

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01825

研究課題名(和文) 生体内遊離ヘムの濃度測定と動態解析

研究課題名(英文) Development of heme oxygenase-1-based heme sensor for quantifying free heme in biological samples

研究代表者

坂本 寛 (Sakamoto, Hiroshi)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究者番号：70309748

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)：ヘムはヘムタンパク質の補欠分子族として種々の生体反応に関与する一方で、タンパク質と結合していない遊離ヘムが様々な生理活性や疾患に関わっている。我々はこれまでに、ヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)に蛍光団を導入したヘム特異的センサーを開発し、ラット肝ミクロソーム画分中の遊離ヘムの定量を試みたが、遊離ヘムが生体物質に非特異的に吸着されることが示唆された。そこで、界面活性剤等を用いた遊離処理方法を検討した。また、HO-1と蛍光蛋白質との融合タンパク質を発現・精製し、ヘムセンサーとしての有用性を検討するとともに、この融合タンパク質を培養細胞内に発現し、細胞内遊離ヘムの定量に向けた基礎的な検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Free heme, the protein-unbound form of heme, participates in a number of physiological events as both a regulatory molecule and a prooxidant species. We previously developed a method for quantifying free heme using fluorescently labeled rat heme oxygenase-1 as a heme sensor. However, quantification of free heme in rat liver microsomal fraction was disturbed by non-specific adhesion of free heme to biomolecules in the sample. To resolve the issue, we investigated the effects of several surfactants on the heme quantification. We also prepared six fluorescent protein-fused rHO-1s and characterized their heme-sensing properties. Among them, three fluorescent protein fusions linked to the N terminus of rHO-1 showed a stoichiometric fluorescent response during titration with heme. Further characterization for intracellular heme detection was performed.

研究分野：生物化学

キーワード：ヘム センサー 生体分子 酵素 計測

1. 研究開始当初の背景

(1) 遊離ヘムに関する研究動向と位置づけ
ヘムは生体にとって必須な色素で、ヘム蛋白質に結合して様々な生理機能を担っている。一方遊離ヘムは、活性酸素の発生源となるため有害といわれてきたが、近年、遊離ヘムが細胞内の働きを制御していることや、癌などの疾病とも関係していることが明らかにされ、その動態解明は病気の診断や治療につながると期待されている。また、ヘムの分解物のビリルビンと一酸化炭素には、それぞれ抗酸化作用と抗炎症作用があり、細胞保護的に働くことが知られている。しかし、微量のヘムを正確に測定する方法がなかったため、遊離ヘムの細胞内濃度さえ未だ知られていない。また、遊離ヘムの仮想的な貯蔵場所として「ヘムプール」が想定されているが、それが細胞のどこにあるかなどの遊離ヘムの動態についても明らかにされていないことが多い。

(2) ヘムセンサーの開発経緯

研究代表者の坂本は、これまでヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の生化学的および構造生物学的研究を行ってきた。HO-1はヘムを分解して、鉄、ビリベルジン(ビリルビン前駆体)、一酸化炭素を生成する。還元剤が存在しない場合、HO-1はヘムと安定な複合体を形成する。そこで、HO-1にヘム吸収帯と重なる波長域を有する蛍光団を導入すれば、ヘム結合に伴う構造変化およびヘムへのエネルギー移動により蛍光の強度が変化し、ヘムセンサーとなり得ると着想し、ラット HO-1 (rHO-1) を母体とした蛍光ラベル化蛋白質を作製した(図1)。このセンサーのヘムに対する蛍光強度減少は非常に鋭敏で、細胞内ヘム濃度の最小予想域である 1~100 nM の範囲でヘムを測定することができた(特許願 2009, 2010, *Anal. Biochem.* **433**, 2-9, 2013)。その後改良を重ね、ヘム分解活性を持たず、野生型 HO-1 より 10 倍高親和性 ($K_d = 0.15$ nM) で、生体に多く含まれる紫外部に蛍光を有する物質からの妨害を受けにくいセンサー (K18C/D140H-Alexa555) を開発した (*Anal. Biochem.* **489**, 50-52, 2015)。

