

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790320

研究課題名（和文）へムによる液性免疫制御機構の解明

研究課題名（英文）The elucidation of the humoral immunity control mechanism by heme

研究代表者

松井 美紀（MATSUI MIKI）

東北大学・大学院医学系研究科・助手

研究者番号：00455784

研究成果の概要（和文）：

転写抑制因子Bach2はb-Zipドメインを持ち、転写因子Mafと2量体形成しDNAと結合する。Bach2はへムと結合するとDNA結合が阻害され、Bach2タンパク質の分解が誘導される。へムによるBach2の分子機構を明らかにするために、申請者は分光学的解析を用いてへム制御領域（331-520 a. a.）を同定した。更に様々な機器解析の結果から、構造をとらないBach2の領域にへムが結合することは重要であり、へムによるBach2の機能制御に重要であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

The transcriptional repressor Bach2 possesses the basic region-leucine zipper (bZip) motif that mediates dimer formation with Maf oncoproteins and DNA binding. It has been found that heme inhibits the DNA binding activity of Bach2 in vitro, and induces degradation of Bach2 in B cells. To reveal the molecular mechanism of the heme-mediated regulation of Bach2, we mapped the heme-binding region by using spectroscopic analyses. Moreover, the results of various instrumental analysis of Bach2 revealed that the unstructured region of Bach2 is important for heme binding and/or transducing heme effect upon the functional regulation of Bach2.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：生体分子医学 転写因子 へム

1. 研究開始当初の背景

転写抑制因子 Bach2 は形質細胞分化を抑制し、クラススイッチ組換えに必須であることが示されている。申請者は、へムが Bach2 と直接結合し、その転写抑制能を不活性化することを見いだした。更にへムは、成熟 B 細胞

から形質細胞へと分化を促進することを示している。しかしへムによる Bach2 の詳細な制御機構は不明であり、液性免疫応答において、へムが担う制御上の役割も不明である。

2. 研究の目的

申請者は、ヘムが Bach2 と直接結合すること、その結果 Bach2 の転写抑制能を阻害すること明らかにしてきた。そして、ヘムが成熟 B 細胞から形質細胞への分化を促進するという全く新しい現象を発見した。そこで Bach2 が B 細胞の活性化応答で形質細胞への分化のブレーキになっていることを考え合わせ、ヘムが形質細胞への分化を促進する分子機構の実体は、ヘムによる Bach2 の阻害機構ではないかと考えた。しかしながら、ヘムによる Bach2 の詳細な制御機構は不明である。更に液性免疫応答において、ヘムが担う制御上の役割も不明である。そこで本研究では、ヘムによる Bach2 の制御機構を生化学的アプローチにより解決し、液性免疫応答においてヘムが担う役割を個体レベルで示すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Bach2のヘム制御ドメイン決定：Bach2のCPモチーフ領域に着目し、様々な大腸菌発現系Bach2を構築する。分光解析、及び質量分析を検討しBach2のヘム制御領域を決定する。

(2) ヘム制御ドメイン欠失Bach2 (Bach2_de1H)とヘム制御ドメインの解析：(大腸菌発現系を用いた検討)ヘム制御ドメイン欠失Bach2についてEMSA、分光解析、円偏光二色性(CD)スペクトル解析、及び示差走査型熱量計(DSC)解析を行う。ヘム制御ドメインについてはCDスペクトルとDSC解析を行う。

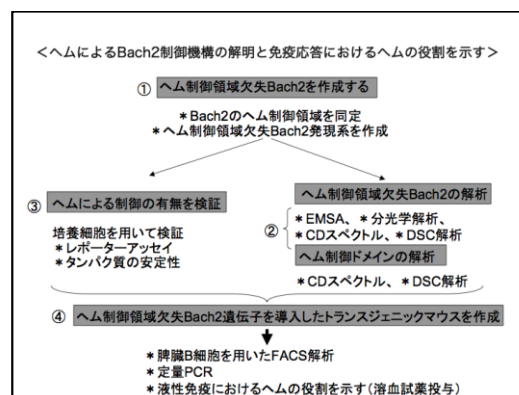
(3) ヘム制御ドメイン欠失Bach2 (Bach2_de1H)の解析(培養細胞を用いた検討)：Bach2_de1Hを培養細胞で過剰発現させ、ヘム存在化で培養した時のBach2_de1H転写抑制能を検討する。同時に野生型Bach2と比較検討することでヘムに制御されるか否かを検証する。またヘム存在化でBach2_de1Hタンパク質の量的変化を野生型Bach2と比較検討する。

(4) ヘム制御ドメイン欠失Bach2を発現するトランスジェニックマウス(Bach2_de1Hマウス)の作出：ヘム制御ドメイン欠失Bach2をB細胞特異的に発現するトランスジェニックマウス(Bach2_de1Hマウス)を作成する。Bach2ノックアウトマウスと交配させ、Bach2ノックアウトB細胞でヘム制御領域欠失Bach2を発現させる。その後ヘム存在化における標的遺伝子の発現、及

