

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860203

研究課題名(和文)ヘムによる自然免疫応答調節とその意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of Innate immune response control by heme and its significance

研究代表者

松井 美紀 (Matsui, Miki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00455784

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)：自然免疫応答におけるヘムの役割は不明である。本研究では、ヘムの自然免疫応答における役割を明らかにすることを目的とした。野生型及びBach2KOマウスの赤脾髄マクロファージを用いDNAマイクロアレイを行った。野生型及びBach2KOマウスにおいて、遺伝子発現変化に大きな違いはなかった。Bach2レポーターマウスを用いて骨髄マクロファージのDNAマイクロアレイを行った。その結果Bach2が発現した細胞でヘム代謝に関わる遺伝子の発現が抑制されていた。以上から骨髄マクロファージでBach2は、ヘム代謝合成に関わる遺伝子発現を統合している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Heme binds to proteins to modulate their function. However, the regulatory role of heme in the innate immune responses has been unknown. Previous study we found that heme binds to transcription repressor Bach2 to inhibit its DNA binding activity and to induce its degradation in B cells. On the basis of this study we focused on the regulatory of heme in the innate immune response. Firstly, we compared red pulp macrophage phenotype between wild-type and Bach2 knockout mice by using DNA microarray analysis. In this macrophage, there were almost no change between wild-type and Bach2 knock out mice in gene expressions. Secondly, we performed DNA microarray by using Bach2 reporter mice bone marrow macrophage. The results of the gene ontology analysis of the Bach2 expressed-cells showed "heme biosynthetic process" and "heme catabolic process". These results suggested that Bach2 may integrate heme metabolism and synthesis in bone marrow macrophage.

研究分野：生化学

キーワード：ヘム 転写因子

1. 研究開始当初の背景

ヘムは生体内において必須な因子である。近年、ヘムによる遺伝子発現制御やタンパク質の機能制御についても報告が相次いでいる。更に、細胞内におけるヘム輸送に関わる新しい因子が同定されるなど、ヘムのシグナル分子としての機能に注目が集まっている⁽¹⁾。ヘムは、生体内で組織の損傷や赤血球が破壊されると、ヘモグロビンやミオグロビンといった様々なヘムタンパク質から解離し、遊離ヘムとして存在する。遊離ヘムは、細胞毒性であるフリーラジカルを生じるため、ヘム分解酵素 (Heme oxygenase : HO) によって、一酸化炭素、鉄、ビルベルジンに迅速に分解される⁽²⁾。このヘムの分解や代謝に特化した細胞として、マクロファージが挙げられる。マクロファージは、破壊された細胞や死んだ細胞を貪食して排除する自然免疫応答を担う細胞である。近年、自然免疫の研究領域では、破壊された細胞や組織から漏出する生体成分が "danger signal" として免疫担当細胞を活性化し調節することがわかってきた⁽³⁾。そこで申請者は、細胞毒性を持つため直ちに分解されると考えられてきたヘムが、実は、炎症応答の場では、シグナル分子としてマクロファージを活性化する danger signal となる可能性を考えた。申請者の所属研究室では、*HO-1* 遺伝子を直接標的遺伝子とする転写因子が、Bach2 およびファミリー因子 Bach1 であることを示してきた⁽⁴⁾。しかしながら、自然免疫応答における Bach2 の役割は長らく不明であった。最近、所属研究室で、Bach2 がマクロファージの分化にも関わることを発見した。マクロファージは、サイトカインや外来性物質に反応して炎症を促進する M1 型細胞や、逆に炎症を抑え組織修復を促進する M2 型細胞へと分化することが知られているが⁽⁵⁾、Bach2 ノックアウトマウス (Bach2 KO) のマクロファージは M2 型に分化が偏向している (中村ら、未発表)。これまでに申請者は、「ヘムが液性免疫応答を制御する役割」という「ヘムの新しい概念」を提唱してきた。すなわち、Bach2 がヘム受容体で

