

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06116

研究課題名（和文）ヘム合成酵素ALAS1のミトコンドリアにおけるヘム依存的分解メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of heme-dependent degradation mechanisms of ALAS1, mitochondrial heme synthesis enzyme

研究代表者

久保田 美子 (Kubota, Yoshiko)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30260102

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヘムは鉄原子を持ち、様々なタンパク質と結合してその機能を調節する重要な分子であるが、過剰なヘムはDNAやタンパク質の酸化損傷を引き起こす。したがって、ヘム生合成の調節は生体にとって重要である。我々は、ヘム合成の初発酵素アミノレブリン酸合成酵素がヘム濃度依存的に分解されることを見出した。今回の研究では、分解酵素によるヘム結合型アミノレブリン酸合成酵素の認識メカニズムの一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアに存在するアミノレブリン酸合成酵素には、酵素活性を持つ触媒領域以外に90アミノ酸からなる分解酵素認識配列が存在することを初めて見出した。この配列を任意のタンパク質に融合させると、ヘムを投与することによってこのタンパク質の分解を誘導することが可能である。この発見により、ミトコンドリアにおけるタンパク質分解を制御できるツールが得られたと言える。

研究成果の概要（英文）：Heme is an important molecule that contains iron atoms and binds to various proteins to regulate their functions, but excess heme causes oxidative damage to DNA and proteins. Therefore, regulation of heme biosynthesis is important for living organisms. We have found that aminolevulinic acid synthase, the enzyme that catalyzes the first step of heme synthesis pathway, is degraded in a heme-dependent manner. In this study, we elucidated part of the recognition mechanism of heme-bound aminolevulinic acid synthase by the specific protease.

The recognition by the protease was found to be mediated by a 90-amino acid region outside the catalytic domain of aminolevulinic acid synthase. Furthermore, it was suggested that this region contains a degradation-promoting domain and an inhibitory domain, and that heme binding to the degradation-promoting domain weakens the inhibition by the inhibitory domain, resulting in recognition by the degrading enzyme.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：ヘム タンパク質分解 ミトコンドリア

### 1. 研究開始当初の背景

ヘムは、ヘモグロビンやシトクロム、カタラーゼをはじめ様々なタンパク質の補因子として機能し、細菌、藻類、植物、動物などほとんどの生物で保存されている必須の分子である。一方で過剰なヘムは、活性酸素種生成の原因となることが知られている。したがって細胞内ヘム濃度は、ヘム合成酵素の転写、翻訳、ミトコンドリア移行の各ステップにおいてフィードバック制御により厳密に調節されている。

我々は細胞内ヘム濃度の調節機構を明らかにすることを目標として、高等真核生物におけるヘム合成経路の最初で、経路の律速段階でもある反応を触媒する5-アミノレブリン酸シターゼ1(ALAS1)について、ミトコンドリアマトリクス内での分解経路について解析を行ってきた。その結果、既知のLONP1プロテアーゼによる分解経路とは別に、ClpXP複合体による分解経路が存在することを明らかにした(参考文献1)。LONP1経路は蓄積した酸化ALAS1を分解すると考えられるのに対して、ClpXP経路は、細胞内ヘム濃度上昇に伴いヘムが結合したALAS1を速やかに分解しており、ヘム濃度のフィードバック制御がALAS1の分解にも存在することを示していた。