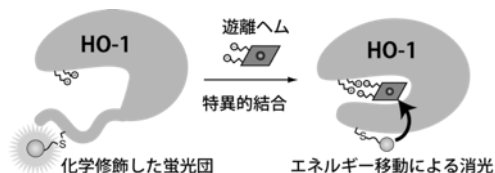


図1. 蛍光ラベル化 HO-1 を用いたヘムセンサー

2. 研究の目的

(1) ヘム特異的センサーを利用した生体サンプル中のヘム定量法の検討

細胞内遊離ヘムはその濃度によって様々な生理活性(転写調節因子 Bach1 の DNA への結合の抑制, ヘム合成酵素の抑制, ヘム分解酵素の誘導など)を有するが、高濃度で活性

酸素種を産生しヘムタンパク質の崩壊を助長することでさらに遊離ヘムがさらに過剰になるという悪循環に陥り、最終的に様々な疾病を引き起こすことが示唆されている。それゆえ生体内のヘム濃度を正確に測定することが急務となっているが、既存のヘム定量法では生体内遊離ヘムを測定することは非常に困難である。我々は以前、遊離ヘムと特異的に結合するラットヘムオキシゲナーゼ 1 に変異を加え蛍光団を導入したヘム特異的センサーを開発した。しかしヘムセンサーを利用してラット肝ミクロソーム中の遊離ヘムの定量を試みたところ、遊離ヘム検出量が極めて低く、遊離ヘムがサンプル中の生体物質に非特異的に吸着していることが示唆された。本研究では非特異的に吸着したヘムの遊離処理を検討し、生体サンプル中のヘム定量を試みた。

(2) 細胞内の遊離ヘムの定量に向けた蛍光蛋白質融合型バイオプローブの開発

組換え蛋白質を化学的に修飾したヘムセンサーは細胞膜を透過できないことから、細胞内の遊離ヘム濃度の変動や局在を評価する上で問題を抱えていた。rHO-1 と蛍光蛋白質をコンジュゲートした融合タンパク質をバイオプローブとして細胞内に発現させ、細胞内における *in situ* での遊離ヘムの定量及びイメージングに向けた基礎的な検討を行った。融合させる蛍光蛋白質は、rHO-1 と基質であるヘムが結合したホロ型 rHO-1 に特有の吸収帯と重複する蛍光波長をもつ、BFP, EGFP, hmKO2 を選択した。上記 3 種類の蛍光蛋白質が HO-1 の N 末端と C 末端にタンデムに融合した蛋白質 6 種類を精製し、機能を検討していくことにした(図2)。

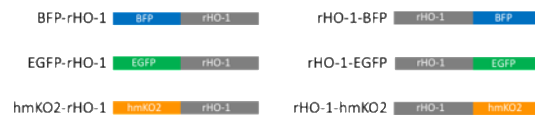


図2. 蛍光蛋白質融合型バイオプローブの一次構造。

3. 研究の方法

生体サンプル共存下ヘムセンサー溶液へのヘミン滴定: ラット肝ミクロソーム画分を含む 50 nM ヘムセンサー溶液を加えた蛍光測定用石英セルに、ヘミンを 0.1 当量ずつ滴定し、滴定毎に蛍光分光光度計で蛍光スペクトルを測定した。

カオトロピック・界面活性剤のヘムタンパク質への影響: ヘムタンパク質のモデルとしてヒトヘモグロビン (hHb) を用いた。カオトロピックはヨウ化カリウム (KI) と塩化グアニジニウム (GdmCl), 界面活性剤はドデシル硫酸ナトリウム (SDS) と塩化ベンザルコニウム (BZC), Tween20 を用いた。各終濃度の薬剤共存下 2 μ M hHb をヘムセンサー溶液が入った蛍光測定用セルに滴下し、滴定毎に蛍光分光光度計で蛍光スペクトルを測定した。そ

の後、565 nm における蛍光強度の減少量からヘム濃度を検量線によって算出した後、hHb サンプルに含まれる総ヘム量で除すことで hHb 変性率を求めた。

Tween20 を利用した生体サンプルのヘム定量：各終濃度 (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 [w/v %]) の Tween20 ラット肝ミクロソーム画分を 50 nM ヘムセンサー溶液を含む蛍光測定用セルに滴定し、蛍光分光光度計で 565 nm の蛍光強度変化から算出したヘム濃度を求めた。さらに、各終濃度 (0.05, 0.1, 0.2, 1.0, 2.0 [w/v %]) Tween20 共存下ヘムセンサーにミクロソーム画分を滴定し、565 nm の蛍光強度減少量から各終濃度 Tween20 共存下ヘムセンサーのヘミン検量線を基にミクロソーム画分のヘム濃度を算出した。

