

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：21601
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26340041
研究課題名(和文)ヒ素化合物による細胞ストレス応答の分子機構：翻訳開始因子キナーゼのクロストーク

研究課題名(英文)Molecular mechanism of heme-regulated inhibitor (HRI) under stress conditions

研究代表者
五十嵐 城太郎 (Igarashi, Jotaro)
福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80375162
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：翻訳開始因子キナーゼ(HRI)の分子レベルにおける活性調節機構を明らかにするため、ストレス条件下におけるHRIの分解、ストレス顆粒内でのタンパク質間相互作用、およびHRIの結晶構造解析を行った。その結果、1)培養細胞内でHRIはプロテアソームにより分解される。2)HRIとプロリン水酸化酵素OGFOD1との直接的な相互作用するものの、親和性は低い。3)HRIの結晶化のため昆虫細胞を用いた大量発現系を構築した。

また、大腸菌由来の酸素センサータンパク質Dgc0タンパク質のリガンド結合部位のX線結晶構造解析を行い、リガンド認識機構について解明した。

研究成果の概要(英文)：Heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) kinase (HRI), functions in response to heme concentration. Under stress conditions, HRI forms stress granules and down-regulates protein synthesis. The molecular mechanism of HRI remained to be established. In the present study, we demonstrate that HRI degradation is inhibited by bortezomib in cultured cells. Using pull-down assay, the interaction between HRI and OGFOD1 are observed. Furthermore, to solve the crystal structure of HRI, insect cell expression systems are constructed. In addition, we also elucidate the mechanism of ligand recognition of Dgc0 from Escherichia coli. Dgc0, which is also known as YddV or DosC, consists of globin domain, middle domain, and diguanylate cyclase domain. We solved the crystal structure of globin domain of Dgc0 in the presence of various ligands.

研究分野：生物無機化学

キーワード：ヘム X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

HRI は翻訳開始因子 2 の α サブユニット (eIF2 α) を基質とする eIF2 α キナーゼファミリーに属する。4 種類の eIF2 α キナーゼファミリーはいずれもセンサードメインにおいてヘム不足等のストレスを感知すると、キナーゼドメインを自己リン酸化し活性化する。その結果 eIF2 α をリン酸化することで、タンパク質合成を翻訳開始段階において停止させる。

私たちは、これまでに大腸菌を用いて組換え HRI の発現・精製に成功し、一酸化窒素による HRI の活性化機構について明らかにした (Igarashi *et al.* *J. Biol. Chem.* 2004)。また、HRI の Cys409 及び His119/His120 がヘムに結合すること、ヘムの結合分子内のドメイン間に相互作用が働くことを示した (Igarashi *et al.* *J. Biol. Chem.* 2008)。さらに、自己リン酸化部位を質量分析法によって 33 カ所同定し、そのうち Tyr193, Thr485, Thr490 のリン酸化が活性調節に必須であることを解明した (Igarashi *et al.* *FEBS J.* 2011)

一方、ヒ素化合物による細胞ストレスで活性化する eIF2 α キナーゼは HRI のみである。またこの際、細胞質にストレス顆粒と呼ばれる mRNA-タンパク質複合体が凝集し、タンパク質合成が一時停止する。ストレス顆粒には HRI, eIF2 α , OGFOD1 等が含まれることが報告されている。しかし、HRI がどのようにストレス顆粒を介してタンパク質合成を調節しているのかは未だ不明である。そこで本研究では、細胞内において HRI が他のタンパク質とのクロストークによって調節を受け、活性化する分子機構の解明を目指す。

なお、研究開始時には予定していなかったが以下の研究課題についても並行して進めた。1) 大腸菌由来の酵素、酸素の結合に伴い環状ジヌクレオチド (c-di-GMP) の合成・分解を触媒する DgcO (YddV もしくは DosC) および PdeO (*Ec*DOS もしくは DosP) の X 線結晶構造解析。2) 組換えタンパク質を用いた魚類のミオグロビンの結合酸素の安定性

2. 研究の目的

(1) HRI の分解による不活性化

ヒ素化合物及びプロテアソーム阻害剤によって HRI の活性が上昇することが報告されている。これは、通常 HRI がプロテアソームにより分解され、不活性化状態にあると考えられる。そこで、培養細胞を用いて HRI のユビキチン化、プロテアソームを介した HRI の分解の可能性を検討する。

(2) HRI の翻訳後修飾およびプロリン水酸化酵素 (OGFOD1, PHD2 など) とのタンパク質間相互作用の検討

① 2-オキソグルタル酸・鉄依存性の水酸化酵素の 1 つ OGFOD1 は、ストレス顆粒において HRI と相互作用すると報告されている。まず、HRI が OGFOD1 の基質であるかどうかを検討する。次に、タンパク質間相互作用につい