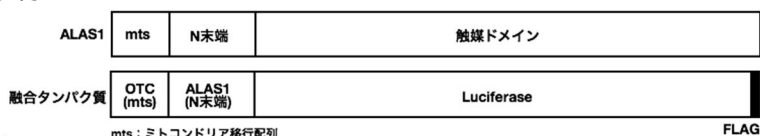
### 2. 研究の目的

本研究では、ヘム結合型 ALAS1 を ClpXP 複合体がどのように認識し、分解するのか、分子機構を解明することを目的とする。ClpXP 複合体はミトコンドリアマトリクスのアンフォルダーゼ CLPX と、プロテアーゼ CLPP から構成されている。siRNA によるノックダウン実験から、ALAS1 と ClpXP 複合体との相互作用は CLPX を介して行われていると考えられたが、分子レベルでの仕組みは未だ不明である。特に、ヘム結合型 ALAS1 はどのようにして認識されるのかが興味深い問題である。なぜなら、5-アミノレブリン酸シターゼには赤芽球特異的アイソザイム(ALAS2)が存在するが、ヘム濃度が上昇しても分解はほとんど見られない(未発表データ)。大量のヘムを必要とする赤血球産生系にはヘム濃度によるフィードバック抑制はかかりにくい、他の全身の細胞では ALAS1 の分解誘導が引き起こされ、ヘム濃度をコントロールしていると考えられる。

### 3. 研究の方法

(1) 最初に、ALAS1 と CLPX の相互作用に関わる領域を、各々のタンパク質について決定するための実験系を確立する。ヒト ALAS1 の全長 cDNA を培養細胞で発現させると、ALAS1 活性によりヘム濃度が上昇してしまい、ヘム濃度を実験的に制御することが困難となる。また、ALAS1 のミトコンドリア移行配列にはヘム結合モチーフが存在し、ヘム濃度の上昇によってミトコンドリア移行が抑制されることが知られている。ALAS1 の触媒ドメインは ALAS2 と相同性が高いが、N 末端領域は大きく異なっており、ここにヘムによる分解誘導に重要な配列が存在すると予想した。さらに、ALAS1 の N 末端には intrinsically disordered region (IDR) であると予想される領域が存在し、ヘム結合による分解誘導に関与している可能性が考えられる。そこで、Luciferase にミトコンドリアマトリクスタンパク質オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) のミトコンドリア移行配列を融合させた融合タンパク質を用意し、Luciferase の N 末端に、ALAS1 のミトコンドリア移行

配列と触媒ドメインを除いた残りの N 末端領域を挿入した融合タンパク質(OTC-AN-LucFLAG)を作成する(右図)。検

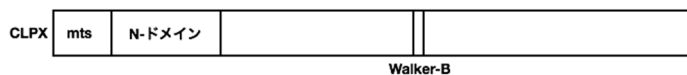


出を容易にするために C 末端に FLAG タグを付加しておく。さらにヒト CLPX についても、FLAG タグ付きの発現コンストラクトを作成する。これらの発現コンストラクトを Flp-In T-Rex-293 細胞または CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムによって作成した CLPX 遺伝子欠損 Flp-In T-Rex-293 細胞に導入し、安定発現細胞株を樹立する。これらを用いて OTC-AN-LucFLAG のヘムによる分解誘導がミトコンドリアマトリクスで起こるかを確認する実験系を確立する。

(2) さらに、融合タンパク質OTC-AN-LucFLAGのALAS1由来配列をさらに短くしたり、特定のアミノ酸を変異させたものを作成し、ヘムによる分解誘導が起こらなくなるか否かを解析する。また、それぞれの変異体OTC-AN-LucFLAG発現細胞について、抗FLAG抗体を用いて免疫沈降し、CLPXが共沈してくるかを調べる。以上の実験によって、CLPXとの相互作用に必須の配列、すなわちヘム誘導性のALAS1分解のためのデグロンの同定が期待できる。

一方、CLPXについても、大腸菌 CLPX で基質との相互作用に関与すると報告されている N-ドメインや、ATPase 活性に関わる Walker-B モチーフ(下図)について変異体発現コンストラクトを作成し、免疫沈降に用いる。これ

により、CLPX の ALAS1 認識に必要な領域を解析する。

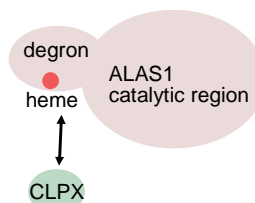


(3) 細胞内で解析した ALAS1 と ClpXP の相互作用について、直接両者が相互作用し、ALAS1 が分解されているのかを確認するため、精製タンパク質を用いて試験管内再構成系を作成し、生化学的解析を行う。