あることを発見し、ヘムが Bach2 の DNA 結合を阻害と分解を誘導すること示し、その結果、形質細胞分化を促進すると共にクラススイッチを抑制することを報告した (Watanabe-Matsui *et al. Blood* 2011)。このことから、ヘムは液性免疫のみならず、danger signal としてマクロファージに作用し、自然免疫のうち M2 マクロファージ応答を増強する可能性が考えられる。更に、興味深いことに、Bach2 KO マウスの詳細な解析から、Bach2 KO マウス脾臓においてヘムの代謝産物である鉄の沈着が乏しいことを見いだしている (小林ら、未発表)。所属研究室では、ヘム代謝産物である鉄の貯蔵・排出に関わるフェリチンおよびフェロポーチンが Bach 因子の直接標的遺伝子であることを報告してきた⁽⁶⁾。これらの予備的な知見を考え合わせると、ヘムの異化を担うマクロファージにおいて、Bach 因子がヘムの輸送、分解および分解産物の処理といった一連の過程を統合的に制御している可能性がある。つまり、ヘムはマクロファージに取り込まれると、シグナル分子として Bach 因子を不活性化し、ヘム分解と代謝物および鉄代謝関連遺伝子群の発現を上昇させ、ヘムの処理が迅速に進むこと、そしてその際に自然免疫系のエフェクター遺伝子の発現変化が同時に起きると予想される。本研究では、マクロファージにおいて Bach2 によるヘム代謝と鉄代謝の遺伝子発現調節を中心に解析を進め、その上でヘム-Bach2 経路が自然免疫応答のエフェクター遺伝子群を調節する可能性を追求する。文献： **4, 6** は申請者の所属研究室より発表。 **1)** *BBA*, v1823, p1617-32, (2012), **2)** *Antioxid Redox Signal.* v4, p593-602, (2002), **3)** *Annu Rev. Immunol.* v12, 991-1045 (1994), **4)** *EMBO J.*,v21:5216-24, (2002), **5)** *J. Immunol.* v181, p3733-9 (2008), **6)** *Mol. Cell*, v41, p554-66, (2011)

2. 研究の目的

本研究は、生体に必須なヘムが転写抑制因子 Bach2 を標的とするシグナル分子として作用し、自然免疫応答を制御する機構を解明することを目指す。Bach2 は形質細胞分化を抑制し、クラススイッチ組換えに必須な因子である。これまで申請者は、ヘム

が Bach2 と直接結合し、不活性化することで、形質細胞への分化を促進し、液性免疫応答を制御する役割を示してきた。本研究では、この「ヘムによる免疫応答制御」の概念を自然免疫系に展開し、ヘム異化と鉄の再利用において重要なマクロファージ細胞で、ヘムが Bach2 のリガンドとして自然免疫応答を調節することを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マクロファージにおける、転写因子 Bach2 によるヘム関連遺伝子群の制御を検証

Bach2 の直接標的遺伝子であるヘム代謝・鉄代謝遺伝子が、マクロファージにおいても Bach2 の直接標的遺伝子であることをクロマチン免疫沈降実験で示す。

(2) 「ヘム-Bach2 経路」と「自然免疫関連遺伝子」の関与を示す

野生型および Bach2 レポーターマウスの細胞を用い、DNA マイクロアレイ解析を行い、ヘム関連遺伝子と自然免疫関連遺伝子の発現変化を検証する。同時に、新たな Bach2 の直接標的遺伝子候補を探索し、クロマチン免疫沈降および定量 PCR で評価する。新たな Bach2 直接標的遺伝子候補については、マクロファージの機能への影響も検討する。