融合タンパク質の発現・精製：コンストラクトとして EGFP-rHO-1/pET21b, BFP-rHO-1/pET21b, hmKO2-rHO1/pET21b を作製し、大腸菌 BL21 (DE3) 株内で発現させた後、硫酸分画および陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した。

ヘミン滴定：紫外-可視スペクトル測定において、蛍光蛋白質融合型 rHO-1 がヘムと複合体を形成するか確認した。また、蛍光強度の変化 (蛍光消光) を測定し、蛍光蛋白質融合型 rHO-1 のヘムセンサーとしての有用性を評価した。

EGFP-D140H の細胞内での機能評価：rHO-1 のヘム分解活性を消失させる変異 (D140H) を導入した EGFP-D140H を COS-7 細胞内で一過性発現させた後、ヘムの生合成を亢進する 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) で細胞を処理し、ライセート中の蛍光消光と総ヘムを測定した。また、5-ALA で処理した細胞の蛍光強度変化を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。

EGFP-D140H の安定発現株の作製：COS-7 細胞に EGFP-D140H/ pcDNA3.1D-V5-His-TOPO をトランスフェクションした後、G418 で選択圧をかけながら培養し、EGFP-D140H を安定に発現する細胞株を作製した。36 日間培養した後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で確認した。

4. 研究成果

遊離ヘムの生体物質への非特異的な吸着：生体サンプル中のヘムが、生体物質に非特異的に吸着して存在するかどうかを確認するためにラット肝ミクロソーム画分共存下ヘムセンサー溶液に遊離ヘムとしてのヘミンを滴下した。結果として、ヘムセンサー溶液にミクロソーム画分を含まないときの 565 nm の蛍光強度減少量より小さかった。この結果は、遊離ヘムとしてのヘミンがヘムセンサーにすべてヘムセンサーに結合するのではなく、ミクロソーム画分由来の生体物質に非特異的に結合していることが原因である。つまり本測定用いたラット肝ミクロソーム画分内のヘムは特異結合型ヘム、遊離ヘムだけでなく、生体

物質 (細胞外マトリクス, 非ヘムタンパク質, 細胞骨格など) に非特異的に吸着しているヘムが存在していると考えられる。また、非特異的に吸着したヘムは遊離ヘムと同様に活性酸素を産生する能力を有していることから、病理的観点で測定対象とすべきである。

界面活性剤およびカオトロピック剤のヘム蛋白質への影響：ヘムセンサーで生体サンプル中の非特異的に吸着したヘムと遊離ヘムを選択的に測定するために、界面活性剤とカオトロピックを用いた検討を行った (図 3)。カオトロピックは hHb に共存させる濃度が高いと変性作用を示した。また、イオン性界面活性剤の SDS, BZC においても hHb の変性作用を示した。この結果は、hHb 内相互作用に影響を与えていることが原因と考えられる。一方で、非イオン性界面活性剤の Tween20 では濃度に関わらず hHb の変性がみられなかった。Tween20 はタンパク質に影響を及ぼす効果はほとんどないことから、ヘムタンパク質に影響を与えず、選択的に非特異的に吸着したヘムを遊離できる可能性が示唆された。

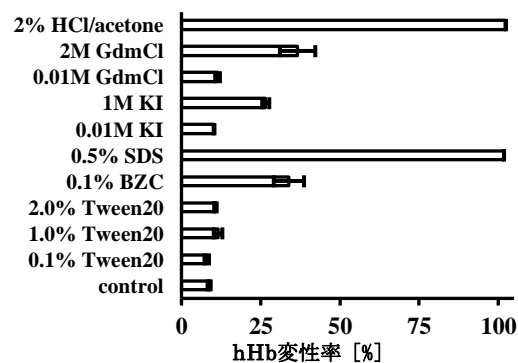


図3. カオトロピック剤および界面活性剤共存下 hHb の変性率。滴定 10 μ L ごとに 565 nm の蛍光強度減少量から実験 2.1 のヘミン検量線を利用して各界面活性剤共存下 hHb 中のヘム濃度を算出し、サンプル中の理論的総ヘム量で除して hHb 変性率を算出。

