

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440056

研究課題名(和文)ヘムオキシゲナーゼの翻訳後修飾による量的・質的制御と細胞保護との関係

研究課題名(英文)Regulation of heme oxygenase activity by posttranslational modification

研究代表者

東元 祐一郎(HIGASHIMOTO, Yuichiro)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：40352124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヘムオキシゲナーゼ(HO)は、細胞内のヘムを分解し、シグナル伝達物質としても注目されている一酸化炭素を生体内で生成する唯一の酵素である。本研究では、HO活性のタンパク質レベルでの制御機構を解明することを目的とし、その細胞寿命とそれを決定する因子の探索を試みた。その結果、1) HEK293細胞をプロテアソーム阻害剤で処理すると、HOの分解が抑制され細胞内寿命が延びること、2) HEK293細胞にHOとユビキチンを強発現させるとHOが高度にユビキチン化されることを見出し、3) 質量分析法、酵母Two-hybrid法、cDNAアレイ法により、HOと特異的に結合するユビキチンリガーゼTRC8を同定した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the cellular mechanism underlying the degradation of heme oxygenase-1 (HO-1). 1) The turnover of HO-1 induced in HEK293 was significantly attenuated by proteasome inhibitors, suggesting the involvement of a proteasome-mediated pathway. 2) High molecular weight ubiquitin conjugates were co-immunoprecipitated with HO-1 from HEK293 after proteasome inhibition. 3) HO-1 ubiquitination in HEK293 cells was enhanced by zinc chloride, but suppressed with a zinc chelator, suggesting the involvement of a RING-E3 ligase in this process. 4) We identified TRC8 as the E3 ligase responsible for HO ubiquitination and degradation using mass spectrometry, yeast two-hybrid assay and cDNA array.

研究分野：生化学

キーワード：ヘムオキシゲナーゼ 翻訳後修飾

### 1. 研究開始当初の背景

ヘムオキシゲナーゼ(HO)は、生体内で不要になったヘムを分解し、鉄イオン、ビリベルジン、一酸化炭素を生成するミクロソーム酵素である。多様な病態とHOの細胞保護作用との関係が注目される一方で、過度のHO発現はむしろ炎症を助長し、細胞障害を引き起こすことや、慢性骨髄性白血病など一部の腫瘍細胞では異常発現したHOが腫瘍増殖機構の一役を担っていることが報告されるようになった。しかしながらHOの活性調節のメカニズムの詳細は不明である。

### 2. 研究の目的

これまでHOは特異的抑制転写因子Bach-1によってmRNAレベルで主に制御されていると考えられてきたが、その機能はむしろ、ユビキチン分解などによる量的制御や、リン酸化、蛋白質間相互作用による質的制御によって厳密にコントロールされている可能性がある。本研究では、HO活性のタンパク質レベルでの制御機構を解明することを目的とし、その細胞寿命とそれを決定する因子の探索を試みた。

### 3. 研究の方法

(1) HOの細胞内寿命を検証する目的で、HOを強発現させたHEK293細胞とHO誘導剤であるコバルトポルフィリンIX(CoPPIX)で処理したHUVEC細胞を用意し、それぞれタンパク質合成阻害剤(CHX)で処理した後、6, 12, 18時間後におけるHOタンパク質の量をwestern blot法で定量した。さらに、各細胞をプロテアソーム阻害剤(MG132)で処理して、そのタンパク質寿命の変化を比較した。

(2) HOのユビキチン化を検証する目的で、HEK293細胞に、His-tagを付加したHOとHA-tagを付加したユビキチンとを共トランスフェクトし、MG132存在下、非存在下で培養した。その後、細胞を破碎し、サイトソル画分とミクロソーム画分とに分離してSDS-PAGE, western blotを行った。

(3) HOと特異的に結合するユビキチンリガーゼを同定する目的で、His-tagを付加したHOを強発現させたHEK293およびHUVEC細胞の細胞抽出液を抗His抗体で免疫沈降したのち、SDS-PAGE後に検出されたHO以外のバンドを切り出し、質量分析にてタンパク質の同定を行った。また、HO-1, HO-2をbaitとしたyeast two-hybrid法による相互作用タンパク質の同定を試みた。

