

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06538

研究課題名(和文)ヘムシグナルによる天然変性タンパク質Bach2の調節機構とその意義の解明

研究課題名(英文) Investigation of the regulation mechanism and significance of intrinsically disordered protein Bach2 by heme signaling.

研究代表者

松井 美紀 (MATSUI, Miki)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00455784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヘムが、転写抑制因子BACH2と直接結合し、形質細胞への分化を促進する。しかし、Bach2の制御機構解明には至っていなかった。BACH2のヘム結合領域は天然変性状態である。我々は、ヘム依存的にBACH2と結合するリン酸化酵素TBK1の同定から、TBK1がBACH2を直接リン酸化しBACH2の標的遺伝子発現が調節されることを示した。ヘムの有無でBACH2のリン酸化部位が変化し、ヘム結合量に伴いBACH2複合体構成因子が変化することを示した。本研究では、ヘムシグナルがBACH2の全体構造が動的に変化させ、BACH2複合体構成因子の変化を誘導し、BACH2が制御されている分子機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然変性タンパク質は、生体内で他のタンパク質と相互作用して多彩な機能を生み出す。Bach2の天然変性領域には、複数のヘムが結合して機能が変化したが、この際二次構造を新たにとらない。すなわち、天然変性状態のまま機能が変化するという、これまでに見いだしていない特徴をもつ。また、天然変性領域の構造変化をヘムとリン酸化という二つのシグナルが連携して制御することを見いだしているが、天然変性領域が異なるシグナルを統合する例はない。本研究が達成により、天然変性タンパク質研究の問題点を解決するだけでなく、ヘムの新たな役割として「細胞内ヘム濃度変化に伴う天然変性タンパク質相互作用の調節」まで広がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Heme binds directly to the transcriptional repressor BACH2 and promotes plasma cell differentiation. However, the regulatory mechanism of BACH2 has not been elucidated. Heme-binding region of BACH2 is an intrinsically disordered state. We identified a TBK1 kinase which binds BACH2 in a heme-dependent manner. We showed that TBK1 directly phosphorylates BACH2 and regulates the expression of BACH2 target genes. We obtained results that the phosphorylation site of BACH2 changes in the presence or absence of heme, and that the BACH2 complex components change with the amount of heme binding. In this study, we show that heme signals dynamically alter the overall structure of BACH2, induce changes in BACH2 complex components, and elucidate the molecular mechanisms by which BACH2 is regulated.

研究分野：生化学

キーワード：ヘム 天然変性タンパク質

1. 研究開始当初の背景

ヘムは、生命の恒常性維持に必須な因子である。ヘムの既知の役割は、酸素運搬や電子伝達である。これらの機能を担う多くのヘムタンパク質は安定な立体構造をとり、ヘムが反応中心として機能する特徴がある。一方、生体内で組織や細胞が損傷を受けた際、漏出したヘムは、免疫系を活性化する danger signal となることが明らかとなり、ヘムの新しい役割として注目されている(1)。しかし、このとき、ヘムがどのようにタンパク質の機能を調節し、細胞応答を引き起こすかは不明である。

「天然変性タンパク質」は、多様な構造を取ることで、生体機能の複雑さを生み出すと考えられている。このとき、1つの天然変性タンパク質が複数タイプの複合体を構成することで、多彩な機能が生み出される。天然変性タンパク質の重要性が認知されているにも関わらず、立体構造情報に基づいた分子シミュレーションや生物物理学的な解析が先行し、シグナル伝達によって天然変性領域の構造がどのように制御されるかという点やその生理的な意義は未解決の課題である。

本研究で対象とする転写因子 Bach2 は、B 細胞内で、形質細胞分化のマスター制御転写因子 Blimp-1 の遺伝子発現を抑制し(2)、クラススイッチ組換えに必須なことが示されてきた(3)。しかし、Bach2 タンパク質の活性制御については不明な点が多い。申請者は、Bach2 にはヘム結合可能な Cys-Pro(CP)モチーフが存在することに注目した。その結果、ヘムが Bach2 と直接結合し不活性化することで、形質細胞分化が促進されることを発見し、「ヘムによる免疫応答制御モデル」という新しい概念を提唱した(4)。更に、Bach2 が「天然変性タンパク質」であることを示し、その天然変性領域に複数のヘムが結合して、構造状態を変化させることを明らかにし報告した(5)。これらの成果を考え合わせ「ヘムが情報伝達物質として機能する可能性」を考えた。しかし、ヘムがシグナルとして Bach2 の天然変性領域を調節する生理的意義および、分子機構の全貌解明には至っていない。

