

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目： 基盤研究 (S)
 研究期間： 2005 ~ 2009
 課題番号： 17101002
 研究課題名 (和文) 環境汚染物質による体内時計の破壊：ヘム-NO-蛋白質合成-時計遺伝子のクロストーク
 研究課題名 (英文) Destruction of the biological clock system by environmental contaminants: Crosstalk between heme, NO, protein synthesis and clock genes
 研究代表者
 清水 透 (SHIMIZU TORU)
 東北大学・多元物質科学研究所・教授
 研究者番号： 40118956

研究成果の概要 (和文)：[1] ヘム制御キナーゼ(HRI)、及びヘム結合時計遺伝子制御因子のNOやヘムセンシングの分子機構を解明し、水銀が、このヘム-蛋白質結合を破壊することを示した。[2] メチル水銀で誘起されたマウスの日内活動の異常性は、チオレート化合物と血液脳関門透過化合物である α -リポ酸を同時に投与した場合のみ、修復された。[3]ヘム受容体を保持するガスセンサー酵素のガス結合部位の同定、及びガス結合による活性上昇の分子機構を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：[1] Molecular mechanisms of NO- and heme-sensing of heme-regulated kinase (HRI) and heme-regulated transcriptional factors were elucidated and mercury was found to break the heme-protein interactions.; [2] Thiolate and α -lipoic acid remedied depressive behavior of mice induced by methyl-mercury.; [3] Gas-recognition sites and molecular mechanism of gas-induced catalytic enhancement of the heme-regulated gas-sensor enzymes were elucidated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	20,700,000	6,210,000	26,910,000
2006年度	16,200,000	4,860,000	21,060,000
2007年度	16,200,000	4,860,000	21,060,000
2008年度	16,200,000	4,860,000	21,060,000
2009年度	16,200,000	4,860,000	21,060,000
総計	85,500,000	25,650,000	111,150,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・化学物質影響科学

キーワード：NO、ヘム、環境汚染物質、時計遺伝子、蛋白合成

1. 研究開始当初の背景
 栄養不足、ウイルス感染など様々な外的スト

レスによって蛋白質翻訳(合成)が停止する。

赤血球内には、ヘムの濃度の低下をセンスして、翻訳開始因子 eIF2 α をリン酸化し、グロビン蛋白質合成を停止するヘム制御キナーゼ (HRI) がある。この蛋白質合成を on/off する制御機構は脳や他の臓器にも存在する。一方、ヘムの合成反応は PCB やハロエタンなどの環境汚染物質によって阻害される。又、NO ガスがヘム合成や蛋白質合成に関わることも示唆されている。以上の知見に鑑み、HRI による蛋白質合成阻害の機構について、環境汚染物質によるヘム合成・分解の阻害、NO 合成阻害、NO-ヘム相互作用、ヘムセンサー、及び NO が関わるシグナル伝達などとの相互関係を明らかにする研究を行っていた。

2. 研究の目的

ヘムが体内時計 (サーカディアンリズム、生物時計) に関係するという報告が出た。即ち、ヘム結合転写制御因子 (NPAS2) は前脳に存在し、体内時計に関係する遺伝子の転写を制御すると示唆された。この転写は NO, CO 及び NADPH によってさらに制御される。体内時計は、生体の恒常性を維持するために、ヘムの合成・代謝、蛋白質の合成、及び NO や CO などの小分子との時間的及び空間的に調和した相互作用がある場合にのみ、正常に機能する。以上の知見に基づき、環境汚染物質によるヘム合成阻害、蛋白翻訳 (合成) 阻害、及び時計遺伝子を調節するヘム結合転写制御因子 (NPAS2) の機能の間の時間的、及び空間的な相互作用を明らかにし、「睡眠障害」などの精神的な疾病の分子論的解明と治療への応用の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 研究対象になる蛋白質、及び酵素の cDNA を大腸菌に組み込み、それら蛋白質や酵素を大量に大腸菌に作成させる。これらを精製して、生化学的、及び生物物理学的実験に使う。