Tween20 共存下ラット肝ミクロソームのヘム定量：Tween20 を利用してラット肝ミクロソーム画分のヘム定量を行った。Tween20 共存下ヘムセンサー溶液にミクロソーム画分を滴定したところ、ヘム検出が困難であった。これは、Tween20 によるヘムセンサーのヘム親和性の低下が原因であると考えられる。一方で Tween20 共存下ミクロソームをヘムセンサー溶液に滴下することでヘム定量したところ、Tween20 濃度依存のヘム検出量増加はみられなかったが、未処理に比べて 2.0 倍ヘム検出量が増加した (図 4)。以上の結果から、Tween20 と生体サンプルを共存させた方法により病態形成に関わるヘム検出ができると考えられる。

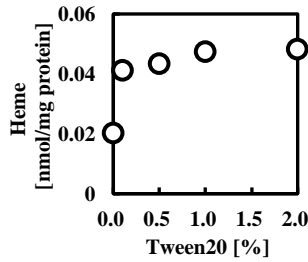


図4. 各終濃度 Tween20 共存下マイクロソーム中のヘム濃度. 50 nM ヘムセンサー溶液 2 mL に各終濃度 (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 [w/v %]) の Tween20 共存下マイクロソーム画分を 5 μ L ずつ滴定. 滴定 10 μ L ごとに 565 nm の蛍光強度減少量から実験 2.1 のヘミン検量線を利用してヘム濃度を算出.

蛍光蛋白質融合型バイオプローブへのヘミン滴定: rHO-1 の C 末端に蛍光蛋白質を融合すると, ヘムと複合体を形成するものの, 蛍光蛋白質からヘムへの蛍光共鳴エネルギー移動に起因する蛍光消光を示さなかった. 一方, rHO-1 の N 末端に蛍光蛋白質を融合すると, ヘムと複合体を形成し, なおかつヘム濃度依存的な蛍光消光を起こすことが明らかとなった (図 5). 非線形カーブフィッティングにより得られた K_d 値はそれぞれ, BFP-rHO-1: 9.58 ± 3.06 (nM), EGFP-rHO-1: 0.81 ± 0.24 (nM), BFP-rHO-1: 1.108 ± 0.45 (nM) と求められた.

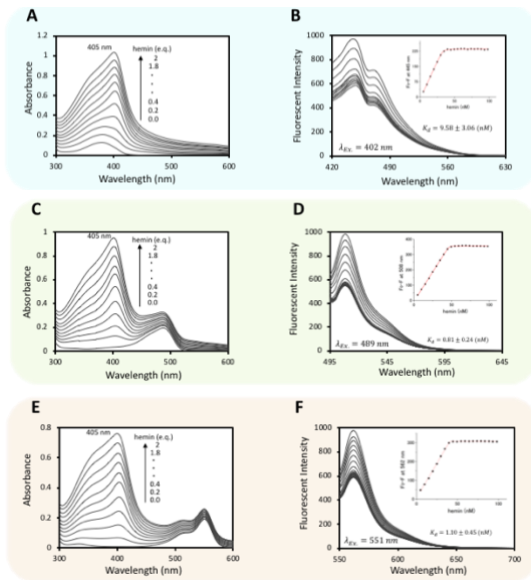


図5. ヘミン滴定における吸収スペクトル測定と蛍光スペクトル測定. 吸収スペクトル: (A) BFP-rHO-1, (C) EGFP-rHO-1, (E) hmKO2-rHO-1, 蛍光スペクトル: (B) BFP-rHO-1, (D) EGFP-rHO-1, (F) hmKO2-rHO-1. 融合蛋白質溶液とヘミン溶液は 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) で希釈して調製された. 吸収スペクトルは 6 μ M の融合蛋白質溶液に 0.6 mM のヘミンを滴定して測定された. 蛍光スペクトルは 50 nM の融合蛋白質溶液に 5 μ M のヘミンを滴定して測定された. BFP-rHO-1 は λ_{Ex} = 402 nm, λ_{Em} = 443 nm, EGFP-rHO-1 は λ_{Ex} = 489 nm, λ_{Em} = 508 nm, hmKO2-rHO-1 は λ_{Ex} = 551 nm, λ_{Em} = 562 nm を使用した. 挿入図は各蛍光波長における蛍光強度差をブ

ロットした.

