

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07011

研究課題名(和文)膜結合性ヘムタンパク質PGRMC1の構造的制御による生理機能の解明

研究課題名(英文)Analysis of functional regulation of PGRMC1

研究代表者

加部 泰明 (Kabe, Yasuaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：20397037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規のガス応答性因子として同定した膜タンパク質タンパク質PGRMC1の構造的機能制御の解明を行った。X線結晶構造解析により、PGRMC1はチロシン残基のヘム配位によって、突出したヘム同士が重なり合った特異な重合体構造を形成することを見出し、生体内ガスCOがこの重合が解離してPGRMC1の機能を阻害することを見出した。PGRMC1はがん細胞内のヘム濃度に応答して重合化することにより活性化し、がん増殖に関わるEGFRと会合してがん増殖シグナルを増強するという、ダイナミックな構造変換によって機能することを明らかとした(Nature Commun 2017)。

研究成果の概要(英文)：Progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) is a haem-containing protein that interacts with epidermal growth factor receptor (EGFR) and cytochromes P450 to regulate cancer proliferation and chemoresistance; its structural basis remains unknown. Crystallographic analyses revealed that PGRMC1 forms a stable dimer through stacking interactions of two protruding haem molecules. The haem iron is five-coordinated by Tyr113. Haem-mediated PGRMC1 dimerization is required for interactions with EGFR and cytochromes P450, cancer proliferation and chemoresistance against anti-cancer drugs. This study demonstrates protein dimerization via haem-haem stacking, which has not been seen in eukaryotes, and provides insights into its functional significance in cancer.

研究分野：生物学

キーワード：ヘム がん増殖 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

これまでに研究代表者は、ナノスケールの担体を用いた独自のアフィニティ精製技術の開発を行い、薬剤やホルモンなどの低分子化合物に選択的に結合するタンパク質の精製システムを確立してきた ([Chemical Biology /Chemical Genetics] Wiley press, 2009)。この精製技術を応用して、ヘムに選択的に結合するタンパク質群の網羅的な探索を行っており、多くの新規ヘム標的タンパク質を介した未知の生理作用の解明に成功してきた (J.Biol.Chem. 2006, PLoS ONE. 2009)。これらの解析の一環として、膜結合性のヘムタンパク質 PGRMC1 (progesterone receptor membrane associated component) を同定している (図1)。PGRMC1 は、progesterone が結合する膜タンパク質として同定され、N 末端側に一回膜貫通領域、中央部の細胞質領域に cytochrome b5 に相同性のあるヘム結合モチーフが存在する。PGRMC1 の分子構造や機能的制御については全く明らかとなっていない。研究代表者は、X 線結晶構造解析によるヘム結合型 PGRMC1 の分子構造の解明に成功している。PGRMC1 は Tyr113 残基を介した 5 配位構造によりヘムを認識し、さらにタンパク質中の突出したヘム分子同士が会合する特異な heme-stacking 構造を形成することを見出した。さらに生化学的な解析から、ヘムの結合しない apo-PGRMC1 は monomer で存在するが、heme-stacking による dimer 構造を形成した PGRMC1 は EGFR や cytochrome P450 (CYP51) などと相互作用して活性化し、癌細胞の増殖を促進することを見出している (Nature Commun, 2016)。このように PGRMC1 は新たな創薬標的となる事が期待されるが、癌以外の生理機能についてはほとんど明らかとなっていない事が課題となっている。本申請では以下に示す PGRMC1 を標的とした創薬シーズ化合物の検証と、動物モデルを用いた PGRMC1 の未知の生理機能の解明を目的とする。

