

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840040

研究課題名(和文)ヘムオキシゲナーゼ2の天然変性領域が介する新規酵素活性調節機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of heme oxygenase-2 activity elucidated by the analysis of structural dynamics

研究代表者

古川 亜矢子(Furukawa, Ayako)

横浜市立大学・生命医科学研究科・特任助教

研究者番号：90453050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳の血管拡張に関与するヘム分解酵素HO-2は、ヘム結合部位を含むコア構造領域とC末端側に特徴的な天然変性領域を有する。天然変性領域が無いと酵素活性が低下することを明らかにしていた。この酵素活性の違いを説明するために、動的構造解析を行った。その結果、C末端天然変性領域が構造領域と弱く相互作用していること、この相互作用している構造領域中の残基が大きく揺らいでいることが分かった。更に、C末端領域を含むHO2と含まないHO-2では、構造変化の速度が異なっていた。以上の結果から、C末端の天然変性領域が構造領域の動的構造を変化させ、この動的構造変化によって酵素活性が調節される機構が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Heme oxygenase-2 (HO-2) is composed of a structured region including the heme-binding site and a C-terminal disordered region. However, the C-terminal region's role in the activity is elusive and is difficult to explain by the crystal structure alone because it is disordered. We hypothesized that the C-terminal region transiently interacts with the structured region to regulate the structural dynamics responsible for the activity. To test this hypothesis, we have examined the enzyme activity and structural dynamics of two HO-2 constructs with (long HO-2) and without (short HO-2) the C-terminal region. Enzyme activity assay showed that long HO-2 had 1.5 times higher activity than short HO-2. To explain the difference in the enzyme activity, we performed PRE, R2 dispersion, and CLEANEX-PM experiments. The results of these experiments suggest that the change of the fluctuating mode by the interaction with the C-terminal disordered region regulates the HO-2 activity.

研究分野：構造生物学

キーワード：動的構造解析 酵素

1. 研究開始当初の背景

ヒトの脳は低酸素状態に陥ると短時間で障害を生じるため、脳の低酸素ストレス応答は正常に生命活動を営む上で重要な機能である。申請者は、脳に恒常発現する HO-2 が、酸素センサーとして低酸素ストレスに応答し、脳内血管拡張を制御していることを解明した (Morikawa et al. PNAS 2012)。血管拡張の鍵分子はシスタチオン合成酵素(CBS)が生成する H₂S であるが、定常状態では HO-2 が酸素とヘムを用いて CO を生成し、この CO が CBS による H₂S 生成を抑制するため血管は拡張されていない。しかし、低酸素状態では HO-2 の CO 生成量が低下し CBS による H₂S 生成が増加することで血管拡張が惹起され血流量が増す。そして、血中の酸素をできるだけ多く脳に供給することで低酸素状態からの逸脱を試みる。このように、ガス分子と酵素が制御する低酸素応答システムの構成要素は明らかになってきたが、酸素センサーとして重要な役割を果たす HO-2 そのものの酵素活性調節機構は不明な点が多い。

2. 研究の目的

HO-2 は小胞体膜結合タンパク質であり、ヘム結合領域を含む構造領域、C 末端側に 2 箇の Cys を含む天然変性領域、膜結合領域から成る。生体内には、HO-2 の様に構造領域と膜結合領域の間に天然変性領域を含む表面性膜タンパク質が多く存在する。しかしながら、この天然変性領域の機能についてはあまり解析がなされていない。HO も、古くから多数の結晶構造が報告されているが、C 末端領域は天然変性領域なため結晶構造のみでこの機能を説明することは困難であり、報告がない。そこで、HO-2 の C 末端の天然変性領域が酵素活性の制御に関与していることを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)野生型 HO-2(long HO-2)及び C 末端領域欠失変異体 HO-2(short HO-2)の動的構造解析

long HO-2, short HO-2 の動的構造解析を PRE, R₂ dispersion, CLEANEX-PM 法を用いて行う。

(2)HO-2 の in vitro における酵素活性の解析

酵素活性測定の方法は、HO-2 に Cytochrome P450 reductase、Biliverdin reductase、NADPH を添加し、基質としてヘミンを加え、ビリルビンの形成(dAbs = 470 - 530 nm)を UV/Vis 分光光度計でモニターする。

(3)In vivo での HO-2 酵素活性の測定法の確立

HO-2 及び HO-1 ノックアウトマウス由来の MEF 細胞に、レンチウイルスを用いて各種 HO-2 をトランスフェクションする。この細胞を使用して、酵素活性の定量方法を確立する。この細胞を使用して、酵素活性の定量方法を確立する。

4. 研究成果

初めに、C 末端領域を含む long HO-2 と含まない short HO-2 の酵素活性を比較した。その結果、long HO-2 は、short HO-2 より 1.5 倍酵素活性が高いことが分かった。この酵素活性の違いを説明するために、long HO-2 と short HO-2 の ¹⁵N-HSQC スペクトルを比較すると、各々の残基の化学シフト値に大きな違いは見られなかった。このことから、C 末端の天然変性領域が静的構造を変化させているとは考えにくい。次に HO-2 の動的構造を解析するために、PRE, R₂ dispersion, CLEANEX-PM 実験を実施した。PRE 実験から、C 末端天然変性領域が構造領域と弱く相互作用していることが分かった。また、short HO-2 の R₂ dispersion と CLEANEX-PM 実験から、構造領域の多くの残基は揺らいでいて、いくつかの残基は fold 状態と unfold 状態を遷移していることも分かった。PRE の結果と比較することによって、天然変性領域と相互作用している構造領域中の残基が揺らいでいることも分かった(Fig.1)。