蛍光蛋白質融合型バイオプローブの細胞内での機能評価: COS-7 細胞を播種して 12 時間後に EGFP-D140H をトランスフェクションし, 24 時間後に 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) で処理した. 5-ALA で処理して 24 時間に細胞を回収し, ウェスタンブロット及び蛍光スペクトル測定, ヘミン滴定を行った. 5-ALA の処理の有無にかかわらず, EGFP-D140H は細胞内で発現していること, 5-ALA により細胞内のヘムの合成が亢進されていること, 細胞内ヘム合成の亢進を EGFP-D140H が検知できていることがわかった (図 6).

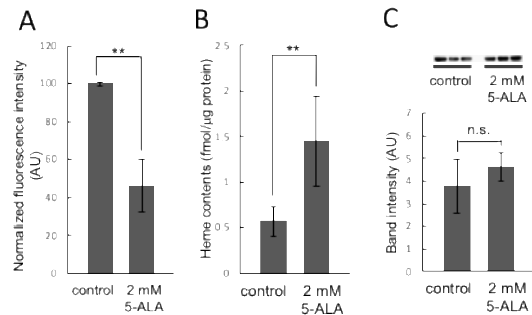


図6. COS-7 細胞で発現している EGFP-D140H のヘム合成効果. (A) 5-ALA で処理した COS-7 細胞のライセートにおける蛍光強度. 細胞は 0, 2 mM の 5-ALA で処理され, λ_{ex} = 478 nm, λ_{em} = 509 nm で測定された. (B) ヘミンアッセイ. 細胞は 0, 2 mM の 5-ALA で処理され, 市販の Hemin Assay Kit を用いて定量された. (C) EGFP-D140H の発現. 上段: EGFP-D140H を発現している COS-7 細胞のウェスタンブロット. anti-EGFP-HRP 抗体で可視化された. 下段: バンド定量. **, $p < 0.05$; n.s., not significant.

蛍光顕微鏡を用いた細胞内遊離ヘムの可視化: EGFP-D140H を COS-7 細胞内で一過性発現させ, 48 時間後に終濃度 0, 2 mM の 5-ALA で細胞を処理し, 共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて蛍光強度の変化を観察したところ, 蛍光強度が減少する傾向が見られた (図 7). これにより, EGFP-D140H は細胞内の遊離ヘムの動態の追跡に応用できると期待される.

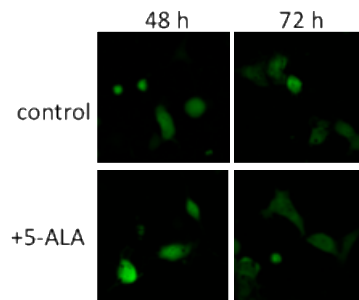


図7. EGFP-rHO-1 を一過性発現している COS-7 細胞. 左上: 未処理, トランスフェクション後 48 時間, 右上: 未処理, トランスフェクション後 72 時間, 左下: 2 mM 5-ALA 処理, トランスフェクション後 48 時間, 右下: 2 mM 5-ALA 処理, トランスフェクション後 72 時間.

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 4 件)

- ① Taira, J., Ito, T., Nakatani, H., Umei, T., Baba, H., Kawashima, S., Maruoka, T., Komatsu, H., Sakamoto, H., Aoki, S. "In silico structure-based drug screening of novel antimycobacterial pharmacophores by DOCK-GOLD tandem screening" *International Journal of Mycobacteriology* (2017) **6**, 142-148. 査読有
DOI: 10.4103/ijmy.ijmy_24_17
- ② Taira, J., Morita, K., Kawashima, S., Umei, T., Baba, H., Maruoka, T., Komatsu, H., Sakamoto, H., Sacchettini, J.C., Aoki, S. "Identification of a novel class of small compounds with anti-tuberculosis activity by in silico structure-based drug screening" *Journal of Antibiotics* (2017) **70**, 1057-1064. 査読有
DOI: 10.1038/ja.2017.106
- ③ Taira, J., Kida, Y., Inatomi, K., Komatsu, H., Higashimoto, Y., Sakamoto, H., "Phosphorylation of clustered serine residues in the N-terminus of BPS domain negatively regulates formation of the complex between human Grb14 and insulin receptor" *Journal of Biochemistry* (2017) **162**, 113-122. 査読有
DOI: 10.1093/jb/mvx007
- ④ Taira, J., Nakashima, Y., Yoshihara, S., Koga, S., Sueda, S., Komatsu, H., Higashimoto, Y., Takahashi, T., Tanioka, N., Shimizu, H., Morimatsu, H., Sakamoto, H., "Improvement of heme oxygenase-1-based heme sensor for quantifying free heme in biological sample" *Analytical Biochemistry* (2015) **489**, 50-52. 査読有
DOI: 10.1016/j.ab.2015.08.004