び形質細胞への分化促進頻度について、野生型マウスと比較検討する。更にマウスへの溶血試薬投与実験を行い、ヘムの液性免疫応答における役割を検証する。

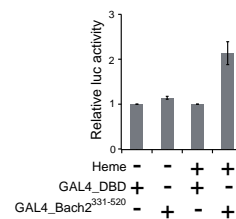
4. 研究成果

ヘムによるBach2の制御機構を明らかにするために、大腸菌発現系を用いて、Bach2の様々なアミノ酸領域について発現・精製を行なった。精製したbach2タンパク質に対し、プロテアーゼによる限定分解、ヘム結合様式について分光測定を行ない、ヘムに制御されるBach2タンパク質のアミノ酸領域を同定した。同定された「ヘム制御ドメイン」については、円偏光二色性スペクトル、動的光散乱



測定等の結果から天然変性タンパク質であることが示された。更に「ヘム制御ドメイン」について小角散乱測定を行い、Bach2の天然変性領域にヘムが結合すると、ヘム結合に伴うBach2の構造変化を示す結果が得られた。

更に、「ヘム制御ドメイン」についてGAL4融合タンパク質を用いたリポーターアッセイを行った。その結果、細胞内ヘム濃度上昇時にはこの領域が転写活性化ドメインとしての作用を獲得することが示された



(右図)。以上の結果から、ヘム結合によりBach2の天然変性領域が構造変化を引き起こし、Bach2の転写機能を制御することが考えられた。

「ヘム制御ドメイン」欠損トランスジェニックマウスを作成しBach2の転写抑制機構にどのような影響を与えるか検討した。その結果、野生型と比較して「ヘム制御ドメイン」欠損マウス

とでは、Bach2の直接標的遺伝子のmRNA発現に大きな変化はみられなかった。研究期間内で、ヘムによるBach2の構造変化について、物理学的な手法を中心に明らかにすることができた。しかし、トランスジェニックマウスを用いた検証では、ヘムによるBach2の構造変化の意義について明らかにすることはできなかった。今後は、生体内における「ヘムによるBach2の構造変化」が及ぼす影響について、「ヘム制御ドメイン」と相互作用する因子の同定を行うことで明らかにしていく予定である。

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1件)

M. Watanabe-Matsui, A. Muto, T. Matsui, A. Itoh-Nakadai, O. Nakajima, K. Murayama, M. Yamamoto, M. Ikeda-Saito, and K. Igarashi, Heme regulates B cell differentiation, antibody class switch, and heme oxygenase-1 expression in B cells as a ligand of Bach2. , *Blood*, 117 p5438-5448 (2011) 査読有り DOI: 10.1182/blood-2010-07-296483.

[学会発表] (計7件)

1. 松井(渡部)美紀、村山和隆、松井敏高、齋藤正男、武藤哲彦、五十嵐和彦 ヘムによる天然変性タンパク質の制御 第85回日本生化学会大会 2012年12月14-16日 福岡

2. 羽田浩士、白木琢磨、渡部美紀、五十嵐和彦 組換えヘモペキシンを用いた細胞外ヘムによる遺伝子制御機構の解明 第85回日本生化学会大会 2012年12月14-16日 福岡

3. 村山和隆、渡部-松井美紀、松本崇、五十嵐和彦 X線小角散乱によるBach2タンパク質の構造変化の解析 日本蛋白質科学学会年会 2012年6月20-22日 名古屋

4. Hiroshi Hada, Takuma Shiraki, Miki Watanabe, Kazuhiko Igarashi Recombinant hemopexin binds heme and induces heme oxygenase-1 expression depending on endocytosis and Bach1 inactivation, 7th International Congress on Heme Oxygenases and Related Enzymes, Edinburgh, Scotland, 2012年5月28日-6月1日

5. 羽田浩士、白木琢磨、松井(渡部)美紀、五十嵐和彦 Establishment of an experimental system to investigate the mechanism of heme trafficking in endosome 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13-16日 横浜

6. 松井(渡部)美紀、村山和隆、松井敏高、齋藤正男、武藤哲彦、五十嵐和彦 転写抑制因子Bach2におけるヘム制御ドメインの解析 第84回日本生化学会大会 2011年9月21-24日 京都

7. 羽田浩士、白木琢磨、松井(渡部)美紀、五十嵐和彦 組み換えヘモペキシンを用いたヘム-ヘモペキシン複合体の調製と外来ヘムによる遺伝子制御機構の解明 第84回日本生化学会大会 2011年9月21-24日 京都

[図書] (計2件)

1. 武藤哲彦、松井(渡部)美紀、実験医学、活性酸素・ガス状分子による恒常性制御と疾患、2012年、2806-2813, 羊土社

2. 松井美紀、液性免疫におけるヘムの役割 東北医学雑誌 第124巻 p64-67 (2012)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 美紀 (MATSUI MIKI)

東北大学・大学院医学系研究科・助手

研究者番号：00455784

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：