又、遺伝子工学的にこれらの蛋白質や酵素の欠損変異体や部位特異的変異体も大腸菌に作成、精製して実験に使う。これらの変異体を研究することにより、蛋白質や酵素のどの部分やどのアミノ酸が構造や活性の制御に係わっているかを調べる事が可能である。

(2) 精製した蛋白質や酵素のヘムとの結合性、ヘムの結合部位や認識部位、ヘム結合が蛋白質や酵素の生物学的機能に及ぼす影響を調べる。これには、様々な分光学的手法を用いる。

(3) メチル水銀を投与したマウスの日内行動を調べ、もし、それが異常な行動を示した場合、どの薬物の投与によってその異常行動が修復されるかを調べる。

4. 研究成果

(1) ヘム不足に応じて活性化する HRI の機能解析。① ヘムのセンシング部位がシステインであることを特定し、ヘムのセンシングには蛋白質全体の大きな構造変化を伴うことが示唆された。② NO による活性上昇の分子機構を解明するとともに、ヘムが存在する場合と、存在しない場合では、NO による活性上昇の機構が異なることが示唆された。③ 水銀が活性を強く阻害し、又、NO が活性を修復するという結果を得、その分子機構を解明した。④ ヘムが非存在化の HRI では 19 残基の Ser/Thr/Tyr がリン酸化されることが質量分析の結果から示唆された。

(2) 時計遺伝子制御因子である NPAS2, mousePer1, mousePer2, mousePer3 のヘム結合性。① NPAS2, mousePer1、及び mousePer2 のヘム結合部位は Cys のチオレートであり、水銀の添加により、ヘムは蛋白質から脱離することが確かめられた。② mousePer2 の C 末端側にある CP モチーフへのヘム結合性も確かめられた。③ ヘムが NPAS2 より mousePer2 へ移動することが示され、ヘムが時計遺伝子

の転写の制御に重要な関わりがあることが示唆された。

(3) 環境汚染物質のマウスの日内活動への影響。①メチル水銀の投与によりマウスの日内活動が著しく阻害された。② チオレート化合物と血液脳関門透過化合物である α -リポ酸を同時に投与した場合のみ、メチル水銀で誘起された日内活動の異常性が修復された。③これらの結果より、水銀は生体内のチオレートに強く結合し、例えば、脳内のヘム-チオレート結合を破壊してマウスの日内活動を阻害する。しかし、外部から過剰のチオレート化合物を添加することにより、脳内のチオレート部位が修復された可能性が示唆された。

(4) ガス応答ヘムセンサーである *Ec* DOS。

①ガス結合部位である Arg97 は、ガスの認識、及びヘム鉄-ガス錯体の安定性に重要な働きをしていることが示唆された。②毒ガスである H_2S ガスは、*Ec* DOS のヘムを修飾し、その活性に重要な影響を与えることが示唆された。③水銀が反応する Cys のチオレート残基が活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。

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 32 件)

- [1] "Thiolate with alpha-lipoic acid remediates depressive behavior of mice induced by methyl-mercury", K. Kitanishi, J. Igarashi, and T. Shimizu, *Current Topic in Toxicology* (2010) in press. (査読無)
- [2] "The FG loop of a heme-based gas sensor enzyme, *Ec* DOS, functions in heme binding, autoxidation and catalysis", S. Ito, J. Igarashi, and T. Shimizu, *J. Inorg. Biochem.* 103, 1380-1385 (2009) (査読有)

[3] "Role of Phe113 at the distal side of the heme domain of an oxygen-sensor (*Ec* DOS) in the characterization of the heme environment", S. Ito, Y. Araki, A. Tanaka, J. Igarashi, T. Wada, and T. Shimizu, *J. Inorg. Biochem.* 103, 989-996 (2009) (査読有)

[4] "Ligand binding to the Fe(III)-protoporphyrin IX complex of phosphodiesterase from *Escherichia coli* (*Ec* DOS) markedly enhances catalysis of cyclic di-GMP: Roles of Met95, Arg97, and Phe113 of the putative heme distal side in catalytic regulation and ligand binding", A. Tanaka, and T. Shimizu, *Biochemistry* 47, 13438-13446 (2008) (査読有)