[学会発表] (計 25 件)

- ① 中島音海, 平 順一, 松田祥子, 小松英幸, 坂本寛「細胞内の遊離ヘムの定量に向けたタンパク質性バイオプローブの開発」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 (ポートアイランドホテル, 神戸) 2017 年 12 月 8 日
- ② 吉村崇志, 中島幸徳, 平 順一, 小松英幸, 谷岡野人, 清水裕子, 森松博, 坂本寛「ヘム定量における非特異的に吸着したヘムの遊離処理法の検討」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 (ポートアイランドホテル, 神戸) 2017 年 12 月 8 日
- ③ 平 順一, 中島音海, 小松英幸, 坂本寛「Development of Rat Heme Oxygenase-1 Based Gene Encoded Heme Probe for Intracellular Heme Detection」第 54 回ペプチド討論会 (大阪府立大学中百舌鳥キャンパス, 堺市) 2017 年 11 月 20 日
- ④ 平 順一, 中島音海, 小松英幸, 坂本寛「HO-1 と EGFP 融合タンパク質の細胞内遊離ヘムプローブとしての機能評価」第 41 回蛋白質とその構造と機能に関する九州シンポジウム (休暇村南阿蘇, 熊本) 2017 年 9 月
- ⑤ 松田和也, 平 順一, 小松英幸, 坂本寛「ヘム分解関連酵素間の複合体形成由来の分子内 FRET を利用したヘムプローブの開発」第 54 回化学関連支部合同九州大会・外国人研究者交流国際シンポジウム (北九州国際会議場, 北九州市) 2017 年 7 月 1 日
- ⑥ 池永康幸, 平 順一, 小松英幸, 坂本寛「高ヘム親和性血漿タンパク質へモペキシンを用いたヘムセンサーの開発」第 54 回化学関連支部合同九