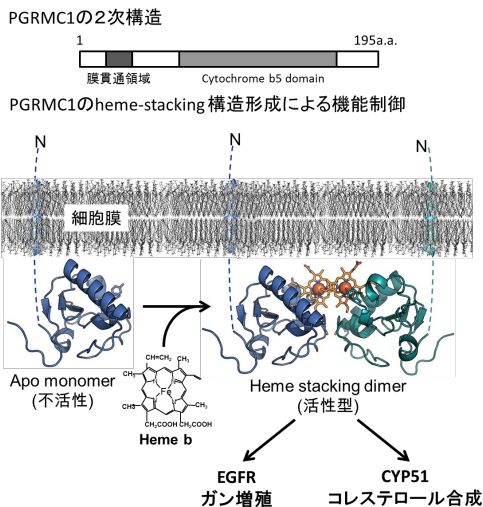


図1 PGRMC1の分子構造と機能制御

2. 研究の目的

上記のように本研究では、独自のアフィニティ精製技術を駆使して、膜結合性のヘムタンパク質 PGRMC1 を同定している。さらに、X 線結晶構造解析により PGRMC1 がタンパク質内のヘム分子同士が会合する新規の heme-stacking 構造を形成し、癌増殖などの制御に関わることを明らかとしている。また、肝炎などに対する抗炎症作用を示す生薬有効成分が PGRMC1 に結合することを見出している。現在、一過的に発現抑制が出来る PGRMC1-knockdown マウスの作製し、in vivo の機能について解析を行っており、本研究では、PGRMC1 の構造的機能制御の新たな知見を基盤として、生体レベルにおける PGRMC1 の癌および炎症に対する作用について検証を行うとともに、これに結合する薬剤による制御を解明することによって、新たな創薬開発のための基盤とすることを目的とする。

3. 研究の方法

上記の知見を基盤として、heme-stacking 構造を形成した PGRMC1 を介した生理的な機能制御を分子レベルで解明する必要がある。このために PGRMC1 に相互作用する因子の解析を行うとともに、薬剤による制御の解析を行う。さらにマウス個体レベルの機能を解析して PGRMC1 の生理的重要性を以下の方法により解明を目指す。

(1) PGRMC1 に相互作用する因子の包括的解析

現在、細胞膜上で PGRMC1 に相互作用する因子群について、membrane-based yeast two-hybrid システムで解析しており、約 40 種以上の候補タンパク質が見つかりしている。これらの候補分子として、レドックス制御や脂質代謝・輸送に関わる因子が多く同定されており、これらと PGRMC1 の結合様式の解析を行い、癌や炎症に関わる作用の解明を目指す。

(2) PGRMC1 と薬剤の結合様式と制御機構の解明

薬剤と PGRMC1 の相互作用について、NMR 解析で PGRMC1 の heme-stacking 構造の介面に薬剤が結合することを見出しており、この周辺アミノ酸の変異体を作製して薬剤の配位構造を解明し、上記の解析で明らかとした PGRMC1 の結合因子との作用に対する薬剤の効果を検証する。

(3) in vivo モデルにおける PGRMC1 の癌・炎症に対する作用の解明

現在 PGRMC1-KD マウスを用いて、薬剤が効果を示す事が知られる急性肝炎モデルでの検証を行っており、PGRMC1 が肝炎発症の要因となる事を見出している。今後、急性および慢性肝炎における PGRMC1 の作用を解析

し、その分子機構の解明を目指す。また癌への効果に関しては、スーパー免疫不全マウス (NOG mice)を用いたヒト大腸癌細胞の肝転移モデルでの検証を行い、PGRMC1 および薬剤の効果を検証する。

4. 研究成果

本研究の成果として、肝炎などの炎症作用に改善効果を示すことが知られる生薬由来の有効成分に対する分子標的のアフィニティスクリーニングを行っており、驚いた事に活性型薬剤特異的に結合する因子として PGRMC1 が同定することに成功した。NMR による構造解析から、この薬剤が heme-stacking 構造の PGRMC1 に選択的に結合することを明らかとし、これにより EGFR との相互作用を阻害して癌細胞の増殖を抑制することを新たに見出している。また、イタリア Bari 大学の Abate 博士との共同研究により、Sigma Ligand と呼ばれる疎水的な芳香環を有する化合物のいくつかの化合物(PB28, DTG など)が heme dimer 体の PGRMC1 に結合することを見出している (Pharmacol. Res, 2017)。これらの化合物は、PGRMC1 の heme-stacking によって生じる特異なポケット構造に選択的に結合することを見出しており、これらの結合情報を基により高アフィニティに結合する薬剤を選定し、PGRMC1 を標的とした新たな創薬シーズに繋がる可能性が考えられる。

また、これらの候補化合物は、PGRMC1 に結合することにより、PGRMC1 と EGFR との相互作用を阻害し、細胞レベルおよびマウス癌移植モデルにおいて顕著な抗がん作用を示すことを見出している。このように本研究では、PGRMC1 の新規な構造的機能制御の知見を基盤として、分子レベル・個体レベルにおける癌および炎症作用に対する PGRMC1 の機能を解析するとともに、これに結合する薬剤との構造情報の解析を進めることにより、未知の PGRMC1 の制御機構の解析を進めた。