2. 研究の目的

天然変性領域は、様々なシグナルに応答して多様なタンパク質相互作用に対応すると予測されているが、実例は少ない。そこで申請者は、ヘムがシグナルとして天然変性タンパク質の機能を調節し、細胞応答を制御するという仮説を立て、Bach2 の解析を通じてこの問題に迫る。Bach2 の天然変性領域に結合するタンパク質を探索し、3つの因子(コリプレッサー NcoR1、リン酸化酵素 TBK1、ユビキチン E3 リガーゼ Fbxo22)を同定した。そして、これまでの予備的知見から、ヘムは Bach2 と NcoR1 との結合を低下させることで転写抑制を解除し、さらに TBK1 によるリン酸化を誘導し、これが Fbxo22 によるユビキチン化と分解につながる、というモデルを考えた。Bach2 天然変性領域の構造はいくつかの構造状態をとり、それぞれがコリプレッサー、リン酸化酵素、ユビキチン E3 リガーゼとの結合にかかわること、この構造とタンパク質相互作用のスイッチングをヘムとリン酸化が連携して制御することが予想される。

3. 研究の方法

(1) ヘム-Bach2-TBK1 相互作用の意義

<リン酸化サイトの同定とリン酸化頻度の定量的検討>

ヘムは、Bach2 の構造状態を連続的に変化させることから、ヘムが Bach2 の複数のリン酸化頻度あるいはサイトを変化させる可能性が考えられる。そこで、反応時間とヘム濃度を変

化させ、in vitro でリン酸化反応を行い、2種類の質量分析法で、リン酸化サイト(LC-ESI-MS)とリン酸化頻度(MALDI-TOF-MS)を検討する。

<ヘムシグナルによるBach2-TBK1経路の生理的意義の検討>

培養細胞を用いて、TBK1を過剰発現させ、定量PCRでBach2標的遺伝子の発現上昇を検証することで、TBK1がBach2の活性を下げるのかをレポーターアッセイにて検証する。

(2) ヘム-Bach2-Fbxo22相互作用の意義

<ヘム存在化におけるFbxo22によるBach2のユビキチン化の検出>

培養細胞にFbxo22とBach2を過剰発現させBach2のユビキチン化を検出する。同時にヘム量を変動させる条件下でも同様の実験を行い、ヘムがBach2のユビキチン化を促進するかを検討する。更に、ユビキチン化反応に必要な、E1とE2タンパク質を調整し、in vitroでFbxo22によるBach2のユビキチン化を検討する。

(3) ヘム-Bach2-NcoR1-TBK1-Fbxo22相互作用の意義

<Mammalian Two-hybridシステムを用いたタンパク質相互作用の検討>

ヘムがBach2-NcoR1-TBK1-Fbxo22相互作用することを濃度依存的に切り替えることを検証する。そこで、細胞核内のタンパク質相互作用が検出できるMammalian Two-hybridシステム(プロメガ社)を用いて検討する。

(4) Bach2リン酸化変異体の作製と相互作用の検討

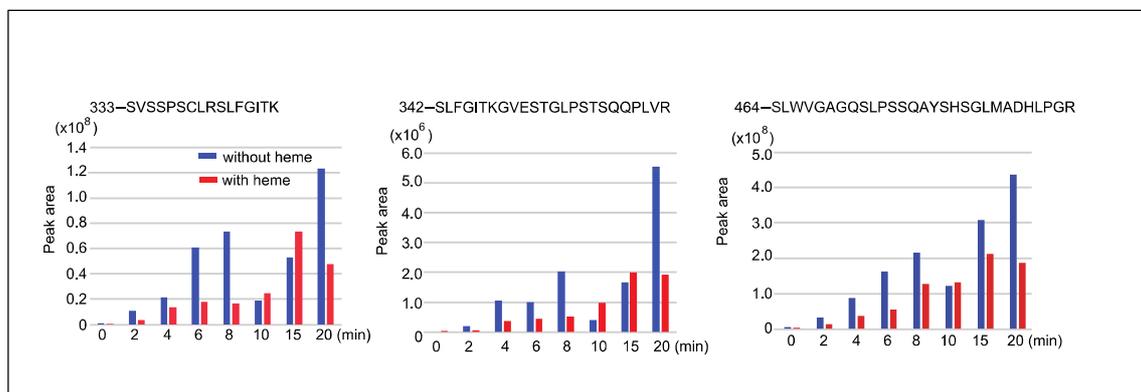
質量分析により同定された、TBK1によるBach2リン酸化サイトに変異導入する。作製したBach2変異体を用いて免疫沈降を行い、Bach2と相互作用する因子への影響について検討する。

4. 研究成果

(1) ヘム-Bach2-TBK1相互作用の意義

昆虫細胞発現TBK1と大腸菌発現系Bach2天然変性領域を用い、ヘムの有無で時間変化に伴うin vitroリン酸化反応を行った。リン酸化の検出には、リン酸化サイト(LC-ESI-MS)とリン酸化頻度(MALDI-TOF-MS)で検討した。その結果、ヘムの有無でBach2のリン酸化頻度には変化はなかったが、ヘムの有無でBach2のリン酸化サイトが変化する結果を得た。