ても検討する。

② 低酸素応答因子 HIF-1 α のプロリンを水酸化する PHD2 が PXLE 配列を持つタンパク質と結合することが報告されている。HRI には PSLE 配列が存在し、生物種間で保存されている。この内 Ser252 は自己リン酸化を受けることがわかっており、HRI のリン酸化とタンパク質間相互作用による調節を調べる。

(3) HRI の立体構造解析

4 種類の eIF2 α キナーゼの内、HRI の立体構造のみ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 の立体構造解析を行う。

(4) DgcO の活性制御機構と立体構造解析

DgcO は大腸菌に由来するグロビン結合型センサーの 1 つであり、N 末端のグロビンドメインと C 末端のジグアニル酸シクラーゼが結合している。DgcO はグロビンドメイン中のヘム鉄が 2 価の場合は不活性であるが、ヘム鉄 2 価に酸素が結合した場合、2 分子の GTP から環状ジヌクレオチド (c-di-GMP) の合成を触媒する。DgcO の酸素分子認識機構と酵素活性の制御機構について、全長型 DgcO を用いた酵素活性測定と、酸素を結合するグロビンドメインのみを単離して X 線結晶構造解析により立体構造の決定を行う。

3. 研究の方法

(1) 2 μ M プロテアソーム阻害剤 (Bortezomib) 存在下でマウス由来 MEL 細胞培養した。なお、Bortezomib は多発性骨髄腫の治療のため、臨床で用いられている薬剤である。

(2) 試験管内における、タンパク質の翻訳後修飾およびタンパク質間相互作用を解析するために、まずプロリン水酸化酵素 (OGFOD1, PHD1, PHD2, PHD3) の遺伝子入手し、大腸菌の発現ベクターに組み込んだ。そして、大腸菌で発現させたプロリン水酸化酵素を精製し、試験管内において OGFOD1 や PHD2 が HRI と直接相互作用するかどうかをプルダウンアッセイによって確認した。

(3) HRI の立体構造解析を行うために、大腸菌で発現・精製を行った試料を用いて結晶化スクリーニングを行った。また、昆虫細胞を用いた HRI の発現系を構築し、発現・精製を行い、得られた試料を用いて結晶化スクリーニングを行った。

(4) DgcO の活性制御機構と立体構造解析

DgcO (YddV もしくは DosC) 全長型酵素を精製し、GTP を基質として、c-di-GMP の生成量を HPLC を用いて測定した。また、化学物質の認識部位 (グロビンドメイン) を単離して精製し、結晶化を行い、様々なリガンドの存在下で X 線結晶構造解析により立体構造の決定を行った。

4. 研究成果

(1) HRI の分解による不活性化

2 μ M Bortezomib 存在下で MEL 細胞を培養したところ、処理時間が長くなるにつれて、HRI の量が増大したので、HRI の活性はプロテアソームを介した分解で制御されていることが示唆された。しかしながら、プロテアソーム分解時に必要とされるユビキチン化は検出されなかった。

(2) HRI の翻訳後修飾およびプロリン水酸化酵素 (OGFOD1, PHD2 など) とのタンパク質間相互作用の検討

① OGFOD1 の大腸菌での発現精製には His タグを用いた。HRI との相互作用をプルダウンアッセイによって検討したところ、直接的な相互作用は見られるものの、親和性は低いことが明らかになった。なお、2014 年に OGFOD1 はリボソームタンパク質 RSP23 を基質とし、Pro62 を水酸化すると報告された。さらに、OGFOD1 の立体構造も 2015 年に発表された。

② PHD1~3 の大腸菌での発現は、コドン最適化したものであっても困難であった。また、His タグ、GST タグを検討したがいずれも精製には至らなかった。

このように、試験管内反応での結果が得られなかったため、培養細胞中での HRI とプロリン水酸化酵素との相互作用、翻訳後修飾の検討は行っていない。

(3) HRI の立体構造解析

HRI の立体構造解析を行うために、Bac-to-Bac システムによって、バキュロウイルスを作製し、昆虫細胞での発現を試みた。HRI の cDNA にはゼブラフィッシュ、ラット、マウス、ヒトの全長型とキナーゼドメインのみのものを用いた。今後、精製・結晶化スクリーニングを行い、X 線結晶構造解析を目指す。

(4) DgcO の活性制御機構と立体構造解析

DgcO のリガンド識別機構を解明するために、DgcO のグロビンドメイン (アミノ酸 1-153) の X 線結晶構造解析を行った。はじめに、グロビンドメインの結合酸素の安定性について、吸収スペクトルを経時的に測定し検討した。その結果、結晶化条件の pH 5.5 では、半減期が 2 分ほどでヘム鉄 3 価へと自動酸化することが明らかとなった。そこで、ヘム鉄が 3 価の場合について、リガンド非存在、イミダゾール結合型およびシアン結合型の 3 種類の結晶構造解析を行い、1.6 Å 分解能でデータを収集した。グロビンドメインの構造は N 末端の Z ヘルックスに加えて 7 つのヘルックス (A~H、D ヘルックスは欠損) から形成されていた (図 1)。Leu65 はヘム鉄に最も近接した位置にあり、リガンドの結合の際にはヘム鉄から離れるように回転した。部位特異的変異体解析より重要性が示唆されていた Tyr43 はシアン結合型のみリガンドと水素結合ができる位置へと移動した。さらに、シアンが結合すると、ヘムのプロピオン酸が大

