

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570172

研究課題名(和文)新規ヘム標的タンパク質HSP27の細胞防御制御機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of erythroid differentiation by HSP27

研究代表者

加部 泰明(Kabe, Yasuaki)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20397037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ヘムは赤血球分化の過程で細胞内に数mMも蓄積されるが、このヘム毒性の回避機構は不明であった。我々は独自のアフィニティ精製技術を応用して、新規ヘム結合タンパク質としてHSP27を同定した。ヘムはHSP27と結合してその多量体構造を直接解離させて活性化してアポトーシス誘導を阻害することを見出した。さらに、HSP27の発現を薬剤誘導性に抑制出来るHSP27ノックダウンマウスの解析により、赤血球形成が始まるE13頃のマウス発生の時期に、HSP27ノックダウン特異的に胎生致死となる事が明らかとなった。また、成熟マウスにおいても赤血球分化能が著しく減少し、異常な形態の幹細胞の蓄積が多く認められた。

研究成果の概要(英文)：During erythropoiesis, haem synthesis is significantly induced, and abundant haem is utilized as hemoglobin in erythroid cells. However, excessive haem results in cell damages by membrane oxidation. In the present study, we found that haem directly bound to heat shock protein 27 (HSP27) by affinity purification. HSP27 is a small heat shock family protein, which plays an important role for cytoprotection, stress tolerance, cellular differentiation or tissue development. It has been known that the multimerized HSP27 dissociates by several stimuli. Interestingly, exposure of haem directly dissociated the multimerized HSP27 in vivo and in vitro. Knockdown of HSP27 expression resulted in the haem-induced apoptosis and reduced the haemin-induced erythroid differentiation. Furthermore, we also found that HSP27 is essential for erythroid differentiation by using HSP27 knockdown mice.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・機能生物学

キーワード：ヘム 赤血球分化

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでにナノスケールの担体を用いた独自のアフィニティ精製技術の開発を行い、薬剤やホルモンなどの低分子化合物に選択的に結合するタンパク質の精製システムを確立してきた ([Chemical Biology/Chemical Genetics] CMC press, 2009)。この精製技術を応用して、ヘムに選択的に結合するタンパク質群の網羅的な探索を行っており、いくつかの新規ヘムタンパク質が同定し、ヘムを介した未知の生理作用の解明に成功してきた (J.Biol.Chem., 281:31729 (2006), PLoS ONE. 3:e3070 (2008))。これらの解析の一環として、ヘムの赤血球分化に関わる作用に着目して血球系細胞から精製を行い、新規ヘム結合タンパク質として HSP27 を同定した。

2. 研究の目的

ヘムは酸素運搬、ミトコンドリア呼吸など生体に必須の補欠分子として働くが、過剰なヘムが存在すると細胞毒性を示す事が知られている。しかし、ヘムは赤血球分化の過程で細胞内に数 mM も蓄積されるが、この際のヘム毒性の回避機構については不明であった。本研究では、赤血球系細胞からアフィニティスクリーニングで得られた新規ヘムタンパク質 HSP27 の赤血球形成に対する役割について生化学的・生理的解析を行って実証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヘムと HSP27 の結合様式を指標とした制御機構の解析  
HSP27 にはこれまで知られているヘム結合モチーフが存在しないため、ヘムと HSP27 の結合について、吸収スペクトル・共鳴ラマン分析などの分光学的解析を行いその結合様式について検証する。これらの解析で得られた結合情報を基盤として、HSP27 の構造変換と、この機能制御の分子メカニズムを解明する。  
(2) 細胞・個体レベルでの HSP27 の赤血球分化における生理機能の解明  
現在、HSP27 の発現を一過的に抑制出来るテトラサイクリン誘導性のノックダウンマウスの作製が完了している。まず、赤血球分化における HSP27 の細胞レベルでの機能を明確にするために、HSP27 ノックダウンマウスから赤芽前駆細胞を調整して赤血球分化過程における HSP27 の機能評価を行う。さらにこのシステムにおいて、各種 HSP27 変異体の遺伝子導入を行いヘムによる HSP27 の機能制御についての検証を行う。また、HSP27 ノックダウンマウスの各種臓器における赤血球分化状態の解析を行い、個体レベルでの HSP27 の機能を実証する。