#### 4. 研究成果

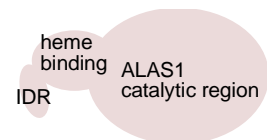
(1) これまで我々は、ヘム生合成経路の律速酵素である ALAS1 がヘム結合型になるとミトコンドリアマトリクスタンパク質分解酵素 ClpXP 複合体によって分解されることを見出した。ヘム濃度の上昇に伴って3時間以内にALAS1の分解が観察されることから、これまで知られていなかった、分解を介した、ヘム合成のネガティブフィードバック機構であると考えられた。

ALAS1 が ClpXP にどのようにして認識されるのか、分解の分子メカニズムを明らかにするため、ALAS1 の触媒領域ではない領域に着目して解析したところ、ミトコンドリア移行配列を除いたN末端領域約90アミノ酸がヘム濃度の上昇に反応して分解されるのに十分であることが分かった。すなわち我々は今回初めて、ミトコンドリアマトリクスにおいてヘム結合依存的に分解を誘導する新規のデグロンを同定することができた。

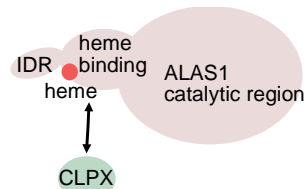


(2) さらにこのデグロンのヘム依存的分解の分子メカニズムを解析するため、デグロン領域90アミノ酸を、ヘム結合モチーフを含まない領域(IDRに相当)と含む領域(heme binding region)に分け、それぞれについてヘム濃度上昇による分解誘導を調べた。IDRではヘムの有無に関わらず分解は誘導されなかった。また、この領域はシクロヘキシミド処理によっても減少しなかったことから、ミトコンドリアタンパク質分解酵素に対して抵抗性をもたらす配列であることが考えられた。また、この領域はCLPXとの相互作用も非常に低かった。

一方、ヘム結合モチーフを含む領域については、ヘム誘導性の分解が観察された。シクロヘキシミド処理によって顕著な減少が見られたが、シクロヘキシミド処理下でのヘム誘導性の分解は見られなかった。おそらくこの領域には新規合成されたタンパク質をすぐに分解に導く配列があり、シクロヘキシミド処理下ではヘム誘導性分解が検出されなくなるほど早く分解されてしまうと考へたが、今後さらに解析する必要がある。この領域のヘム結合モチーフを変異させると、ヘム誘導性分解は見られなくなるが、シクロヘキシミドによる減少は保たれた。したがって、この領域にはシクロヘキシミド処理下での分解をもたらす配列とヘム結合によって分解をもたらす配列があると考えられた。予想に反して、この領域と免疫共沈されるCLPXは多くなかった。これは分解が非常に効率的に行われるのでCLPXと結合した中間産物濃度が非常に低いことによるのではないかと考へている。これについてはCLPXのWalker-Bモチーフ変異体(ATP加水分解が低下することにより分解中間産物が安定化する)を用いて確認する予定である。



デグロン全体ではヘム結合依存的に分解が起こることから、ヘム結合領域のもつ分解誘導能を、IDRが抑制制御していると考えられた。実際、IDRが存在するとヘム結合領域のみに比べてヘム誘導性分解速度が低下する。また、デグロン全体ではCLPXとのヘム依存的結合が非常に顕著に観察される。すなわち、CLPXとの結合がIDRによって

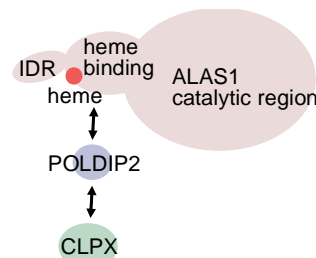


安定化されることを示していると考えられた。ヘム結合モチーフへのヘムの結合は、IDR によるデグロン機能の抑制を低下させていると予想している。今後、ヘム結合領域と IDR の相互作用があるか調べる予定である。