きく変位し、Gln60, Gln64 との間に水素結合が形成された。この水素結合の形成によって、C ヘルックスから E ヘルックスにかけて大きな構造変化が誘起された (図 2)。最後に、全長型酵素を用いて c-di-GMP の合成活性を測定したところ、ヘム鉄 3 価の場合と比較して、シアン結合時に活性が上昇することがわかった。なお、これらの結果をまとめた論文を投稿中である。

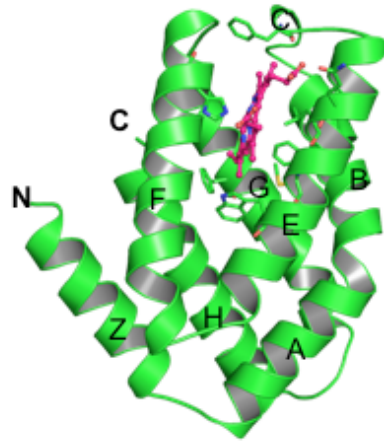


図 1: DgcO グロビンドメインの立体構造
7本の α ヘルックスからなり、ヘムは E, F ヘルックスの間にある。

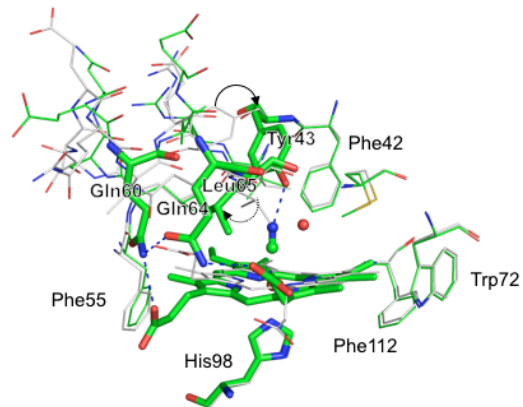


図 2: DgcO グロビンドメインのヘム周辺構造の比較 (白:ヘム鉄 3 価, 緑:ヘム鉄 3 価にシアンが結合) 左側の C, E ヘルックス領域に大きな構造変化が見られる。

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 0 件)

[学会発表] (計 9 件)

- ① Kobayashi G, Igarashi J, Miyoshi R, Nishiyama N, Mizuguchi T, Matsuoka A "Hoki myoglobin with unusual autoxidation behavior: Comparative analysis of native protein and H60V mutant" The 22nd International Congress

- of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan, 2016/11/17-18, 宜野湾
- ② 五十嵐城太郎, 菊池亨, 松岡有樹 "酸素センサータンパク質 YddV のリガンド識別機構と活性調節" 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/27, 仙台
 - ③ Igarashi J, Kikuchi T, Matsuoka A "Ligand sensing mechanism of globin domain of a heme-based oxygen-sensor enzyme, YddV, from *Escherichia coli*" The 19th International Conference on Oxygen Binding and Sensing Proteins, 2016/9/13, Hamburg, Germany
 - ④ 五十嵐城太郎, 松岡有樹 "酸素センサータンパク質 YddV のグロビンドメインの構造解析" 日本動物学会平成 28 年度東北支部大会, 2016/7/24, 福島
 - ⑤ 五十嵐城太郎, 菊池亨, 松岡有樹 "酸素センサータンパク質 YddV のグロビンドメインの構造解析" 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2015), 2015/12/1-4, 神戸
 - ⑥ Kobayashi G, Nishiyama N, Endo Y, Mizuguchi T, Igarashi J, Matsuoka A "Stability properties of fish myoglobin from hoki (*Macruronus magellanicus*)" The 9th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2015/8/25, Krakow, Poland
 - ⑦ Igarashi J, Kikuchi T, Matsuoka A "Crystal structure of isolated heme-bound globin domain of a heme-based oxygen-sensor, YddV, from *Escherichia coli*" 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015/9/13-15, 金沢
 - ⑧ 小林元, 遠藤優希, 五十嵐城太郎, 西山学即, 水口亨, 松岡有樹 "大腸菌で発現させたホキ・ミオグロビンの分子特性" 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 2014/9/20, 福岡
 - ⑨ 五十嵐城太郎, 清水透 "酸素センサー酵素 *Ec* DOS の M30A 変異体における構造変化" 第 87 回日本生化学会大会, 2014/10/17, 京都

[その他]

ホームページ等

http://www.fmu.ac.jp/kenkyu/html/1215_ja.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 城太郎 (IGARASHI, Jotaro)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80375162