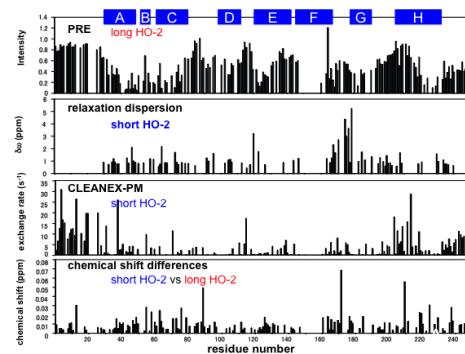


Fig.1 Structural dynamics of HO-2 (a)PRE (b) CLEANEX-PM (c) R₂ dispersion (d) chemical shift differences between long and short HO-2.

long HO-2 は R₂ dispersion の測定時間中に、不安定なためタンパク質が分解されてしまうという問題があった。そこで、申請者は短時間で R₂ dispersion を測定する NUS+SIFT 法を開発し、測定時間を 1/6 に短縮することができた。この手法を用いて、C 末端領域を含む long HO-2 の R₂ dispersion 実験を行った結果、short HO-2 と比較した。major 構造と minor 構造間変化を long HO-2 と short HO-2 で比較することで、minor 構造は似ていることが分かった。しかしながら、major 構造と minor 構造間の構造変化の速度は異なることが明らかとなった(Fig. 2)。更に詳細に解析することで、longHO-2 のみで揺らいでいる残基がいくつか存在し、そのいくつかはヘム結合領域付近の残基であった。

更に、longHO-2 と C 末端領域を含まない shortHO-2 の MD simulation を行った。いくつかの構造を抽出して比較すると、ヘム結合領

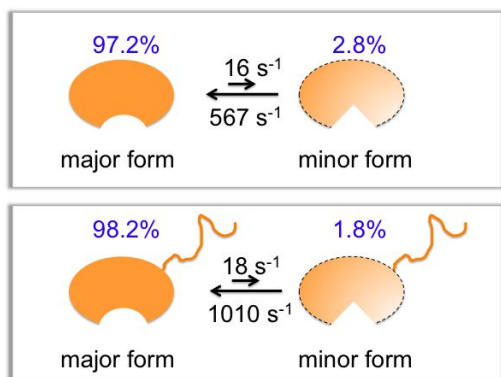


Fig.2 Different kinetics between longHO-2 and shortHO-2

域の開閉の頻度が異なるような傾向が得られ、longHO-2の方が構造領域の構造に多様性があることがわかった。これは、long HO-2のR2 dispersionの結果から構造変化が大きくなった残基が多く存在することと一致していた。以上の結果から、C末端の天然変性領域が酵素活性に重要な構造領域の動的構造を変化させ、更にこの動的構造変化によって酵素活性が調節されていることが強く示唆される。本研究では、NMRを用いてHO-2のC末端天然変性領域とヘム結合領域との弱い相互作用を検出した。一般的に、弱い相互作用は生化学的手法や結晶構造では解析が困難である。一方で、弱い相互作用による機能制御は様々なタンパク質で同定され始め、近年、注目されている。本研究で用いた手法は、弱い相互作用によるタンパク質の機能制御機構の解析に広く活用できると考える。

続いて、細胞内におけるHO-2C末端領域の酵素活性への寄与を解析するための細胞の作製を行った。HO-2ノックアウトマウス由来のMEF細胞に、レンチウイルスを用いて野生型HO-2とC末端の天然変性領域だけを欠失させた変異型HO-2を過剰発現させた細胞を作製した。しかし、基質であるヘミンを細胞にかけるとHO-2のアイソザイムであるHO-1が誘導されてくるため、野生型と変異型の酵素活性の比較することができなかった。そこで、HO-1/HO-2のコンディショナルダブルノックアウトマウスからCreを用いてHO-1/HO-2ダブルノックアウトMEF細胞を作製した。その後、この細胞に野生型HO-2と変異型HO-2を過剰発現させた細胞も作製した。この細胞に対して、ヘミンへの耐性を調べた結果、数日するとヘミンへの耐性を持った細胞だけが増殖し、HO-1/HO-2がダブルノックアウトされていない細胞が混ざっていたことが分かった。そこで、シングルセルクローニングにより完全にHO-1/HO-2をダブルノックアウトしたMEF細胞を作製した。完全にノックアウトされた細胞に野生型HO-2と変異型HO-2を過剰発現させた細胞

を作製した。これらの細胞をヘミンを含む培地で数時間培養し、ヘミンに対する耐性濃度や細胞増殖率などを比較した。MEF細胞を不死化しているため、普通の細胞よりもヘミンへの耐性濃度が高いことが分かった。また、ヘミンの分解効率を調べるために、HPLCやNMRを用いて細胞内に残ったヘミンの定量解析方法などの検討を行った。

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1件)

1. Furukawa A., Konuma T., Yanaka S., Sugase K., "Quantitative analysis of protein-ligand interactions by NMR", *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 査読有り, 96, p47-57 (2016) DOI: 10.1016/j.pnmrs.2016.02.002

〔学会発表〕(計2件)

1. Furukawa A., Sugase K. "Heme-oxygenase 2 activity regulated by the C-terminal intrinsically disordered region" The 11th Japan-Korea Bilateral Symposium on Biological NMR 阪大蛋白研 (大阪府・吹田市) 2014年12月19日

2. Furukawa A., "Regulation of heme oxygenase-2 activity elucidated by the analysis of structural dynamics" International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems 2014年08月25日 (Dallas, USA)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

古川 亜矢子 (Ayako Furukawa)

横浜市立大学・生命医科学研究科・特任助教

研究者番号：90453050

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()