また、PGRMC1 は通常の full knockout マウスは胎生致死となるため、その生理機能については解析が進んでいなかったが、我々は PGRMC1 の発現を部位特異的または一過的な誘導性に制御出来る conditional knockout (cKO)マウスを作製しており、PGRMC1 を介した薬剤の抗炎症作用について in vivo の機能の解析を進めている。これらの解析から、薬剤が効果を示す事が知られる急性肝炎モデルでの検証を行っており、PGRMC1 が肝炎発症の要因となる事を見出している。さらに、高脂肪食を与えた肥満モデルにおいても PGRMC1 KO により脂肪沈着や脂肪肝形成の抑制効果を示すことを見出している。これらの結果は PGRMC1 の機能阻害により、肝炎やメタボリックシンドロームに対する治療法の開発に繋がると考えられ、我々が得てい

る PGRMC1 を機能制御できる候補化合物の効果を検証することにより、これら新たな疾患適用への応用展開を目指す。

このように本研究は、ヘムの細胞内標的分子の網羅的同定というケミカルバイオロジー的な解析を出発点として、分子生物学、構造生物学、細胞生物学、生理学など様々な研究手法を融合させた極めて学際性の高い独創的な研究であるといえる。これらの解析により、未知であった PGRMC1 の癌や肝炎などの炎症に対する作用の解明が期待できる。さらに PGRMC1 に結合する薬剤も見出しており、この結合様式や制御機構を解明することにより、PGRMC1 が関わる疾患に対する予防法や創薬開発の基盤となると考えられ、社会的な意義も非常に大きく成果の発展が期待される。

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 14 件)

Shiota M, Naya M, Yamamoto T, Hishiki T, Tani T, Takahashi H, Kubo A, Koike D, Itoh M, Ohmura M, Kabe Y, Sugiura Y, Hiraoka N, Morikawa T, Takubo K, Suina K, Nagashima H, Sampetean O, Nagano O, Saya H, Yamazoe S, Watanabe H, Suematsu M. Gold-nanofève surface-enhanced Raman spectroscopy visualizes hypotaurine as a robust anti-oxidant consumed in cancer survival. *Nat Commun.* 査読有, 2018, 19;9(1):1561. doi:

10.1038/s41467-018-03899-1.

Wu R, Murali R, Kabe Y, French SW, Chiang YM, Liu S, Sher L, Wang CC, Louie S, Tsukamoto H. Baicalein targets GTPase-mediated autophagy to eliminate liver tumor initiating stem cell-like cells resistant to mTORC1 inhibition. *Hepatology.* 査読有, 2018, in press.

Tokumoto Y, Tamaki S, Kabe Y, Takubo K, Suematsu M. Quiescence of adult oligodendrocyte precursor cells requires thyroid hormone and hypoxia to activate Runx1. *Sci Rep.* 査読有, 2017,21;7(1):1019.doi:10.1038/s41598-017-01023-9.

Lai KKY, Kweon SM, Chi F, Hwang E, Kabe Y, Higashiyama R, Qin L, Yan R, Wu RP, Lai K, Fujii N, French S, Xu J, Wang JY, Murali R, Mishra L, Lee JS, Ntambi JM, Tsukamoto H. Stearoyl-CoA Desaturase Promotes Liver Fibrosis and Tumor Development in Mice via a Wnt Positive-Signaling Loop by Stabilization of Low-Density Lipoprotein-Receptor-Related Proteins 5 and 6. *Gastroenterology.* 査読有,

2017;152(6):1477-1491.doi:10.1053/j.gastro.2017.01.021.

Pati ML, Groza D, Riganti C, Kopecka J, Niso M, Berardi F, Hager S, Heffeter P, Hirai M, Tsugawa H, Kabe Y, Suematsu M, Abate C. Sigma-2 receptor and progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) are two different proteins: Proofs by fluorescent labeling and binding of sigma-2 receptor ligands to PGRMC1. *Pharmacol Res.* 査読有, 2017;117:67-74.doi:10.1016/j.phrs.2016.12.023.

Nishimoto K, Koga M, Seki T, Oki K, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE, Naruse M, Sakaguchi T, Morita S, Kosaka T, Oya M, Ogishima T, Yasuda M, Suematsu M, Kabe Y, Omura M, Nishikawa T, Mukai K. Immunohistochemistry of aldosterone synthase leads the way to the pathogenesis of primary aldosteronism. *Mol Cell Endocrinol.* 査読有, 2017 5;441:124-133.doi:10.1016/j.mce.2016.10.014.