[5] "Arg97 at the heme distal side of the isolated heme-bound PAS domain of a heme-based oxygen sensor from *Escherichia coli* (*Ec* DOS) plays critical roles in auto-oxidation and binding to gases, particularly O_2 ", Y. Ishitsuka, Y. Araki, A. Tanaka, J. Igarashi, O. Ito and T. Shimizu, *Biochemistry* 47, 8874-8884 (2008) (査読有)

[6] "Resonance Raman investigation of redox-induced structural changes of protein and heme in the sensor domain of *Ec* DOS protein", S. F. El-Mashtoly, H. Takahashi, H. Kurokawa, A. Sato, T. Shimizu, and T. Kitagawa, *J. Raman Spectrosc.* 39, 1614-1626 (2008) (査読有)

[7] "Elucidation of the heme-binding site of heme-regulated eIF2alpha kinase (HRI) and the role of the regulatory motif in heme sensing by spectroscopic and catalytic studies of mutant proteins", J. Igarashi, M. Murase, A. Iizuka, F. Pichierri, M. Martinkova, and T. Shimizu, *J. Biol. Chem.* 283, 18782-18791 (2008) (査読有)

[8] "Roles of Arg97 and Phe113 in regulation of distal ligand binding to heme in the sensor domain of *Ec* DOS protein: resonance Raman and mutation study", S. F. El-Mashtoly, S.

- Nakashima, A. Tanaka, T. Shimizu, and T. Kitagawa, *J. Biol. Chem.* 283, 19200-19010 (2008) (査読有)
- [9] "Heme binding characteristics of the isolated PAS-A domain of mouse Per2, a transcriptional regulatory factor associated with circadian rhythms", K. Kitanishi, J. Igarashi, K. Hayasaka, N. Hikage, I. Saiful, S. Yamauchi, T. Uchida, K. Ishimori, and T. Shimizu, *Biochemistry* 47, 6157-6168 (2008) (査読有)
- [10] "The roles of thiolate-heme proteins, other than the P450 cytochromes, in the regulation of heme-sensor proteins", J. Igarashi, K. Kitanishi, M. Martinkova, M. Murase, A. Iizuka, and T. Shimizu, *Acta Chim. Slov.* 55, 67-74 (2008) (査読有)
- [11] "Eukaryotic initiation factor 2alpha kinase is a nitric oxide-responsive mercury sensor enzyme: Potent inhibition of catalysis by the mercury cation and reversal by nitric oxide", M. Martinkova, J. Igarashi, and T. Shimizu, *FEBS Lett.* 581, 4109-4114 (2007) (査読有)
- [12] "Ultraviolet resonance Raman evidence for utilization of the heme 6-propionate hydrogen-bond network in signal transmission from heme to protein in EcDOS protein", S. F. El-Mashtoly, H. Takahashi, T. Shimizu, and T. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 3556-3563 (2007) (査読有)
- [13] "Critical role of the heme axial ligand, Met95, in locking catalysis of the phosphodiesterase from *Escherichia coli* (EcDOS) toward cyclic diGMP", A. Tanaka, H. Takahashi, and T. Shimizu, *J. Biol. Chem.* 282, 21301-21307 (2007) (査読有)
- [14] "Phosphodiesterase activity of EcDOS, a heme-regulated enzyme from *Escherichia coli*, toward 3', 5'-cyclic diguanylic acid is obviously enhanced by O₂ and CO binding", H. Takahashi and T. Shimizu, *Chem. Lett.* 35, 970-971 (2006) (査読有)
- [15] "Characterization of heme-regulated eIF2 alpha kinase: Roles of the N-terminal domain in the oligomeric state, heme binding, catalysis, and inhibition", M. Miksanova, J. Igarashi, M. Minami, I. Sagami, S. Yamauchi, H. Kurokawa, and T. Shimizu, *Biochemistry* 45, 9894-9905 (2006) (査読有)
- [16] "Spectroscopic and DNA-binding characterization of the isolated heme-bound basic helix-loop-helix-PAS-A domain of neuronal PAS protein 2 (NPAS2), a transcription activator protein associated with circadian rhythms", Y. Mukaiyama, T. Uchida, E. Sato, A. Sasaki, Y. Sato, J. Igarashi, H. Kurokawa, I. Sagami, T. Kitagawa, and T. Shimizu, *FEBS J.* 273, 2528-2539 (2006) (査読有)
- [17] "Critical roles of Leu99 and Leu115 at the heme distal side in auto-oxidation and the redox potential of a heme-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli*", N. Yokota, Y. Araki, H. Kurokawa, O. Ito, J. Igarashi, and T. Shimizu, *FEBS J.* 273, 1210-1223 (2006) (査読有)
- [18] "Structure-function relationships of EcDOS, a heme-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli*", Y. Sasakura, T. Yoshimura-Suzuki, H. Kurokawa, and T. Shimizu, *Acc. Chem. Res.* 39, 37-43 (2006) (査読有)
- [19] "Investigation of the relationship between protein-protein interaction and catalytic activity of a heme-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli* (EcDOS) by protein microarray", Y. Sasakura, K. Kanda, T. Yoshimura-Suzuki, T. Matsui, S. Fukuzono, and T. Shimizu, *Biochemistry* 44, 9598-9605 (2005) (査読有)
- [20] "Spectroscopic characterization of the