4. 研究成果

ヘムと HSP27 の結合状態の分光解析を行い、ヘムが HSP27 の His 残基を介した 5 配位構造

を取って結合する事が示唆された。また、変異体を用いた解析から HSP27 の N 末端領域を介して結合することが明らかとなった。HSP27 は不活性状態では非常に大きな多量体構造を示すことが知られており、この N 末端は HSP27 の重合化に関わることから、ヘムが結合して構造変換を引き起こす事が推察された。そこでヘム存在下での HSP27 の重合状態を検証した結果、精製タンパク質を用いた in vitro の解析および細胞レベルの解析において、ヘム添加により重合した HSP27 が解離して活性化されることが分かった。さらにヘムにより活性化した HSP27 は、apoptosis の trigger となる cytochrome c と結合して、この apoptosis 誘導作用を阻害することを新たに見出した。また、赤血球系細胞を用いた実験においても、赤血球分化誘導に応じて HSP27 の発現が亢進し、HSP27 のノックダウンにより顕著な apoptosis 誘導が起こり、赤血球分化が阻害される事が分かった。これらの結果から、ヘム濃度が上昇する赤血球分化の後期の過程で HSP27 を活性化して細胞死から免れている事が強く示唆された。

さらに HSP27 の血球形成に対する個体レベルでの作用を検証するために、HSP27 の発現を一過的に抑制出来るテトラサイクリン誘導性のノックダウンマウスを作製して解析を行った。この結果、赤血球形成が始まる E13 頃のマウス発生の時期に、HSP27 ノックダウン特異的に全ての個体で胎生致死となる事が明らかとなった。また、成熟マウスにおいても造血幹細胞からの赤血球分化能が著しく減少し、異常な形態の幹細胞の蓄積が多く認められた。これらの結果から、ヘムの標的となるタンパク質の網羅的探索を起点として、ヘムが HSP27 の構造をダイレクトに変換して抗アポトーシス活性を誘導するという、HSP27 の新たな制御機構を明らかとした。また、このような制御が、ヘムを介した赤血球分化の維持に重要な働きをするという、長年未知であったヘムによる細胞毒性の回避機構に関する新たな知見を示すことが出来た (図)。現在、これらの知見をまとめ論文投稿中である。

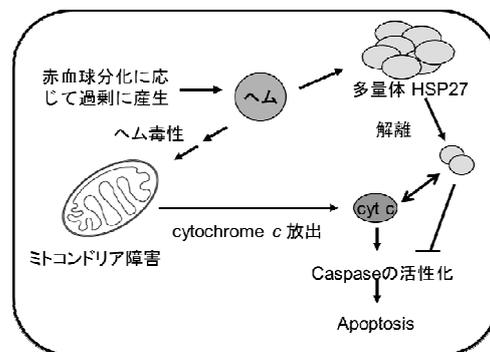


図 赤血球分化におけるHSP27を介したヘム毒性回避機構のモデル

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 8 件)

