

令和 2 年 3 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08573

研究課題名(和文)ヘム-Bach2経路による遺伝子発現制御とその意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the gene expression mechanism by the heme -Bach2 pathway

研究代表者

松井 美紀(MASTUI, Miki)

東北大学・医学系研究科・JSPS特別研究員(RPD)

研究者番号：00455784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子Bach2の天然変性領域と直接相互作用するリン酸化酵素を同定した。質量分析法により、同定したリン酸化酵素によるBach2のリン酸化サイトが、ヘム非存在化・存在化と比較して、時間変化に伴い変化することが明らかとなった。また、マウス初代培養系を用いた検討により、Bach2の直接標的遺伝子Blimp-1の遺伝子発現が、リン酸化阻害剤存在化で低下することが示された。このことから、ヘムがBach2の天然変性領域に結合すると、その構造状態を変化させ、リン酸化酵素に対する親和性が上昇し、最終的にBach2のリン酸化サイトが変化することで、Bach2の機能が調整される可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は、研究対象であるBach2が液性免疫における形質細胞分化、自然免疫におけるマクロファージの分化に重要な転写因子であり、かつBach2が複数のヘムに制御される天然変性タンパク質であるという点にある。ヘムタンパク質の多くは安定な立体構造をとり、ヘムとタンパク質が1:1で結合して機能しているものがほとんどである。これまでに、ヘムにより制御される天然変性タンパク質の報告はない。本研究によって、生体内でヘム濃度変化が液性免疫および自然免疫の重要なシグナル因子となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor Bach2 possess BTB and bZip domains, separated by long unstructured sequences. In addition, Bach2 protein contains a conserved Cys-Pro motif, which has been identified as the heme-binding site. Our previous studies of Bach2 revealed that when heme binding occurs in the intrinsically disordered region, the conformation of the region is altered. In this study, we identified the serine-threonine kinase, which directly bound to intrinsically disordered region of Bach2. This kinase inhibitor induced the cytoplasmic and nuclear localization of Bach2. Moreover, this kinase inhibitor acts on the repression activity of Bach2. The LC-MS/MS analysis of phosphorylated-site of Bach2 by this kinase in the presence or absence of heme showed that heme changed the phosphorylated-site of Bach2. These results suggested that heme regulates phosphorylated-site of intrinsically disordered region of Bach2 and releases of transcriptional repression activity of Bach2.

研究分野：生化学

キーワード：ヘム 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヘムは、高等生物の生命維持にとって必須の補欠分子族である。近年、電子伝達や酸素運搬といった古典的機能に加え、ヘムがリガンドとしていくつかのタンパク質の機能制御やガス分子応答にも関与することが報告され、新しいヘム機能への関心が高まりつつある。転写抑制因子Bach2の発現は免疫系細胞で高く、B細胞の分化に必須な因子であることが知られてきた。近年、Bach2は、制御性T細胞、フェクターT細胞の分化に重要であることもわかってきた。しかし、Bach2の制御機構は不明なままである。これまでに、申請者は、Bach2のリガンドがヘムであり、成熟B細胞から形質細胞への分化をヘム依存的に促進する現象を発見した(Watanabe-Matsui et al., 2011, Blood)。この成果から、「ヘムによる免疫の調節」という、全く新しい考えを見いだした。しかしながら、ヘムがBach2タンパク質を、どのような遺伝子発現を制御して免疫を調節するのかという点について解決されていない。天然変性タンパク質は、人体で働くすべてのタンパク質のうち約1/3に存在すると言われている。特に、転写因子など遺伝子発現制御に関わるタンパク質の機能部位の多くが、「決まった構造をとらない」、いわゆる「天然変性状態」として存在し、他のタンパク質と相互作用して多角的な機能を生み出していることが明らかとなり注目されている。最近、申請者は、Bach2タンパク質のほとんどの領域が、「天然変性タンパク質」であり、その天然変性領域の構造をヘムが変化させることを明らかにした(Watanabe-Matsui et al., 2015, ABB)。しかしながら、ヘムによるBach2の天然変性領域における構造変化が、機能にどのように影響するかという点については解決されていない。

### 2. 研究の目的

本研究は「ヘム-Bach2経路による遺伝子発現制御とその意義」という、「ヘム依存的な遺伝子発現制御機構」の提唱と共に、その生体での意義を追求することにある。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。これまでに申請者は、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。更に、Bach2が天然変性タンパク質であり、ヘムがBach2の天然変性領域の構造を変化させること明らかにした。本研究では、これら「ヘムによる免疫の調節」と「ヘムによる天然変性タンパク質制御」という2つの概念に基づき、免疫細胞における「ヘム依存的な遺伝子発現制御機構」の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1)リン酸化酵素阻害剤によるBach2の細胞内局在に及ぼす影響について：マウス骨髄芽球細胞株(M1細胞)を用いた免疫染色法による検証

M1細胞において、リン酸化酵素阻害剤によるBach2の細胞内局在変化について検討した。M1細胞をリン酸化酵素阻害剤添加・未添加条件で2時間培養した。その後、抗Bach2抗体、抗LaminB抗体(核膜)およびHoechst(核)を用いて染色し、Bach2の細胞内局在について比較検討した。

(2)リン酸化酵素阻害剤によるBach2標的遺伝子に及ぼす影響について：マウス脾臓B細胞を用いた定量PCRによる検討

マウス脾臓B細胞を用い、リン酸化酵素阻害剤によるBach2の標的遺伝子(Blimp-1)について定量PCR法により検討した。マウス脾臓B細胞をリポポリサッカライド(LPS)で20時間培養した後、リン酸化酵素阻害剤を添加し3時間培養した。その後RNAを回収し