州大会・外国人研究者交流国際シンポジウム (北九州国際会議場, 北九州市) 2017 年 7 月 1 日

- ⑦ 松本準, 平 順一, 小松英幸, 坂本寛「Heme oxygenase-1 を基盤としたヘムセンサーによる生体サンプル中のヘムの精密定量及び既存の高感度検出法との比較」第 54 回化学関連支部合同九州大会・外国人研究者交流国際シンポジウム (北九州国際会議場, 北九州市) 2017 年 7 月 1 日
- ⑧ 相良達哉, 平 順一, 杉島正一, 小松英幸, 坂本寛「沈降平衡法による heme oxygenase-1 と NADPH-cytochrome P450 reductase の相互作用解析」平成 29 年度日本生化学会九州支部例会 (宮崎大学清武キャンパス, 宮崎市)
- ⑨ 松田和也, 中島音海, 松田祥子, 平 順一, 小松英幸, 坂本寛「細胞内ヘム定量に向けた蛍光蛋白質とラットヘムオキシゲナーゼ-1 の融合蛋白質の機能評価」平成 29 年度日本生化学会九州支部例会 (宮崎大学清武キャンパス, 宮崎市)
- ⑩ 吉田圭佑, 平 順一, 小松英幸, 坂本寛「CK2 と GSK-3 による共役的な Grb14BPS ドメインのリン酸化は Grb14-インスリン湯様態の複合体形成に影響を与えるか」平成 29 年度日本生化学会九州支部例会 (宮崎大学清武キャンパス, 宮崎市)
- ⑪ 吉村崇志, 中島幸徳, 平 順一, 小松英幸, 谷岡野人, 清水裕子, 森松博, 坂本寛「ラット肝ミクロソーム中のヘム定量における非特異的ヘム吸着とその遊離処理の検討」第 23 回日本生物工学会九州支部飯塚大会 (九州工業大学飯塚キャンパス, 飯塚市) 2016 年 12 月 03 日
- ⑫ 中島音海, 平 順一, 小松英幸, 末田慎二, 坂本寛「細胞内ヘム動態の検出に向けた新規バイオプローブの開発」第 23 回日本生物工学会九州支部飯塚大会 (九州工業大学飯塚キャンパス, 飯塚市) 2016 年 12 月 03 日
- ⑬ 吉村崇志, 中島幸徳, 平 順一, 小松英幸, 谷岡野人, 清水裕子, 森松博, 坂本寛「Effect of Surfactants on Quantification of Heme in Biological Samples Using Heme Sensor Based on Fluorescently Labeled Heme Oxygenase-1」第 53 回ペプチド討論会 (京都テルサ, 京都市) 2016 年 10 月 26 日~28 日
- ⑭ 中島音海, 平 順一, 小松英幸, 末田慎二, 坂本寛「Development of Fluorescence Protein Fused Heme Oxygenase-1 as Intracellular Free Heme Detection Probe」第 53 回ペプチド討論会 (京都テルサ, 京都市) 2016 年 10 月 26 日~28 日
- ⑮ 吉村崇志, 中島幸徳, 平 順一, 小松英幸, 末田慎二, 谷岡野人, 清水裕子, 森松博史, 坂本寛「ヘム特異的センサーを利用した生体サンプル中の非特異的に吸着したヘムの定量」第 53 回化学関連支部合同九州大会 (北九州国際会議場, 北九州市) 2016 年 07 月 02 日
- ⑯ 相良達哉, 平 順一, 杉島正一, 小松英幸, 坂本寛「ヘムオキシゲナーゼ-1 とシトクロム P450 還元酵素の相互作用の超遠心解析」第 53 回化学関連支部合同九州大会 (北九州国際会議場, 北九州市) 2016 年 07 月 02 日
- ⑰ 中島音海, 平 順一, 小松英幸, 末田慎二, 坂本寛「細胞内遊離ヘム検出における蛍光蛋白質融合型 heme oxygenase-1 の評価」第 53 回化学関連支部合同九州大会 (北九州国際会議場, 北九州市) 2016 年 07 月 02 日
- ⑱ 杉島正一, 平 順一, 佐藤秀明, 野口正人, 山本健, 坂本寛「NADPH-シトクロム P450 還元酵素からヘムオキシゲナーゼへの電子移動反応の生化学的検討」第 16 回日本蛋白質学会年会 (福岡国際会議場, 福岡市) 2016 年 06 月 7 日~9 日
- ⑲ 吉村崇志, 中島幸徳, 平 順一, 小松英幸, 末田慎二, 谷岡野人, 清水裕子, 森松博史, 坂本寛「生体サンプル中のヘム定量における非特異結合型ヘム遊離処理の検討」平成 28 年度日本生化学

学会九州支部例会（鹿児島大学郡元キャンパス、鹿児島市）2016年05月14日～15日

- ② 中島音海, 平 順一, 小松英幸, 末田慎二, 坂本寛「蛍光蛋白質融合型 heme oxygenase-1 の発現・精製とヘムセンサーとしての応用に向けた検討」平成 28 年度日本生化学会九州支部例会（鹿児島大学郡元キャンパス、鹿児島市）2016 年 05 月 14 日～15 日
- ③ Shinya Koga, Yukinori Nakashima, Yuichiro Higashimoto, Shinji Sueda, Hideyuki Komatsu, Junichi Taira, Hiroshi Sakamoto, “Quantification of free heme by using a sensor based on fluorescently labeled heme oxygenase-1” 2015 環太平洋国際化学会議 (PACIFICHEM 2015) (ホノルル, ハワイ, 米国) 2015 年 12 月 15 日～20 日
- ④ 平 順一, 和田翔太, 福嶋祐也, 末田慎二, 小松英幸, 東元祐一郎, 坂本 寛「Surface Plasmon Resonance Study on the Interaction between the N-terminal Region of Heme Oxygenase-2 and NADPH-Cytochrome P450 Reductase」第 52 回ペプチド討論会（平塚市中央公民館, 平塚）2015 年 11 月 16 日～2015 年 11 月 18 日
- ⑤ 杉島正一, 平 順一, 佐藤秀明, 野口正人, 山本健, 坂本 寛「大きな構造変化を伴うシトクロム P450 還元酵素からヘムオキシゲナーゼへの電子伝達機構」平成 27 年度日本結晶学会年会（大阪府立大学中百舌鳥キャンパス, 堺市）2015 年 10 月 17 日～18 日
- ⑥ 平 順一, 中島幸徳, 義原 俊, 古賀真也, 末田慎二, 小松英幸, 東元祐一郎, 坂本 寛「ヘムオキシゲナーゼ-1 を基盤としたヘムセンサーによる生体試料中の遊離ヘムの定量」平成 27 年度日本生化学会九州支部例会（九州大学箱崎キャンパス, 福岡）2015 年 05 月 16 日～17 日