(4) 同定したTRC8を大腸菌にて精製し、biolayer interferometry法を用いてHOとの相互作用を検討した。また、TRC8とHOをHEK293に強発現させた後、免疫沈降法によりその相互作用を確認した。さらに、TRC8に特異的なshRNAを作成し、HeLa細胞中のTRC8をノックダウンした後、HOの細胞寿命

について検証を行った。

### 4. 研究成果

(1) エキソジニアスに発現させたHOとCoPPIXによって発現誘導させたエンドジニアスなHOとともに、CHXで処理後の細胞内寿命は8時間程度と推定された。この結果は、タンパク質局在阻害剤(brefeldin A)及び各種リソソーム阻害剤(chloroquine, leupeptin, NH<sub>4</sub>Cl)存在下では影響をうけないことが確認された。さらに、プロテアソーム阻害剤であるMG132で処理すると、12時間後のHOタンパク質量がMG132非存在下では35%であるのに対し、MG132存在下では86%にまで上昇することがわかった。

(2) His-tagを付加したHOとHA-tagを付加したユビキチンとを共発現させた細胞抽出液をwestern blotした結果、高度にユビキチン化されたHOタンパク質の存在を確認した。HOタンパク質の分子量32kDaに対して、メインのバンドは47kDaに確認された。さらにそのユビキチン化されたHOは主としてミクロソーム画分で検出された。MG132で処理すると、ミクロソームだけでなく、サイトソル画分にもユビキチン化HOが蓄積していることがわかった。

(3) 質量分析法、yeast two-hybrid法、cDNAアレイ法を併用することによって、HOタンパク質と特異的に結合する13種類のタンパク質を同定することに成功した。その中には、ユビキチンリガーゼの1つであるTRC8が含まれていることがわかった。TRC8がHOと実際に相互作用し、HOをターゲット基質としていのかどうかを検証するため、リコンビナントTRC8を大腸菌より発現精製し、biolayer interferometry法を用いて相互作用を検討した。その結果、TRC8は、HOとKd=10<sup>-6</sup>Mで結合することが確認された。

(4) TRC8, HO, ユビキチンをHEK293細胞に共発現させると、ユビキチン化されたHOが著しく増加した。さらに、TRC8をノックダウンした細胞では、HOの発現レベルが5倍以上増加することも確認された。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計23件)

Taguchi, K, Fukami, K, Yamagishi, S, Higashimoto, Y, 以下7名: RAGE-DNA aptamer improves aldosteron-induced renal injury possibly via inhibition of rac1-mr axis in mice with hypertensive nephropathy. *Nephrol Dial Trans*, **30**, iii21-iii22 (2015) 査読有 DOI:10.1093/ndt/gfv144.5

Maeda, S, Matsui, T, Ojima, A, Suematsu, M, Higashimoto, Y, 以下2名: DNA aptamer raised against advanced glycation end

products (AGEs) prevents abnormalities in electroretinogram of experimental diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res*, **54**, 175-180 (2015) 査読有 DOI: 10.1159/000440768

Matsui, T, Joo, H.D, Lee, JM, Tao, WH, Higashimoto, Y, 以下 2 名: Development of a monoclonal antibody-based ELISA system for glyceraldehyde-derived advanced glycation end products. *Immunol Lett*, **161**, 141-146 (2015) 査読有 DOI: 10.1016/j.imlet.2015.08.008

Taira, J, Nakashima, Y, Yoshihara, S, Koga, S, Sueda, S, Higashimoto, Y, 以下 5 名: Improvement of heme oxygenase-1-based heme sensor for quantifying free heme in biological samples. *Anal Biochem*, **489**, 50-52 (2015) 査読有 DOI: 10.1016/j.ab.2015.08.004

Matsui, T, Ojima, A, Higashimoto, Y, 以下 3 名: Pigment epithelium-derived factor inhibits caveolin-induced interleukin-8 gene expression and proliferation of human prostate cancer cells. *Oncol Lett*, **10**, 2644-2648 (2015) 査読有 DOI: 10.3892/ol.2015.3568

Motomiya, Y, Higashimoto, Y, Suenaga, G, Ando, Y: C-terminal unfolding of an amyloidogenic  $\alpha_2$ -microglobulin variant: N6- $\alpha_2$ -microglobulin. *Amyloid*, **22**, 54-60 (2015) 査読有 DOI: 10.3109/13506129.2014.994057