Kabe Y, Yamamoto T, Kajimura M, Sugiura Y, Koike I, Ohmura M, Nakamura T, Tokumoto Y, Tsugawa H, Handa H, Kobayashi T, Suematsu M. Cystathionine β -synthase and PGRMC1 as CO sensors. *Free Radic Biol Med.* 査読有, 2016 ;99:333-344. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.

Nishimoto K, Seki T, Hayashi Y, Mikami S, Al-Eyd G, Nakagawa K, Morita S, Kosaka T, Oya M, Mitani F, Suematsu M, Kabe Y, Mukai K. Human Adrenocortical Remodeling Leading to Aldosterone-Producing Cell Cluster Generation. *Int J Endocrinol.* 査読有, 2016;2016:7834356.

Tamura A, Nishimoto K, Seki T, Matsuzawa Y, Saito J, Omura M, Gomez-Sanchez CE, Makita K, Matsui S, Moriya N, Inoue A, Nagata M, Sasano H, Nakamura Y, Yamazaki Y, Kabe Y, Mukai K, Kosaka T, Oya M, Suematsu S, Nishikawa T. Somatic KCNJ5 mutation occurring early in adrenal development may cause a novel form of juvenile primary aldosteronism. *Mol Cell Endocrinol.* 査読有, 2017 5;441:134-139. doi: 10.1016/j.mce.2016.07.031.

Uchida T, Nishimoto K, Fukumura Y, Asahina M, Goto H, Kawano Y, Shimizu F, Tsujimura A, Seki T, Mukai K, Kabe Y, Suematsu M, Gomez-Sanchez CE, Yao T, Horie S, Watada H. Disorganized Steroidogenesis in Adrenocortical Carcinoma, a Case Study. *Endocr Pathol.* 査読有, 2017 ;28(1):27-35. doi: 10.1007/s12022-016-9441-8.

Takeshita M, Kuno A, Suzuki K, Matsuda A, Shimazaki H, Nakagawa T, Otomo Y, Kabe Y, Suematsu M, Narimatsu H, Takeuchi T. Alteration of matrix metalloproteinase-3 O-glycan structure as a biomarker for disease activity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 査読有, 2016 21;18(1):112.doi:10.1186/s13075-016-1013-2.

Kabe Y, Nakane T, Koike I, Yamamoto T, Sugiura Y, Harada E, Sugase K, Shimamura T, Ohmura M, Muraoka K, Yamamoto A, Uchida T, Iwata S, Yamaguchi Y, Krayukhina E, Noda M, Handa H, Ishimori K, Uchiyama S, Kobayashi T, Suematsu M. Haem-dependent dimerization of PGRMC1/Sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation and chemoresistance. *Nat Commun.* 査読有, 2016, 18;7:11030. doi: 10.1038/ncomms11030.

Suematsu M, Nakamura T, Tokumoto Y, Yamamoto T, Kajimura M, Kabe Y. CO-CBS-H₂S Axis: From Vascular Mediator to Cancer Regulator. *Microcirculation.* 査読有, 2016 Apr;23(3):183-90.doi:10.1111/micc.12253. Review.

Masuda K, Chiyoda T, Sugiyama N, Segura-Cabrera A, Kabe Y, Ueki A, Banno K, Suematsu M, Aoki D, Ishihama Y, Saya H, Kuninaka S. Correction: LATS1 and LATS2 phosphorylate CDC26 to modulate assembly of the tetratricopeptide repeat subcomplex of APC/C. *PLoS One.* 査読有, 2015 10;10(4):e0125308. doi: 10.1371/journal.pone.0125308.

〔学会発表〕(計 5 件)

第 89 回日本生化学会大会、「新規ガス受容体 PGRMC1 の構造的機能制御の解明」発表者 加部泰明、2016 年

第 41 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会「ヘム含有受容体 PGRMC1 の構造と機能」口頭発表、加部泰明、(東京)2017

第 14 回日本ヒトプロテオーム学会、「新規ガス受容体 PGRMC1 の構造的機能制御の解明」発表者 加部泰明、2016 年

第 10 回メディバイオ事業研究会、「代謝制御解析を基点とした医療展開」発表者 加部泰明、2015 年

第 22 回肝細胞研究会、「肝炎保護成分グリチルリチンの新規受容体探索と生理機能の解明」、発表者 加部泰明、2015 年

〔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：
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

加部 泰明 (KABE, Yasuaki)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・専任講師
研究者番号：20397037

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

内田 毅 (UCHIDA, Tsuyoshi)
北海道大学・理学部・准教授
研究者番号：30343742

(4)研究協力者

なし