〔図書〕（計 6 件）

- ① Taira, J., Nakashima, O., Komatsu, H., and Sakamoto, H. “Development of Rat Heme Oxygenase-1 Based Gene Encoded Heme Probe for Intracellular Heme Detection” in *Peptide Science 2017* Fujii, I. (Ed.), The Japanese Peptide Society, pp. 156-157, 2018. ISBN: 978-4-931541-184
- ② Nakashima, O., Taira, J., Komatsu, H., Sueda, S., and Sakamoto, H. “Development of Fluorescence Protein Fused Heme Oxygenase-1 as Intracellular Free Heme Detection Probe” in *Peptide Science 2016* Akaji, K. (Ed.), The Japanese Peptide Society, pp. 181-182, 2017. ISBN: 978-4-931541-177
- ③ Yoshimura, T., Nakashima, Y., Taira, J., Komatsu, H., Tanioka, N., Shimizu, H., Morimatsu, H., and Sakamoto, H. “Effect of Surfactants on Quantification of Heme in Biological Samples Using Heme Sensor Based on Fluorescently Labeled Heme Oxygenase-1” in *Peptide Science 2016* Akaji, K. (Ed.), The Japanese Peptide Society, pp. 177-178, 2017. ISBN: 978-4-931541-177
- ④ Taira, J., Inatomi, K., Komatsu, H., and Sakamoto, H. “Phosphorylation of Serine Residues in Grb14 BPS Domain Involves in the Complex Forming of Grb14 with Insulin Receptor” in *Peptide Science 2016* Akaji, K. (Ed.), The Japanese Peptide Society, pp. 175-176, 2017. ISBN: 978-4-931541-177
- ⑤ 安藤祥司, 熊本栄一, 坂本 寛, 弟子丸正伸「ライフサイエンスのための化学」化学同人, 発行日: 2017 年 1 月 10 日 ISBN: 978-4-7598-1827-7

- ⑥ Taira, J., Wada, S., Fukushima, Y., Sueda, S., Komatsu, H., Higashimoto, Y., and Sakamoto, H. “Surface Plasmon Resonance Study on the Interaction between the N-terminal Region of Heme Oxygenase-2 and NADPH-Cytochrome P450 Reductase” in *Peptide Science 2015* Hojo, H. (Ed.), The Japanese Peptide Society, pp. 157-156, 2016. ISBN: 978-4-931541-16-0

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
○取得状況（計 1 件）
名称：金属プロトポルフィン錯体の定量方法およびそれに用いる酵素センサー
発明者：坂本 寛, 古賀真也, 小松英幸
権利者：国立大学法人九州工業大学
種類：特許
登録番号：05761660
取得年月日：2015 年 06 月 19 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 寛 (SAKAMOTO, Hiroshi)
九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授
研究者番号：70309748

(2) 研究分担者

平 順一 (TAIRA, Junichi)
九州工業大学・大学院情報工学研究院・助教
研究者番号：20549612

小松 英幸 (KOMATSU, Hideyuki)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・准教授
研究者番号：90253567

(3) 連携研究者

末田 慎二 (SUEDA, Shinji)
九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授
研究者番号：00325581

東元 祐一郎 (HIGASHIMOTO, Yuichiro)

久留米大学・医学部・教授
研究者番号：40352124

森松 博史 (MORIMATSU, Hiroshi)

岡山大学・医学部・教授
研究者番号：30379797

清水 裕子 (SHIMIZU, Hiroko)

岡山大学・医学部・客員研究員
研究者番号：80423284

近澤 征史朗 (CHIKAZAWA, Seishiro)

北里大学・獣医学部・助教
研究者番号：80566547

菅井 学 (SUGAI, Manabu)

福井大学・医学部・教授
研究者番号：90303891