

環境汚染物質による体内時計の破壊：ヘム-NO-蛋白合成 -時計遺伝子のクロストーク

Destruction of the biological clock system by environmental
contaminants: Crosstalk between heme, NO, protein synthesis
and clock genes

清水 透 (Shimizu Toru)

東北大学・多元物質科学研究所・教授



研究の概要

赤血球や脳などにヘムの濃度をセンスして蛋白合成を制御するヘムセンサー酵素、ヘム制御キナーゼ(HRI)がある。一方、前脳にはヘム結合転写制御因子(NPAS2)が存在し、体内時計の転写を制御する。本研究では、環境汚染物質やNOガスによるヘム合成・分解阻害、蛋白質合成、及び時計遺伝子転写制御の機構の時間的、空間的な相互作用を調べ、「睡眠障害」などの疾病の分子論的解明と治療等応用の可能性を探る。

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：ヘム鉄、蛋白合成、NO、時計遺伝子、転写因子、環境汚染、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景・動機

- (1) 赤血球、脳などにヘムの濃度をセンスして蛋白質合成を制御するヘム制御キナーゼ(HRI)がある。
- (2) ヘムの合成・分解反応は環境汚染物質、NOガス、COガス等によって阻害される。
- (3) HRIによる蛋白合成阻害の機構について、環境汚染物質、NOなどととの相互関係を明らかにする研究を行っていた。
- (4) ヘム結合転写制御因子(NPAS2)が前脳に存在し体内時計遺伝子の転写を制御すると報告された。

2. 研究の目的

- (1) 体内時計維持には、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必要である。
- (2) 環境汚染物質などによるヘム合成阻害、蛋白合成阻害、及び時計遺伝子を調節するヘム結合転写制御因子の機能の間の時間的、及び空間的な相互作用を明らかにする。
- (3) 「睡眠障害」「躁鬱病」「摂食障害」「メタボリックシンドローム」など時計遺伝子と関係ある疾病の分子論的解明と治療等応用への可能性を探る。

3. 研究の方法

- (1) マウス由来 HRI, 及び時計遺伝子に関わるヘム結合転写制御因子(NPAS2, mPer1, mPer2, mCry等)、及びガスセンサー*Ec* DOSの蛋白質を遺伝子操作して大腸菌で大量に合成させ、精製する。
- (2) 精製された酵素・蛋白質とヘム、ヘム合成中間体、ヘム合成分解中間体との相互作用を調べる。
- (3) NOガス、COガス、水銀などの環境汚染物質との相互作用を調べる。
- (4) 様々な変異体を構築し、蛋白質の機能、相互作用に関わるドメイン、及びアミノ酸を同定し、構造と機能の関係を調べる。
- (5) これらの基礎的な知見に基づいて、環境汚染物質による動物の日内活動との関係を調べる。

4. これまでの成果

- (1) ヘム鉄の不足という危機状態に対応して蛋白質の合成を制御するHRIの活性部位がシステインという硫黄を含むアミノ酸であり、水銀によりその機能が著しく阻害されることが明らかになった。
- (2) 時計遺伝子の転写を制御する重要なヘム結合蛋白質のNPAS2のヘム鉄結合部位もシステインで

あることが我々の以前の研究から示唆されていたが、他の重要な時計遺伝子転写制御因子である mPer1, mPer2 もヘム鉄結合蛋白質であり、その結合部位はシステインであることが明らかになった。

(3) ヘム鉄が NPAS2 より mPer2 へ移動することがいくつかの方法で確かめられた。この結果より、哺乳動物の前脳においてヘムの蛋白から蛋白への移動が時計遺伝子の制御に関わる可能性が試験内実験により示唆された。

(4) 酸素センサー酵素である *Ec* DOS が酸素を感じ、安定化し、酸素センサーとして機能する分子的機構を明らかにした。

(5) 予備的な結果であるが、動物の日内活動に環境汚染物質が著しい影響を与える可能性が、動物実験より示唆された。

5. これまでの進捗状況と今後の計画

(1) マウス由来の蛋白合成や時計遺伝子に関係あるヘム蛋白質、及び大腸菌由来のガスセンサー酵素の大腸菌での大量発現、精製、部位特異的変異に成功し、ヘム結合の部位とその機能を解明した。

(2) 予備的であるが、マウスの日内行動が環境汚染物質により変化した結果を得た。

(3) 今後は、これらのヘム蛋白質のガスセンシング、及び環境汚染物質との相互作用をさらに詳細に調べ総合的な考察を試みる。

(4) マウスの日内活動とヘム蛋白質、環境汚染物質との関係をさらに詳細に調べ、又汚染物質により障害を受けた場合、その修復も試薬を用いて試みる予定である。

6. これまでの発表論文等

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1. M. Martinkova, J. Igarashi, **T. Shimizu**, “Eukaryotic initiation factor 2 α kinase is a nitric oxide-responsive mercury sensor enzyme: Potent inhibition of catalysis by the mercury cation and reversal by nitric oxide”, *FEBS Lett.*, 581, 4109-4114 (2007).

2. A. Tanaka, H. Takahashi, **T. Shimizu**, “Critical role of the heme axial ligand, Met95, in locking catalysis of the phosphodiesterase from *Escherichia coli* (*Ec* DOS) toward cyclic diGMP”, *J. Biol. Chem.*, 282, 21301-21307(2007).

3. K. Hirai, M. Martinkova, J. Igarashi, I. Saiful, S. Yamauchi, S. El-Mashtoly, T. Kitagawa, **T. Shimizu**, “Identification of Cys385 in the isolated kinase insertion domain of heme-regulated eIF2 α kinase (HRI) as the heme axial ligand by site-directed mutagenesis and spectral characterization”, *J. Inorg. Biochem.*, 101, 1172-1179 (2007).

4. S. F. El-Mashtoly, H. Takahashi, **T. Shimizu**, T. Kitagawa, “Ultraviolet Resonance Raman Evidence for Utilization of the Heme 6-Propionate Hydrogen-Bond Network in Signal Transmission from Heme to Protein in *Ec* DOS Protein”, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 3556-3563 (2007).

5. J. Igarashi, K. Kitanishi, M. Martinkova, M. Murase, A. Iizuka, **T. Shimizu**, “The Roles of Thiolate-Heme Proteins, Other Than the P450 Cytochromes, in the Regulation of Heme-Sensor Proteins”, *Acta Chim. Slo.*, 55, 67-74 (2008).

6. H.-P. Hersleth, A. Varnier, E. Harbitz, A. K. Rohr, P. P. Schmidt, M. Sorlie, H. Cederkvist, S. Marchal, A. C. F. Gorren, B. Mayer, T. Uchida, V. Schunemann, T. Kitagawa, A. X. Trautwein, **T. Shimizu**, R. Lange, C. H. Gorbitz, K. K. Andersson, “Reactive complexes in myoglobin and nitric oxide synthase”, *Inorg. Chim. Acta*, 361, 831-843 (2008).

7. 五十嵐城太郎, 田中敦成, 清水透 「ドメイン間相互作用による酵素活性の制御」 生体の科学, 58, 354-356 (2007).

Toru Shimizu, *Diploma Honors*, Univ. of Medicine and Pharmacy Tirgu-Mures, Romania (2007. 6. 9).

ホームページ等

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