isolated heme-bound PAS-B domain of neuronal PAS domain protein 2 associated with circadian rhythms", R. Koudo, H. Kurokawa, E. Sato, J. Igarashi, T. Uchida, I. Sagami, T. Kitagawa, and T. Shimizu, *FEBS J.* 272, 4153-4162 (2005) (査読有)

[21] "CO-dependent activity-controlling mechanism of heme-containing CO-sensor protein, neuronal PAS domain protein 2", T. Uchida, E. Sato, A. Sato, I. Sagami, T. Shimizu, and T. Kitagawa, *J. Biol. Chem.* 280, 21358-21368 (2005) (査読有)

[学会発表] (計 195 件)

[1] Kenichi Kitanishi, Jotaro Igarashi, Toru Shimizu, "Cysteine Thiolate is the Heme Binding Site of Heme-regulated Transcription Regulatory Factors Associated with Circadian Rhythms", *Gordon Research Conference on Protein Cofactors, Radicals and Quinones*, U.S.A., Ventura, CA (2010.1.24-2010.1.29)

[2] Jotaro Igarashi, Toru Shimizu, "Heme-regulated Eukaryotic Initiation Factor 2 α Kinase", *Gordon Research Conference on Protein Cofactors, Radicals and Quinones*, U.S.A., Ventura, CA (2010.1.24-2010.1.29)

[3] Atsunari Tanaka, Yukako Ishitsuka, Jotaro Igarashi, Toru Shimizu, "Mechanisms of Gas-sensing and Intra-molecular Signal Transduction of a Heme-based Oxygen-sensor Enzyme, *Ec* DOS", *Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry (SABIC-2009)*, India, Mumbai (2009.11.4-2009.11.7)

[4] Jotaro Igarashi, Motohiko Murase, Marketa Martinkova, Kenichi Kitanishi, Toru Shimizu, "Heme-sensing Mechanisms of Heme-sensor Proteins Associated with Protein Synthesis and Circadian Rhythms", *14th International*

Conference on Biological Inorganic Chemistry, Japan, Nagoya (2009.7.25-2009.7.30)

[5] Jotaro Igarashi, Kenichi Kitanishi, Motohiko Murase, Marketa Martinkova, Toru Shimizu, "The Critical Role of the Thiolate-Heme Complex in the Functioning", *16th International Conference on Cytochrome P450, Biochemistry, Biophysics, Biotechnology*, Japan, Nago, Okinawa (2009.6.21-2009.6.25)