(3) マウス個体を用いて、「ヘム-Bach2 経路」による自然免疫調節を検証する

野生型および Bach2 レポーターマウスに、自然免疫誘導活性試薬および溶血試薬をそれぞれ投与し、Bach2 の発現頻度の変化を検証する。

以上の結果から、ヘムによる自然免疫応答とその意義について総合的に検証する。

4. 研究成果

(1) マクロファージにおける、転写因子 Bach2 によるヘム関連遺伝子群の制御を検証

野生型および Bach2 ノックアウトマウス (Bach2KO) の脾臓から、赤脾髄マクロファージを採取し DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、野生型と Bach2KO マウスにおいて、遺伝子発現変化に大きな変化はなかった。既報により、赤脾髄マクロフ

ァージにおける遺伝子発現制御に関しては、Bach2 のホモログである Bach1 による遺伝子発現制御が指摘されている (参考文献 Cell, 2014, v156, p1223-1234)。このことから、赤脾髄マクロファージにおいて、Bach2 による遺伝子発現の制御に

よる影響が少ないことが考えられた。

(2) 「ヘム-Bach2 経路」と「自然免疫

関連遺伝子」の関与の検討

Heme-Bach2 経路が機能している細胞として、Bach2 レポーターマウスの骨髄マクロファージに注目した。フローサイトメーター (FACS) を用いて、Bach2 が発現している細胞と発現していない細胞を分取し、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、ジーンオントロジー解析から、Bach2 が発現している細胞で、ヘム代謝関連遺伝子が抑制していることが明らかとなった。また、Bach2 の新たな直接標的遺伝子としてヘムトランスポーター (HRG-1) を同定した。直

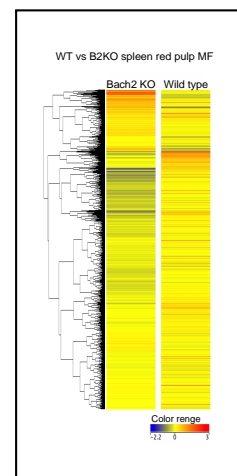


図 1: 野生型および Bach2KO 赤脾髄マクロファージの DNA マイクロアレイ解析

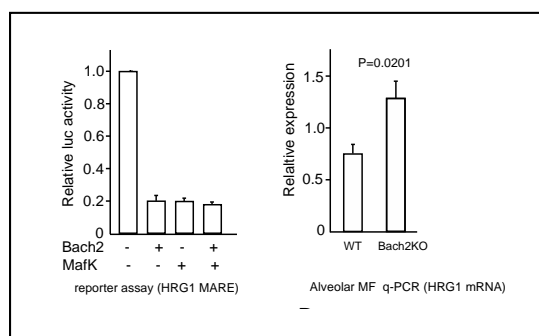


図 2. Bach2 の直接標的遺伝子として HRG1 を同定した。左図: レポーターアッセイ、右図: 野生型及び Bach2KO マウスのマクロファージ細胞を用いた定量 PCR

接標的遺伝子であることを示すために、ゲルシフトアッセイ、レポーターアッセイ、Bach2KO マウスの細胞と野生型マウスの細胞を用いた定量 PCR を行い検討した。

(3) マウス個体を用いて、「ヘム-Bach2 経路」による自然免疫調節を検証する
骨髄マクロファージにおける「ヘム-Bach2 経路」の生理的意義を検証するために、

Bach2 レポーターマウスにヘムを投与した。その結果、ヘムを投与していないマウスと比較して、ヘムを投与したマウスでは、Bach2 の発現頻度が低下している傾向を示した。この現象とこれまでの知見を考え合わせると、ヘムが Bach2 と結合し、Bach2 タンパク質の分解を誘導したためと考えることができる。

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 6 件)

1. Restriction-modification system with methyl-inhibited base excision and abasic-site cleavage activities, *Nucleic Acids Research*, 43(2015), 2841-52, Fukuyo, Masaki, Nakano Toshiaki, Zhang Yingbiao, Furuta Yoshikazu, Ishikawa Ken, Matsui Miki, Yano Hirokazu, Hamakawa Takeshi, Ide Hiroshi, Kobayashi Ichizo, (査読有), doi: 10.1093/nar/gkv116.