Ojima, A, Matsui, T, Nakamura, N, Higashimoto, Y, 以下 4 名: DNA aptamer raised against advanced glycation end products (AGEs) improves glycemic control and decreases adipocyte size in fructose-fed rats by suppressing AGE-RAGE axis. *Horm Metab Res*, **47**, 253-258 (2015) 査読有 DOI: 10.1055/s-0034-1385904

Matsui, T, Oda, E, Higashimoto, Y, Yamagishi, SI: Glyceraldehyde-derived pyridinium (GLAP) evokes oxidative stress and inflammatory and thrombogenic reactions in endothelial cells via the interaction with RAGE. *Cardiovasc Diabetol*, **14**, 1-10 (2015) 査読有 DOI: 10.1186/s12933-014-0162-3

Taguchi, K, Fukami, S, Yamagishi, S, Higashimoto, Y, 以下 8 名: DNA-aptamer raised against RAGE blocks the progression of experimental diabetic nephropathy. *Atherosclerosis*, **235**, e239-e240 (2014) 査読有 [http://dx.DOI.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.05.714](http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.05.714)

Taira, J, Higashimoto, Y: Evaluation of in vitro properties of predicted kinases

that phosphorylate serine residues within nuclear localization signal 1 of HMGB1. *J Pept Sci*, **20**, 613-617 (2014) 査読有 DOI: 10.1002/psc.2630

Taira, J, Higashimoto, Y: Phosphorylation of Grb14 BPS domain by GSK-3 correlates with complex forming of Grb14 and insulin receptor. *J Biochem*, **155**, 353-360 (2014) 査読有 DOI: 10.1093/jb/mvu011

Sugishima, M, Sato, H, Higashimoto, Y, 以下 4 名: Structural basis for the electron transfer from an open form of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase to heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **111**, 2524-2529 (2014) 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1322034111

Ojima, A, Matsui, T, Maeda, S, Takeuchi, M, Inoue, H, Higashimoto, Y, Yamagishi, SI: DNA aptamer raised against advanced glycation end products inhibits melanoma growth in nude mice. *Lab Invest*, **94**, 422-429 (2014) 査読有 DOI: 10.1038/labinvest.2014.5

Ojima, A, Higashimoto, Y, Matsui, T, Yamagishi, SI: DNA aptamer raised against advanced glycation end products inhibits neointimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries. *Int J Cardiol*, **171**, 443-446 (2014) 査読有 DOI: 10.1016/j.ijcard.2013.12.143

Matsui, T, Higashimoto, Y, Yamagishi, SI: Laminin receptor mediates anti-inflammatory and anti-thrombogenic effects of pigment epithelium-derived factor in myeloma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **443**, 847-851 (2014) 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.060

Matsui, T, Higashimoto, Y, Taira, J, Yamagishi, SI: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) binds to caveolin-1 and inhibits the pro-inflammatory effects of caveolin-1 in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **441**, 405-410 (2013) 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.074

Higashimoto, Y, Matsui, T, 以下 5 名: Blockade by phosphorothioate aptamers of advanced glycation end products-induced damage in cultured pericytes and endothelial cells. *Microvasc Res*, **90**, 64-70 (2013) 査読有 DOI: 10.1016/j.mvr.2013.08.010

Ishibashi, Y, Matsui, T, Maeda, S, Higashimoto, Y, Yamagishi SI: Advanced glycation end products evoke endothelial cell damage by stimulating soluble dipeptidyl peptidase-4 production and its

interaction with mannose 6-phosphate /insulin-like growth factor II receptor. *Cardiovasc Diabetol*, **12**, 125-134 (2013) 査読有 DOI: 10.1186/1475-2840-12-125

Taira, J, Kida, Y, Kuwano, K, Higashimoto, Y: Protein phosphatase 2A dephosphorylates phosphoserines in nucleocytoplasmic shuttling and secretion of high mobility group box 1. *J Biochem*, **154**, 299-308 (2013) 査読有 DOI: 10.1093/jb/mvt056

Kaida, Y, Fukami, K, Matsui, T, Higashimoto, Y, 以下 10 名: DNA aptamer raised against AGEs blocks the progression of experimental diabetic nephropathy. *Diabetes*, **62**, 3241-3250 (2013) 査読有 DOI: 10.2337/db12-1608

⑲ Kida, Y, Taira, J, Yamamoto, T, Higashimoto, Y, Kuwano, K: EprS, an autotransporter protein of *Pseudomonas aeruginosa*, possessing serine protease activity induces inflammatory responses through protease-activated receptors. *Cell Microbiol*, **15**, 1168-1181 (2013) 査読有 DOI: 10.1111/cmi.12106

⑳ Taira, J, Higashimoto, Y: Caveolin-1 interacts with protein phosphatase 5 and modulates its activity in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **431**, 724-728 (2013) 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.01.051

㉑ Koga, S, Yoshihara, S, Bando, H, Yamasaki, K, Higashimoto, Y, 以下 4 名: Development of a heme sensor using fluorescently labeled heme oxygenase-1. *Anal Biochem*, **433**, 2-9 (2013) 査読有 DOI: 10.1016/j.ab.2012.10.002

[学会発表](計 35 件)

東元祐一郎、尾嶋 亜弥子、以下 3 名「AGE アプタマーのバルーン障害後血管リモデリングに対する効果」第 89 回日本薬理学会年会 2016 年 3 月 10 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

松井孝憲、東元祐一郎、以下 2 名「GLAP は HUVEC において RAGE を介した酸化ストレスと炎症性反応と血栓性反応の増悪を引き起こす」第 88 回日本生化学会大会(BMB2015) 2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

東元祐一郎、尾嶋 亜弥子、以下 3 名「AGE アプタマーはバルーンにより損傷したラット頸動脈中における新生血管内膜の過形成を抑制する」第 88 回日本生化学会大会(BMB2015) 2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

平順一、和田翔太、福島祐也、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 2015 年 11 月 16 日、平塚市公民館(神奈川県平塚市)

下川千寿、原田沙織、佐藤秀明、杉島正一、原田二郎、東元祐一郎、以下 2 名「ヒト由来ペプチドアミド化酵素 PAM に対する癌代謝物の阻害効果」第 9 回バイオ関連化学シンポジウム 2015 年 9 月 11 日、熊本大学(熊本県熊本市)

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 2015 年 5 月 17 日、九州大学(福岡県福岡市)

平順一、東元祐一郎、坂本寛「Grb14 BPS ドメイン内部のリン酸化はインスリン受容体との複合体形成に影響する」平成 27 年度日本生化学会九州支部例会 2015 年 5 月 17 日、九州大学(福岡県福岡市)

東元祐一郎、松井孝憲、以下 5 名「終末糖化産物(AGEs)特異的 DNA アプタマーはヌードマウスにおけるメラノーマ増殖を抑制する」第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 18 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

平順一、坂本寛、東元祐一郎「Effect of glycogen synthase kinase 3 on the complex forming between growth factor receptor bound protein 14 and insulin receptor」第 51 回ペプチド討論会 2014 年 10 月 22 日、徳島大学(徳島県徳島市)

東元祐一郎、松井孝憲、以下 5 名「終末糖化産物(AGEs)特異的 DNA アプタマーはヌードマウスにおけるメラノーマ増殖を抑制する」第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 16 日、京都国際会議場(京都府京都市)

松井孝憲、東元祐一郎、平順一、山岸昌一「PEDF は内皮細胞のカベオリン-1 による炎症誘発作用を阻害する」第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 16 日、京都国際会議場(京都府京都市)

杉島正一、小松将大、坂本寛、安永卓生、佐藤秀明、東元祐一郎、以下 5 名「NADPH-シトクロム P450 還元酵素とヘムヘムオキシゲナーゼ複合体との相互作用および電子伝達機構」第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 16 日、京都国際会議場(京都府京都市)

東元祐一郎「核酸アプタマーのスクリーニングと疾患モデル動物への応用」北海道大学 Ambitious leaders program 物質科学セミナー招待講演 2014 年 9 月 24 日、北海道大学(北海道札幌市)

杉島正一、佐藤秀明、東元祐一郎、以下6名「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に関する構造基盤」第14回日本蛋白質科学会年会 2014年6月25日、ワークピア横浜(神奈川県横浜市)

杉島正一、佐藤秀明、東元祐一郎、以下6名「NADPH-シトクロム P450 還元酵素とヘムオキシゲナーゼの複合体構造」第41回生体分子科学討論会 2014年6月6日、九州大学(福岡県福岡市)

杉島正一、佐藤秀明、東元祐一郎、以下6名「NADPH-シトクロム P450 還元酵素からヘム-ヘムオキシゲナーゼ複合体への電子伝達に関する構造基盤」平成26年度日本生化学会九州支部例会 2014年5月17日、九州大学(福岡県福岡市)

小松英幸、山本真平、奥田真孝、東元祐一郎、坂本寛「ヘムオキシゲナーゼ-1のヘム結合における静電相互作用のエネルギー論評価」平成26年度日本生化学会九州支部例会 2014年5月17日、九州大学(福岡県福岡市)

平順一、東元祐一郎「Grb14によるインスリンシグナル抑制へのGSK-3の関与」平成26年度日本生化学会九州支部例会 2014年5月17日、九州大学(福岡県福岡市)

平順一、東元祐一郎「Grb14によるインスリン受容体の阻害へのGSK-3の関与」第94回日本化学会春季年会 2014年3月14日、名古屋大学(愛知県名古屋市)

東元祐一郎、平順一「カベオリン1との相互作用によるプロテインホスファターゼ5の酵素活性の亢進」第94回日本化学会春季年会 2014年3月14日、名古屋大学(愛知県名古屋市)

⑲ 原田二郎、佐藤秀明、杉島正一、原田英里砂、東元祐一郎、以下2名「ヘムオキシゲナーゼの基質ポケットから離れた分子表面のLeu77はビリベルジンの親和性に関与する」第94回日本化学会春季年会 2014年3月14日、名古屋大学(愛知県名古屋市)

⑳ 東元祐一郎、甲斐田裕介、松井孝憲、以下5名「AGEs特異的DNAアプタマーによる糖尿病性腎症の進展抑制効果」第87回日本薬理学会年会 2014年3月21日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

㉑ 和田翔太、福島祐也、東元祐一郎、以下4名「Surface Plasmon Resonance Analysis of Interaction of Heme Oxygenase-2 and NADPH-Cytochrome P450 Reductase」第50回ペプチド討論会 2013年11月7日、ホテル阪急エキスポパーク(大阪府吹田市)

㉒ 杉島正一、東元祐一郎、以下3名「NADPH-シトクロム P450 還元酵素-ヘム-ヘムオキシゲナーゼ複合体の結晶構造解析に向けて」平

成25年度日本結晶学会年会 2013年10月17日、熊本大学(熊本県熊本市)

㉓ 東元祐一郎、平順一「カベオリン1はPC-3細胞中でプロテインホスファターゼ5と相互作用し内在性の活性化因子として作用する」第86回日本生化学会大会 2013年9月11日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

㉔ 小松英幸、奥田真孝、山本真平、東元祐一郎、坂本寛「ヘムオキシゲナーゼ-1のヘム結合のエネルギー論」第86回日本生化学会大会 2013年9月11日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

㉕ 和田翔太、東元祐一郎、末田慎二、小松英幸、坂本寛「ヘムオキシゲナーゼ-2とシトクロム P450 還元酵素の相互作用におけるビリベルジンの影響」第86回日本生化学会大会 2013年9月11日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

㉖ 原田二郎、佐藤秀明、原田英里砂、東元祐一郎、以下3名「Ala置換変異によってヘムオキシゲナーゼ活性が上昇するLeu77の機能解析」第86回日本生化学会大会 2013年9月11日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

㉗ 杉島正一、東元祐一郎、以下5名「Hinge欠損型NADPH-シトクロム P450 還元酵素とヘムオキシゲナーゼ間の相互作用」第86回日本生化学会大会 2013年9月11日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

㉘ 小松英幸、奥田真孝、山本真平、東元祐一郎、坂本寛「ヘムオキシゲナーゼのヘム結合の置換等温滴定熱測定による熱力学的解析」平成25年度日本生化学会九州支部例会 2013年5月18日、佐賀大学(佐賀県佐賀市)

㉙ 中島幸徳、古賀真也、東元祐一郎、以下3名「ヘムセンサーとしての青色蛍光蛋白質融合型heme oxygenase-1の作製」平成25年度日本生化学会九州支部例会 2013年5月18日、佐賀大学(佐賀県佐賀市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東元祐一郎 (HIGASHIMOTO, Yuichiro)  
久留米大学・医学部・教授  
研究者番号: 40352124

### (2) 研究分担者

松井 孝憲 (MATSUI, Takanori)  
久留米大学・医学部・講師  
研究者番号: 10425233

平 順一 (TAIRA, Junichi)  
九州工業大学・情報工学部・助教  
研究者番号: 20549612  
(平成26年度まで)