- ① Toue S, Sugiura Y, Kubo A, Ohmura M, Karakawa S, Mizukoshi T, Yoneda J, Miyano H, Noguchi Y, Kobayashi T, Kabe Y, Suematsu M. Microscopic imaging mass spectrometry assisted by on-tissue chemical derivatization for visualizing multiple amino acids in human colon cancer xenografts. **Proteomics**. **14**(7-8):810-9, 2013. (査読有り)
- ② Hotta K, Nashimoto A, Yasumura E, Suzuki M, Azuma M, Iizumi Y, Shima D, Nabeshima R, Hiramoto M, Okada A, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Ito T, Ando H, Sakamoto S, Kabe Y, Aizawa S, Imai T, Yamaguchi Y, Watanabe H, Handa H. Vesnarinone suppresses TNF $\alpha$  mRNA expression by inhibiting valosin-containing protein. **Mol Pharmacol**. **83**(5):930-8, 2013. (査読有り)
- ③ Karasawa S, Azuma M, Kasama T, Sakamoto S, Kabe Y, Imai T, Yamaguchi Y, Miyazawa K, Handa H. Vitamin K2 covalently binds to Bak and induces Bak-mediated apoptosis. **Mol Pharmacol**. **83**(3):613-20, 2013. (査読有り)
- ④ Noma N, Simizu S, Kambayashi Y, Kabe Y, Suematsu M, Umezawa K. Involvement of NF- $\kappa$ B-mediated expression of galectin-3-binding protein in TNF- $\alpha$ -induced breast cancer cell adhesion. **Oncol Rep**. **27**(6):2080-4, 2012. (査読有り)
- ⑤ Morikawa T, Kajimura M, Nakamura T, Hishiki T, Nakanishi T, Yukutake Y, Nagahata Y, Ishikawa M, Hattori K, Takenouchi T, Takahashi T, Ishii I, Matsubara K, Kabe Y, Uchiyama S, Nagata E, Gadalla MM, Snyder SH, Suematsu M. Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**. **109**(4):1293-8, 2012. (査読有り)
- ⑥ Nishiyama Y, Goda N, Kanai M, Niwa D, Osanai K, Yamamoto Y, Senoo-Matsuda N, Johnson RS, Miura S, Kabe Y, Suematsu M. HIF-1 $\alpha$  induction suppresses excessive lipid accumulation in alcoholic fatty liver in mice. **J Hepatol**. **56**(2):441-7, 2012. (査読有り)
- ⑦ Masaike Y, Takagi T, Hirota M, Yamada J, Ishihara S, Yung TM, Inoue T, Sawa C, Sagara H, Sakamoto S, Kabe Y, Takahashi Y, Yamaguchi Y, Handa H. Identification of dynamin-2-mediated endocytosis as a new target of osteoporosis drugs, bisphosphonates. **Mol Pharmacol**. **77**(2):262-9, 2011. (査読有り)
- ⑧ Suematsu M, Kajimura M, Kabe Y. Gas Biology Research in Clinical Practice: Roles of Stress-Inducible Carbon Monoxide in the

Regulation of Liver Function. KARGAR press, pp1-5, 2011.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 加部泰明、「新規 CO ガス受容体を介した肝障害制御機構の解明」(招待講演)、第 12 回分子予防環境医学研究会、2013 年 2 月 1 日、つくばサイエンス・インフォメーションセンター
- ② 加部泰明、末松誠「ヘム/CO による GAPDH を介した細胞防御機構の解明」(口頭・ポスター発表)、第 35 回日本分子生物学会年回、2012 年 12 月 13 日、福岡国際会議場
- ③ 加部泰明、末松誠「CO ガスによる細胞防御機構の解明」(口頭・ポスター発表)、第 34 回日本分子生物学会年回、2011 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜
- ④ 加部泰明、末松誠「ガス分子応答性受容体の系統的探索と機能解明」(口頭発表)、第 64 回日本酸化ストレス学会、2011 年 7 月 3 日、北海道 ルスツリゾートホテル&コンベンション
- ⑤ 加部泰明、末松誠「ヘム/CO による GAPDH を介した細胞防御機構の解明」(口頭発表)、第 38 回生体分子科学討論会、2011 年 6 月 23 日、筑波大学大学会館国際会議室
- ⑥ 加部泰明、末松誠「ヘム/CO による細胞防御機構の解明」(口頭発表)、第 32 回日本炎症・再生医学会、2011 年 6 月 3 日、国立京都国際会館

[図書] (計 4 件)

- ① 加部泰明、末松誠、半田宏 実験医学別冊「医学生物学における最新プロトコールと実験例」羊土社、pp58-68, 2013 (著書・総説)
- ② 末松誠、梶村真弓、加部泰明 臨床麻酔「ガス分子による代謝システム制御機構の系統的探索と応用」真興交易医書、pp157-165, 2012 (著書・総説)
- ③ 末松誠、久保亜紀子、大村光代、菱木貴子、梶村真弓、加部泰明、杉浦悠基 実験医学「がん代謝」羊土社、pp193-202, 2012 (著書・総説)
- ④ 末松誠、梶村真弓、加部泰明、山本雄広 実験医学増刊「in vivo 実験医学によるヒト疾患解明の最前線」羊土社、pp90-97, 2011. (著書・総説)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称:「一酸化炭素 (CO) による脂肪酸、コレステロールの取り込み阻害」

発明者: 加部泰明、末松誠

権利者: 加部泰明、末松誠

種類: 特許

番号: 特願 2011-263015, PCT/JP2012/065058

出願年月日: 2011/11/17

国内外の別: 国内および国際出願

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

石森 浩一郎 (ISHIMORI, Koichiro)  
北海道大学・理学部・教授  
研究者番号：20192487