2. Heme binds to an intrinsically disordered region of Bach2 and alters its conformation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 565(2015), 25-31.

M. Watanabe-Matsui, T. Matsumoto, T. Matsui, M. Ikeda-Saito, A. Muto, K. Murayama, K. Igarashi, (査読有), doi: 10.1016/j.abb.2014.11.005.

3. The transcription repressors Bach2 and Bach1 collaborate with EBF1 to promote B cell development by curbing myeloid program, *Nat. Immunology*, 15(2014), 1171-1180.

A. Itoh-Nakadai, R. Hikota, A. Muto, K. Kometani, M. Matsui-Watanabe, Y. Sato, M. Kobayashi, A. Nakamura, Y. Miura, Y. Yano, S. Tashiro, J. Sun, T. Ikawa, T. Kurosaki, K. Ochiai, and K. Igarashi, (査読有), doi: 10.1038/ni.3024.

4. Wearing red for signaling: the heme-bach axis in heme metabolism, oxidative stress response and iron immunology, *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 232(2014), 229-253.

K. Igarashi, M. Watanabe-Matsui, (査読有), (https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/232/4/232_229/_article)

5. Hemopexin-dependent heme uptake via endocytosis regulates the Bach1 transcription repressor and heme oxygenase gene activation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(2014), 2351-2360.

H. Hada, T. Shiraki, M. Watanabe-Matsui, K. Igarashi, (査読有), doi: 10.1016/j.bbagen.2014.02.029.

6. A sequence-specific DNA glycosylase mediates restriction-modification in *Pyrococcus abyssi*, *Nature Communications* 5(2014), Article number 3178.

K. Miyazono, Y. Furuta, Miki Watanabe-Matsui, Takuya Miyakawa, Tomoko Ito, Ichizo Kobayashi, M. Tanokura, (査読有), doi: 10.1038/ncomms4178.

[学会発表](計 6 件)

Miki Watanabe-Matsui, Kazutaka Murayama, Toshitaka Matsui, Masao Ikeda-Saito, Kazuhiko Igarashi, ヘムによる天然変性タンパク質 Bach2 の制御 (Heme regulates intrinsically disorder protein Bach2)、第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10/15-18 国立京都国際会館(京都府)

Kazutaka Murayama, Miki Watanabe-Matsui, Kazuhiko Igarashi, 天然変性タンパク質 Bach2 のタンパク質のヘム結合領域(Heme binding region of Bach2 as intrinsically disordered protein)、第 51 回日本生物物理学会年会 2013 年 10/28-30 国立京都国際会館(京都府)

松井美紀 伊藤亜里、武藤哲彦 五十嵐和彦、ヘム-Bach2 経路によるヘムトランスポーター HRG1 の発現制御 (The Heme-Bach2 axis regulates the expression of heme transporter HRG1)、第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9/11-13 パシフィコ横浜会議センター(横浜市)

羽田浩士、白木琢磨、松井美紀、五十嵐和彦、Hemopexin-dependent heme uptake through endocytosis regulates Bach1 transcriptional activity of cellular stress responses、第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9/11-13、パシフィコ横浜会議センター(横浜市)

Miki Matsui, Kazutaka Murayama, Takashi Matsumoto, Toshitaka Matsui, Masao Ikeda-Saito, Kazuhiko Igarashi, Heme regulates unstructured region of transcription factor Bach2、ICBIC16、2013 年、22-26 July, Grenoble France

松井美紀、ヘムに制御される天然変性タンパク質 Bach2 の制御機構の解明、第 13 回日本蛋白質科学年会、2013 年 6/12-14

若手奨励賞シンポジウム、とりぎん文化会館（鳥取市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

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

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

松井美紀（Masui Miki）

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00455784

(2)研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者

（ ）

研究者番号：