[6] Toru Shimizu, "Emerging Roles of Heme as the Signal and the Gas-sensing Site: Heme-sensor and Gas-sensor Proteins", *Biochemistry Seminar, Department of Medical Biotechnology*, Jagiellonian University, Poland, Krakow (2009.6.12-2009.6.13)

[7] Jotaro Igarashi, Kenichi Kitanishi, Toru Shimizu, "Cysteine thiolate is the heme sensing site in heme-sensor proteins", *XXII International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry*, Slovakia, Smolenice (2009.6.7-2009.6.11)

[8] Toru Shimizu, "Molecular mechanism of NO-induced activation of a heme-sensor, eIF2 α kinase", *Convegno Nazionale, Gli Aspetti Biologici dell'Ossido Nitrico (Italia National Congress for Biological Aspect of Nitric Oxide)*, Italia, Rimini (2008.10.4-2008.10.6)

[9] Toru Shimizu, "Heme-sensing Mechanism of Heme-sensor Proteins Associated with Circadian Rhythms and Protein Synthesis", *Biochemistry Meeting at the Department of Morphological-Biomedical Science*, University of Verona, Italy, Verona (2008.10.3)

[10] Jotaro Igarashi, Motohiko Murase, Jun Iwashita, Takehiko Sasaki, Toru Shimizu, "NO-induced activation of a heme-sensor, eIF2 α kinase, in association with binding to cysteine and heme", *Fifth International Conference, Biology*,

Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Austria, Bregenz (2008.8.24-2008.8.28)

[11] Toru Shimizu, “Heme-binding proteins associated with transcription of circadian rhythms”, *Gordon Research Conference on the Chemistry & Biology of Tetrapyrroles*, U.S.A., Newport, RI (2008.7.20-2008.7.25)

[12] Marketa Martinkova, Jotaro Igarashi, Toru Shimizu, “Structure-function relationships of a thiol-coordinating heme protein, HRI, associated with protein synthesis”, *15th International Conference on Cytochrome P450, Biochemistry, Biophysics, Functional Genomics*, Slovenia, Bled (2007.6.17-2007.6.21)

[13] Toru Shimizu, “Structure-function relationships of eIF2 α kinase (heme-regulated inhibitor, HRI), associated with protein synthesis”, *VIIIth National Congress of Pharmacology, Therapeutics and Clinical Toxicology*, Romania, Tirgu-Mure (2007.6.6-2007.6.9)

[14] Toru Shimizu, “Intramolecular Signal Transduction and Signal Switching of Heme-sensor Proteins through NO and CO Binding”, *20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB*, Japan, Kyoto (2006.6.18-2006.6.23)

[15] Marketa Miksanova, Hirofumi Kurokawa, Jotaro Igarashi, Toru Shimizu, “Role of the N-terminal Domain in the Structure and Catalysis of Heme-regulated Eukaryotic Initiation Factor 2 α Kinase, a Heme-sensor Enzyme”, *Biochemistry and Molecular Biology of Sensor Enzymes and Proteins: Satellite Meeting of the 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology*, Japan, Sendai (2006.6.15-2006.6.16)

[図書] (計 1 件)

1. 五十嵐城太郎、清水透 (分担執筆)
「P450 の分子生物学」第 2 版, 他のヘムーチオレートタンパク質の構造と機能, pp. 77-83 (2009)

[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

<http://www.tagen.tohoku.ac.jp/labo/shimizu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 透 (SHIMIZU TORU)

東北大学・多元物質科学研究所・教授
研究者番号 : 40118956

(2) 研究分担者

黒河 博文 (KUROKAWA HIROFUMI)

東北大学・多元物質科学研究所・助手
研究者番号 : 80359546

田中 敦成 (TANAKA ATSUNARI)

東北大学・多元物質科学研究所・教育研究
支援者

研究者番号 : 20431471

五十嵐 城太郎 (IGARASHI JOTARO)

東北大学・多元物質科学研究所・助教
研究者番号 : 80375162

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :