

ヘムによる翻訳開始因子制御の分子機構¹

五十嵐 城太郎

福島県立医科大学医学部自然科学講座（生物学）

ヘムは様々な酵素の活性に必要なだけでなく、ヘム自身が情報伝達分子として働いている。細胞内でのヘムの濃度は、ヘムセンサータンパク質によって厳密に制御されている。ヘム調節インヒビターHRIはヘムセンサータンパク質の1つであり、赤血球前駆体において、ヘモグロビン合成の調節を行っている。即ち、ヘムの濃度が減少するとHRIは翻訳開始因子をリン酸化することで、グロビンタンパク質の合成を抑制する。HRIの機能調節について、分子レベルでの機構を解明するために、HRIにおけるヘムの結合性と自己リン酸化反応についてまとめた。さらに、臨床医学と関連した、HRIのがん組織における働きと、治療を目的とした創薬についても述べる。

1. はじめに

生体内にはヘム（プロトポルフィリン IX 鉄錯体：図1）を含むミオグロビン、ヘモグロビン、シトクロム c、シトクロム P450 など多くの重要なヘムタンパク質が知られている。これらはそれぞれ、酸素がヘムに可逆的に結合する、ヘムが酸素を活性化し異物代謝する、電子移動がヘムを介して進行するなど、ヘム自身が機能の中心的な役割を果たす。一方、ヘムが合成されてから、タンパク質へと導入される過程はほとんど明らかになっていない[1]。最近、ヘム自身がタンパク質から結合・解離によって移動し、ヘム自身がリガンドとして機能するという新規の機能を持つヘムタンパク質が次々に発見されている。それらは、ヘムセンサータンパク質と呼ばれている。

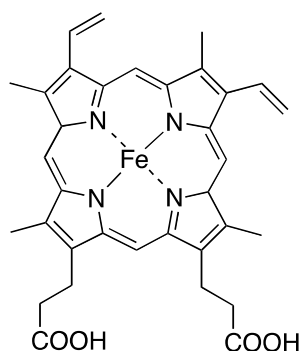


図1：ヘムの構造

ヘムセンサータンパク質には、ヘムの結合が転写を制御する Bach1 が良く知られている。これは細胞中のヘムの濃度を感知して、ヘム分解酵素（ヘムオキシゲナーゼ:HO）の転写を制御する[2]。即ち、通常 Bach1 は HO の転写を抑制しているが、細胞内ヘム濃度が上昇すると、Bach1 はヘムと結合し、DNA から解離する。その結果、HO 遺伝子の転写が促進され、細胞内の過剰なヘムは HO によって分解される。また、細胞内の鉄濃度をヘムの結合により感知する IRP2 も知られている[3]。さらに、生物時計に関連した糖代謝[4-6]、micro RNA 結合タンパク質[7]などにおいても、ヘムの結合と解離が機能を制御すると報告されている。

ヘム調節インヒビター、HRI（heme-regulated inhibitor）は真核生物翻訳開始因子（eIF）の1つ eIF2 α を基質として、リン酸化を行うキナーゼの1つである[8]。真核生物が、栄養不足、ウイルス感染、紫外線照射、変性タンパク質の蓄積など、危機状態に陥った場合、タンパク質の翻訳開始を阻害することによって、タンパク質の合成を中止させる。HRI は網状赤血球内で、ヘム濃度に応じてヘモグロビンの合成量を制御するキナーゼである。網状赤血球では、

16 ¹ 本論文は、2011 年 9 月 27 日 基礎合同セミナー2011・第 21 回総合科学研究会において講演された内容をもとにまとめられたものである。

ヘム合成が阻害されヘム濃度が減少すると、ヘム濃度の減少を感知して、ヘム：グロビンタンパク質を 1:1 に保つために HRI が eIF2 α をリン酸化する(図 2)。

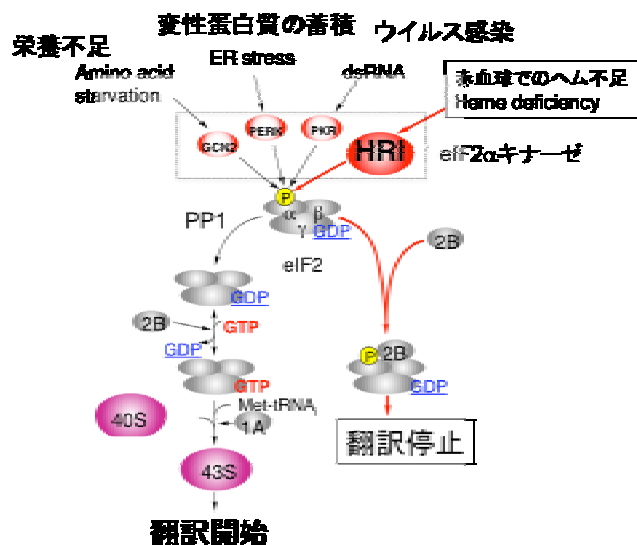


図 2 : eIF2 α キナーゼファミリーによる翻訳制御

ストレス条件下で重要な生理的役割を果たす HRI であるが、その機能調節については不明な点が多い。筆者らは、HRI についてヘムが結合する部位・数、そして機能調節に関わるリン酸化の部位を明らかにしてきた。本論文では、HRI の分子メカニズムの解明について 2-5 節において、臨床応用を目指した研究について 6, 7 節で述べる。

2. HRI のヘム結合[9,10]

ヘムセンサータンパク質のヘム結合部位には共通の特徴がある。ほとんどの場合、ヘム鉄 3 価時のヘム結合部位 (ヘム受容部位、ヘムセンシング部位、軸配位子) はシトクロム P450 と同じくシステインである。システイン (Cys) とプロリン (Pro) が隣り合った CP モチーフはヘムセンサータンパク質でのヘム結合部位の場合もある。しかし、最近発見されたヘムセンサータンパク質では、必ずしも CP モチーフがヘム結合部位になっているわけではない。

大腸菌に HRI 遺伝子を含むプラスミド DNA を導入し、タンパク質の発現を行った。HRI はアフィニ

ティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製し、培地 1 L 当たり約 1 mg の収量で得られた。また、精製した HRI は活性型 (自己リン酸化によるリン酸化型) であった。以下の節においても同様の HRI サンプルを用いて研究を行った。

HRI はアミノ酸 619 残基からなり、N 末端ドメインとキナーゼドメインから構成されており、HRI とヘムは 1:1 に結合する[11]。ヘム結合に関与すると考えられるアミノ酸は、Cys 及びヒスチジン (His) と考えられ、それぞれキナーゼドメイン、N 末端ドメインに存在する。全長型 HRI には 9 個の Cys、20 個の His があるが、そのうち 6 個の Cys がキナーゼドメインに、7 個の His が N 末端ドメインに位置する。Cys をセリン (Ser)、His をアラニン (Ala) へと置換した 13 種類の変異体を作製し、そのヘム結合性を吸収スペクトル及び円二色性スペクトルを測定した。

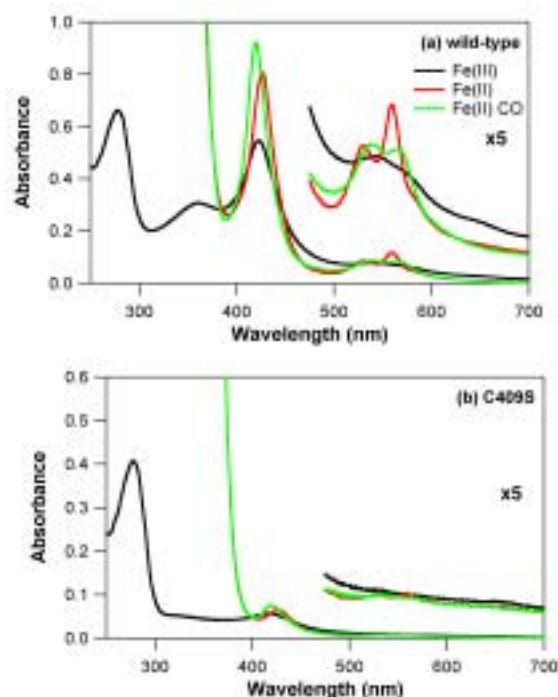


図 3 : ヘム結合型 HRI の吸収スペクトル

(a) 野生型, (b) Cys409Ser 変異体

初めに、Cys208、385、409、464、491、550 の変異体の内、Cys409Ser 変異体のみが、野生型と比べて吸収スペクトルにおいて違いが生じた(図 3)。

Cys409 は CP モチーフと呼ばれるヘム結合配列に位置しており, Pro410 を Ala へ変異した場合も同様に, ヘムの結合能が無くなった。また, CP モチーフによるヘムの結合を直接観測できたことは極めて重要である。次に, His75, 78, 80, 86, 119, 120, 126 を Ala へと置換した変異体では, ヘム結合に顕著な違いは見出されなかった。しかし, His119 及び His120 の両方を Ala へと置換した場合, ヘム結合能は大きく減少した。この結果より, His119 または His120 がヘムの軸配位子である可能性が示唆された。円二色性スペクトルより, His119Ala 変異体と His120Ala 変異体を比較したところ, His119 変異体が野生型, His120 変異体とやや異なるスペクトルを与えた。以上より, HRI に結合したヘムは, キナーゼドメインの Cys409 と N 末端ドメインの His119 もしくは His120 によって配位していることが推測された。

3. HRI の自己リン酸化[12]

大腸菌を用いて発現, 精製を行った HRI は既に自己リン酸化しており, リン酸化が HRI に与える影響を評価できない。そこで, 活性・リン酸化型 HRI に対して脱リン酸化酵素を使って, 不活性・非リン酸化型 HRI を調製した。また, 自己リン酸化部位と考えられる Ser/トレオニン (Thr) もしくはチロシン (Tyr) 残基の同定を行った。

λ プロテインフォスファターゼを用い, 脱リン酸化した HRI を調製した。ATP を加えて再び自己リン酸化する反応, 及びヘムによる eIF2α キナーゼ活性の阻害を調べた。ヘムは eIF2α リン酸化だけでなく, HRI の自己リン酸化にも阻害作用を及ぼすことが明らかになった (図 4)。

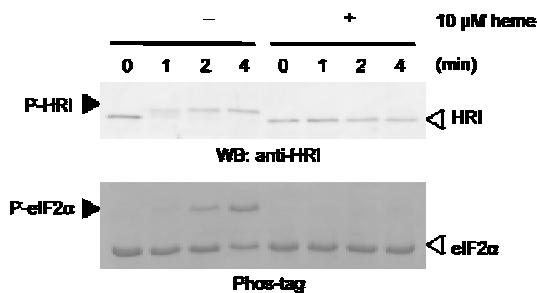
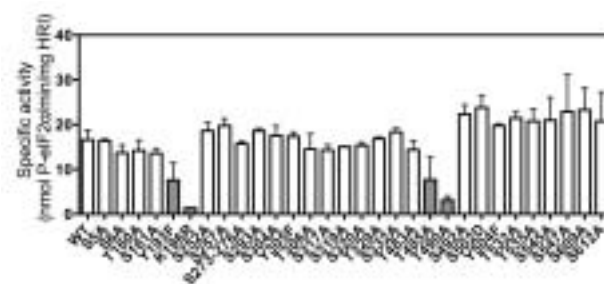


図 4: HRI の自己リン酸化と基質 eIF2α リン酸化

ヘム非存在下では, HRI の自己リン酸化に続き eIF2α のリン酸化が起こる (左)。一方, ヘム存在下では, 自己リン酸化・eIF2α リン酸化が阻害される (右)。上段は HRI の自己リン酸化を HRI 抗体で検出, 下段は Phos-tag アクリルアミドゲルを用い, eIF2α のリン酸化に伴うバンドシフトを検出した。



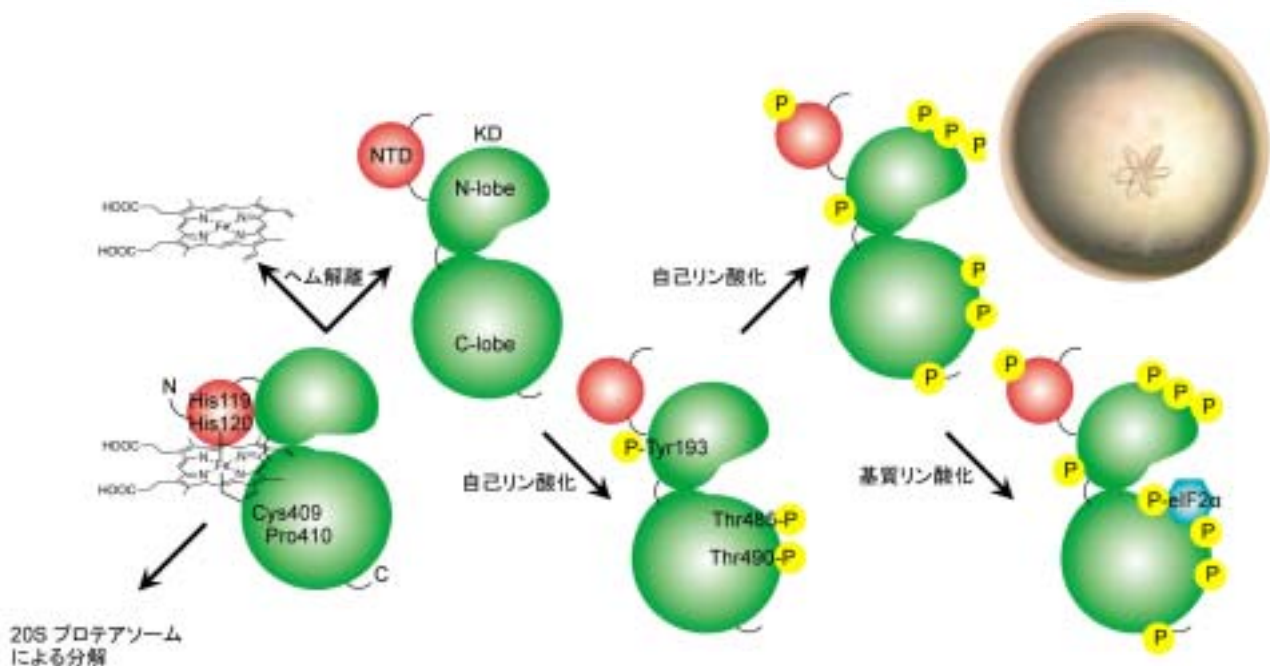


図 6：ヘム濃度認識に関わる HRI のヘム・自己リン酸化・分解による制御

細胞中のヘム濃度が十分な状況では，HRI はヘムを結合した不活性型であり，20S プロテアソームによる分解を受けている。しかし，ヘムが減少すると，HRI からヘムが解離し，N 末端ドメイン（赤）とキナーゼドメイン（緑）の間の相互作用が解消する。それに引き続き，Tyr193, Thr485, Thr490 の自己リン酸化が起こる。さらに，他の Ser, Thr においても自己リン酸化が進行し，最終的に基質 eIF2 α をリン酸化する活性化型 HRI へと移行する。eIF2 α はリン酸化を受けると，タンパク質の翻訳開始段階においてタンパク質の合成を停止する。これら一連の機構によって，赤血球中のグロビタンパク質の合成量がヘムの量に応じて調節されている。

4. HRI の構造変化[10]

ヘムの結合に伴う構造変化を明らかにするために，HRI の N 末端ドメインとキナーゼドメインとの間の相互作用について，His タグと Ni アフィニティカラムを用いたプルダウンアッセイを行った。その結果，N 末端ドメインとキナーゼドメインの間には，ヘム存在下でのみ相互作用が発生し，ヘム非存在下では，この相互作用が消失することが明らかになった。

以上の結果をもとに，HRI の機能調節モデルを図 6 に示した。HRI がヘム濃度を感知する機能は，ヘムが 2 つのドメイン間相互作用を介在することによって行われる。即ち，正常状態では，ヘム濃度が十分に高く，ヘムは N 末端ドメインとキナーゼドメインの両方に結合して，キナーゼ活性が抑制される。しかし，ヘム濃度が低下すると，ヘムは HRI のキナ

ーゼ活性部位より解離し，その結果，活性部位が露出して，キナーゼ活性が発現する。このドメイン間相互作用が活性制御に重要であることは，N 末端ドメイン欠損変異体の活性から示唆される。

5. HRI の X 線結晶構造解析

HRI の 3 次元構造を解明するために，全長型 HRI の結晶化を行っている。700 種類の条件探索を行った結果，ヒット条件が得られた（図 6 右上）。低分解能の回折データしか得られておらず，分解能向上のため結晶化条件・凍結保護剤の最適化を行っている。高分解能のデータを取得し，全長型 HRI の立体構造を目指している。

6. ヒト HRI と疾患

ヒトキナーゼの DNA 配列データベースにおいて，

タンパク質中のアミノ酸が別のアミノ酸へと変異する、ミスセンス変異が多数報告されている。特に HRI においては 202 番目のグリシン (Gly) が Ser へと変異している[13]。この変異 Gly202Ser の変異が活性に与える影響を調べるために、部位特異的変異体の作製し、野生型と同様に発現・精製を行った。

Gly202Ser 変異体は野生型と比較して、有意に活性が上昇していた。活性増大の原因として、基質 (ATP, eIF2 α) の親和性、阻害剤 (ヘム) の作用に違いが見られることが予想された。そこで、基質・阻害剤の濃度に対する酵素活性を測定した。その結果、Gly202Ser 変異体において、ATP の親和性が野生型と比較して 4 倍ほど上昇することが明らかになった。一方、eIF2 α 、ヘムの親和性・阻害能については、Gly202Ser と野生型の間に差は見られなかった。この変異が肺がん組織において HRI の機能・発現亢進に関連していると考えられる。

7. HRI を標的とした創薬

eIF2 α キナーゼは創薬のターゲットとして、様々な阻害剤もしくは活性化剤が設計・合成されている[14-18]。また、HRI は肺がん組織において発現が亢進することが免疫組織化学染色によって確認されている。

X 線結晶構造解析によって、HRI の立体構造が明らかにになれば、立体構造をもとにした創薬が可能となる。また、他の eIF2 α キナーゼの立体構造を比較することで、HRI 選択的な薬剤の開発も期待される。

8. おわりに

HRI の生理的な機能については、標準的な生化学・分子生物学の教科書に取り上げられている。HRI は発見から 40 年以上経過した現在においても、その分子機構については不明な点が多い。また、研究の進展に伴って、HRI と相互作用をするタンパク質 (Hsp90, OGFOD1) が多く発見されている。今後は、

HRI とこれらのタンパク質によるタンパク質-タンパク質間相互作用を解析することで、新たな研究を進めていきたい。

謝辞

本研究は、清水透名誉教授 (東北大学多元物質科学研究所) のもとで行なわれた。清水教授及び同研究室の大学院生に心から感謝する。質量分析については日立ハイテクノロジーズに協力頂いた。本研究は文部科学省科学研究費補助金若手研究 (B)、同新学術領域研究による支援を受けた。また、本研究の一部は、上原記念生命科学財団、武田科学振興財団による補助を受けた。

文献

- [1] Severance, S., and Hamza, I. (2009) *Chem. Rev.* **109**, 4596-4616
- [2] Igarashi, K., and Sun, J. (2006) *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 107-118
- [3] Evstatiev, R., and Gasche, C. (2012) *Gut* **61**, 933-952
- [4] Kaasik, K., and Lee, C. C. (2004) *Nature* **430**, 467-471
- [5] Yin, L., Wu, N., Curtin, J. C., Qatanani, M., Szwegold, N. R., Reid, R. A., Waitt, G. M., Parks, D. J., Pearce, K. H., Wisely, G. B., and Lazar, M. A. (2007) *Science* **318**, 1786-1789
- [6] Raghuram, S., Stayrook, K., Huang, P., Rogers, P., Nosie, A., McClure, D., Burris, L., Khorasanizadeh, S., Burris, T., and Rastinejad, F. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1207-1213
- [7] Faller, M., Matsunaga, M., Yin, S., Loo, J. A., and Guo, F. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 23-29
- [8] Chen, J.-J. (2007) *Blood* **109**, 2693-2699
- [9] Igarashi, J., Sato, A., Kitagawa, T., Yoshimura, T., Yamauchi, S., Sagami, I., and Shimizu, T. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 15752-15762
- [10] Igarashi, J., Murase, M., Iizuka, A., Pichierri, F., Martinkova, M., and Shimizu, T. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 18782-18791
- [11] Miksanova, M., Igarashi, J., Minami, M., Sagami, I., Yamauchi, S., Kurokawa, H., and Shimizu, T. (2006) *Biochemistry* **45**, 9894-9905
- [12] Igarashi, J., Sasaki, T., Kobayashi, N., Yoshioka, S., Matsushita, M., and Shimizu, T. (2011) *FEBS J.* **278**, 918-928
- [13] Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G. L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., Edkins, S., O'Meara, S., Vastrik, I., Schmidt, E. E., Avis, T., et al. (2007) *Nature* **446**, 153-158
- [14] Jammi, N. V., Whitby, L. R., and Beal, P. A. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 50-57
- [15] Bryk, R., Wu, K., Raimundo, B. C., Boardman, P. E., Chao, P., Conn, G. L., Anderson, E., Cole, J. L., Duffy, N. P., Nathan, C., and Griffin, J. H. (2011) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 4108-4114
- [16] Axten, J. M., Medina, J. R., Feng, Y., Shu, A., Romeril, S. P., Grant, S. W., Li, W. H. H., Heering, D. A., Minthorn, E., Mencken, T., Atkins, C., Liu, Q., Rabindran, S., Kumar, R., Hong, X., et al. (2012) *J. Med. Chem.* **55**, 7193-7207
- [17] Rosen, M., Woods, C., Goldberg, S., Hack, M., Bounds, A., Yang, Y., Wagaman, P., Phuong, V., Ameriks, A., Barrett, T., Kanelakis, K. C., Chang, J., Shankley, N., and

Rabinowitz, M. (2009) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 6548-6551

- [18] Chen, T., Ozel, D., Qiao, Y., Harbinski, F., Chen, L., Denoyelle, S., He, X., Zvereva, N., Supko, J. G., Chorev, M., Halperin, J. A., and Aktas, B. H. (2011) *Nat. Chem. Biol.* **7**, 610-616