定量 PCR 法により阻害剤効果を検討した。

(3) ヘムによる Bach2 のリン酸化への影響についての検討：質量分析法によるリン酸化サイトの検討

Bach2 の天然変性領域およびリン酸化酵素をそれぞれ発現・精製する。精製したそれぞれのタンパク質を用いて、時間変化に伴った、ヘム存在化・非存在化における Bach2 のリン酸化反応を行った。反応後、トリプシン消化を行ったのち、質量分析法により Bach2 のリン酸化サイトの同定を行った。

#### 4 . 研究成果

(1) マウス骨髄芽球細胞株 (M1 細胞) を用いた免疫染色法による検証

リン酸化酵素阻害剤未添加の細胞では、Bach2 が核内に優位に分布する細胞は約 30%、細胞質優位に分布する細胞は約 70% であり、細胞質局在する Bach 2 の割合が多かった。一方、リン酸化酵素阻害剤を添加した細胞では、Bach2 が核内に優位に分布する細胞は約 50%、細胞質優位に分布する細胞は約 50% であった。従って、M1 細胞において、リン酸化酵素阻害剤によりリン酸化 Bach2 が低下すると、Bach2 は核へ局在が変化することが観察された。

(2) マウス脾臓 B 細胞を用いた定量 PCR による検討

単離・精製したマウス脾臓 B 細胞を LPS で 12 時間培養した。LPS に応答して、マウス脾臓 B 細胞は活性化し、一部は形質細胞へと分化する。その後、リン酸化酵素阻害剤を添加し、3 時間培養した。定量 PCR 法により、Bach2 の直接標的遺伝子(Blimp-1)の発現変化について検討した結果、阻害剤未添加と比較して、3 時間阻害剤で処理した細胞では、Blimp-1 の遺伝子発現量が低下していた。

(3) 質量分析法によるリン酸化サイトの検討

精製したリン酸化酵素と Bach2 を用い、ヘム存在化・非存在化においてリン酸化反応を行い、質量分析法により Bach2 のリン酸化サイトを同定した。その結果、ヘムが存在するとリン酸化が低下するペプチドが検出された。一方、時間変化に伴い、ヘムが存在するとリン酸化が増加するペプチドが検出された。

これらの結果から、今回同定したリン酸化酵素は Bach2 と相互作用し、Bach2 をリン酸化することで、その核外移行を誘導し、最終的に Bach2 の転写抑制機能が低下すること、その結果、成熟 B 細胞の形質細胞への分化が促進することが考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Segawa K., Watanabe-Matsui M., Tsuda K., Matsui T., Shirouzu M., Igarashi K., Murayama K., Biophysical characterization of heme binding to the intrinsically disordered region of Bach1. *European Biophysics Journal*. 2019; 1432-1017 (Online) :1-9.  
doi:10.1007/s00249-019-01364-5. ( 査読有 )
2. Segawa K., Watanabe-Matsui M., Matsui T., Igarashi K., Murayama K. Functional heme binding to the intrinsically disordered C-terminal region of Bach1, a transcriptional repressor. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2019; 247: 153-159.  
doi: 10.1620/tjem.247.153 ( 査読有 )
3. Kato H., Itoh-Nakadai A., Matsumoto M., Ishii Y., Watanabe-Matsui M., Ikeda M., Ebina-Shibuya R., Sato Y., Kobayashi K., Nishizawa H., Suzuki K., Muto A., Fujiwara T., Nannya Y., Malcovati L., Cazzola M., Ogawa S., Harigae H., Igarashi K. Infection perturbs Bach2-and Bach1-dependent erythroid lineage 'choice' to cause anemia. *Nature Immunology*, 2018; 19: 1059-1070. doi: 10.1038/s41590-018-0202-3 ( 査読有 )
4. Li J., Shima H., Nishizawa H., Ikeda M., Brydun A., Matsumoto M., Kato H., Saiki Y., Liu L., Watanabe-Matsui M., Iemura K., Tanaka K., Shiraki T., Igarashi K. Phosphorylation of BACH1 switches its function from transcription factor to mitotic chromosome regulator and promotes its interaction with HMMR. *Biochemical Journal*. 2018; 475: 981-1002. doi: 10.1042/BCJ20170520 ( 査読有 )

### 〔学会発表〕(計 4 件)

1. ○松井(渡部)美紀、「シンポジウム：生体金属のMagical Powerとその研究最前線」 「形質細胞分化におけるヘムシグナルと天然変性タンパク質Bach2」第91回生化学会大会、京都、9月、2018年 口頭発表
2. ○松井美紀、島弘季、武藤哲彦、松本光代、村山和隆、五十嵐和彦、「ヘムシグナルによる天然変性タンパク質Bach2の制御機構と生理学的意義の解明」生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 神戸、12月、2017年 口頭発表とポスター発表
3. ○松井(渡部)美紀、上島珠美、島弘季、末永知史、白水美香子、五十嵐和彦、村山和隆、「ヘム結合転写抑制因子Bach2の制御機構の解明」第16回日本蛋白質科学会年会、福岡 6月 2017年、ポスター発表
4. ○松井(渡部)美紀、島弘季、上島珠美、白水美香子、村山和隆、五十嵐和彦、「ヘムによる転写因子Bach2天然変性領域の制御機構の解明」第89回日本生化学会、仙台 9月 2017年、口頭発表

### 〔図書〕(計 1 件)

1. 松井(渡部)美紀、五十嵐和彦、羊土社「栄養による遺伝子制御のサイエンス・鉄代謝と遺伝子制御」、実験医学増刊、2016年9月増刊号、p77-82

〔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：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

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

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。