下図：ヘムの有無でリン酸化反応が異なるペプチドを示す：青：ヘムなし、赤：ヘムあり

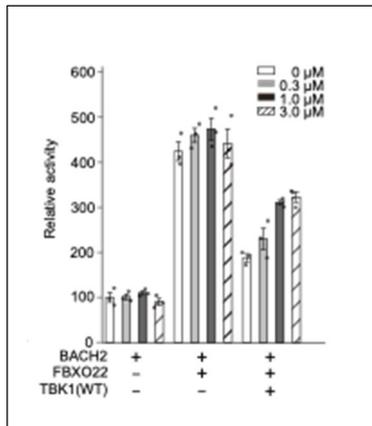


(2) ヘム-Bach2-Fbxo22相互作用の意義

培養細胞にFbxo22とBach2を過剰発現させBach2のユビキチン化を検出した。その結果、ヘムが存在するとき、Fbxo22によるBach2に対するユビキチン化が亢進する結果を得た。

(3) ヘム-Bach2-NcoR1-TBK1-Fbxo22相互作用の意義

Bach2-NcoR1-TBK1-Fbxo22 相互作用について、Mammalian Two-hybrid システムを用いて検討した。その結果、Bach2-Fbxo22 の相互作用は、TBK1 阻害剤によって制御されることが明らかとなった。



右図：Mammalian Two-hybrid システムを用いた Bach2-Fbxo22 相互作用の検討

(4) Bach2リン酸化変異体の作製と相互作用の検討

質量分析により同定された、TBK1による Bach2 リン酸化サイトに複数の変異導入を行い、Bach2 全長に対する Fbxo22 と TBK1 の相互作用がそれぞれ変化するか否かを検討した。作成した変異体は、全長 Bach2 については、ヘム存在化でリン酸化されやすいサイト、ヘム非存在化でリン酸化されやすいサイト、ヘムの有無にかかわらずリン酸化されるサイトについてそれぞれ複数の変異を導入した。その結果、変異導入によって、Bach2-TBK1 の相互作用に変化は見られなかったが、TBK1 によって調節される Bach2 のリン酸化サイトに変異導入されると、Fbxo22 と Bach2 の相互作用が変化する結果を得た。

これらの結果から、Bach2 の天然変性領域に複数のヘムが結合して、Bach2 の構造状態を変化させることで、ヘムがシグナルとなりタンパク質相互作用、翻訳後修飾の調節を担う情報伝達物質として機能する可能性が考えられた。

< 引用文献 >

1. B.Wegiel, C. J. Hauser, L. E.Otterbein, Heme as a danger molecule in pathogen recognition, *Free Radic. Biol. Med.*, (2015) 89:651-661.
2. K. Ochiai, Y. Katoh, T. Ikura, Y. Hoshikawa, T. Noda, H. Karasuyama, S. Tashiro, A. Muto, K. Igarashi Plasmacytic transcription factor Blimp-1 is repressed by Bach2 in B cells, *J. Biol. Chem.*, (2006) 281:38226-38234.
3. A. Muto, S. Tashiro, O. Nakajima, H. Hoshino, S. Takahashi, E. Sakoda, D. Ikebe, M. Yamamoto, K. Igarashi, The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2, *Nature*, (2004) 429: 566-571.
4. M. Watanabe-Matsui, A. Muto, T. Matsui, A. Itoh-Nakadai, O. Nakajima, K. Murayama, M. Yamamoto, M. Ikeda-Saito, K. Igarashi, Heme regulates B cell differentiation, antibody class switch, and heme oxygenase-1 expression in B cells as a ligand of Bach2, *Blood*, (2011), 117: 5438-5448,

5. M. Watanabe-Matsui, T. Matsumoto, T. Matsui, M. Ikeda-Saito, A. Muto, K. Murayama, K. Igarashi, Heme binds to an intrinsically disordered region of Bach2 and alters its conformation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (2015) 565: 25–31,

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Segawa K., Watanabe-Matsui M., Tsuda K., Matsui T., Shirouzu M., Igarashi K., Murayama K.	4. 巻 48
2. 論文標題 Biophysical characterization of heme binding to the intrinsically disordered region of Bach1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Biophysics Journal	6. 最初と最後の頁 361-369
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00249-019-01364-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Segawa Kei, Watanabe-Matsui Miki, Matsui Toshitaka, Igarashi Kazuhiko, Murayama Kazutaka	4. 巻 247
2. 論文標題 Functional Heme Binding to the Intrinsically Disordered C-Terminal Region of Bach1, a Transcriptional Repressor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 153 ~ 159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1620/tjem.247.153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Liang Liu, Mitsuyo Matsumoto, Miki Matsui-Watanabe, Hironari Nishizawa, Kazuhiko Igarashi
2. 発表標題 鉄代謝を制御するTBK1-BACH1フィードバックループの解明
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松井美紀、角屋駿、瀬川圭、島弘季、武藤哲彦、松本光代、白水美香子、村山和隆、五十嵐和彦
2. 発表標題 ヘムシグナルによる転写因子BACH2のリン酸化と相互作用因子の制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 城 宜嗣、青野 重利、齋藤 正男	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 472
3. 書名 ヘムタンパク質の科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------