキシゲナーゼ-1 複合体の電気化学と結晶構造」第 24 回生体機能関連化学シンポジウム、2009 年 9 月 13 日、福岡

㉓ 古賀真也、岩崎浩之、小松英幸、杉島正一、東元祐一郎、野口正人、坂本寛「ヘム分解酵素ヘムオキシゲナーゼのヘム結合解析とヘムセンサーとしての応用」第 58 回高分子討論会、2009 年 9 月 16 日、熊本

㉔ 吉永篤史、松岡礼、東元祐一郎、以下 4 名「表面プラズモン共鳴法によるヘムオキシゲナーゼ-2 とシトクロム P450 還元酵素の相互作用解析」平成 21 年度日本生化学会九州支部例会、2009 年 5 月 16 日、福岡

㉕ 古賀真也、東元祐一郎、以下 3 名「新規ヘム定量法に向けたバイオヘムセンサーの開発」平成 21 年度日本生化学会九州支部例会、2009 年 5 月 16 日、福岡

㉖ 佐藤秀明、杉島正一、坂本寛、東元祐一郎、野口正人「 α -ベルドヘム-ヘムオキシゲナーゼ-1 複合体の結晶構造」平成 21 年度日本生化学会九州支部例会、2009 年 5 月 16 日、福岡

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：AGEs 特異的 DNA アプタマーの腎疾患治療用途

発明者：深水圭、東元祐一郎、山岸昌一、奥田誠也、井上浩義

権利者：久留米大学

種類：特許

番号：特願 2010-262341

出願年月日：2010 年 11 月 25 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

名称：PAR-2 活性化阻害剤

発明者：木田豊、東元祐一郎、井上浩義

権利者：株式会社アップウェル

種類：特許

番号：特開 2011-229452

取得年月日：2010 年 4 月 27 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東元祐一郎 (HIGASHIMOTO YUICHIRO)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：40352124