一方、CLPX の ALAS1 に対する相互作用に必要な領域について、欠失変異体などを用いて解析した。既に大腸菌 CLPX では基質の認識に重要であることが知られている、N 末端領域の Zn 結合ドメインを変異させると、ALAS1 との相互作用が低下した。ヒト CLPX においても、Zn 結合ドメインが基質認識に関与していることが示唆された。

(3) 以上の結果から、ALAS1 はそのデグロン配列により、ミトコンドリアマトリックスプロテアーゼ複合体 ClpXP によって認識、分解されることが明らかとなった。この認識が直接的であるかを解明するため、それぞれのタンパク質を大腸菌で組み換えタンパク質として産生し精製したものを用意し、分解反応の試験管内再構成系の樹立を試みた。

CLPX と CLPP を、FITC でラベルされた casein を基質として反応をさせたところ、分解が確認された。同様の条件で ALAS1 を基質として反応しても分解は見られなかった。このことは、ALAS1 の ClpXP による分解には未知の因子が必要である可能性を示していると考えられた。そこで、我々の研究室で得られていた、CLPX と免疫沈降で共沈される分子カタログのなかの POLDIP2 タンパク質に着目した。POLDIP2 は CLPX と相互作用し、ClpXP の活性を調節するとの報告が最近された(参考文献 2)。ALAS1 のヘム依存的分解に POLDIP2 が関与しているか否かを調べるため以下のいくつかの実験を行った。まず、POLDIP2 をノックダウンした細胞ではヘム誘導性の ALAS1 分解が抑制された。またヘム処理後の細胞から ALAS1 を免疫沈降したとき、CLPX とともに POLDIP2 が共沈することが分かった。さらに CLPX のノックアウト細胞においても POLDIP2 と ALAS1 の相互作用が認められたことから、CLPX を介さない相互作用であると考えられた。前述の論文(参考文献 2)では、POLDIP2 と CLPX の相互作用は POLDIP2 の N 末端領域と CLPX の Zn 結合領域間で行われており、C 末端領域は Fbox タンパク質と構造が類似していると報告している。今回我々の得たデータでは、CLPX の Zn 結合領域が ALAS1 との結合に必要であること、ALAS1 と POLDIP2 の結合は CLPX に依存しないことが示されていることから、CLPX の Zn 結合ドメインに POLDIP2 の N 末端領域が結合し、C 末端領域で ALAS1 のデグロンに結合している可能性が考えられた。今後、組み換え POLDIP2 タンパク質を用いて、ALAS1 分解反応の再構成系を確立する予定である。



我々は、ALAS1 がヘム結合依存的にミトコンドリアマトリックスプロテアーゼ ClpXP 複合体によって分解されるという現象を見出し、その分子メカニズムを解明することを目標として研究を進めてきた。本研究によって、ミトコンドリアマトリックスプロテアーゼ複合体 ClpXP の基質であることをヘム結合依存的に示すデグロン配列を新規に同定した。さらにこのデグロン内には分解促進領域と分解抑制領域が存在することが分かった。また、当初は予想していなかった、CLPX のアダプタータンパク質である POLDIP2 の関与も新たに見つけることができた。

参考文献 (1) Novel Mechanisms for Heme-dependent Degradation of ALAS1 Protein as a Component of Negative Feedback Regulation of Heme Biosynthesis. Y.Kubota et.al. J. Biol. Chem. (2016) 291(39):20516-29. Doi: 10.1074/jbc.M116.719161 (2) Polymerase delta-interacting protein 38 (PDIP38) modulates the stability and activity of the mitochondrial AAA+ protease CLPXP. P. R. Strack et. al. Communications Biol., (2020) 3:646. Doi: 10.1038/s42003-020-01358-6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kaneko, K., Kubota, Y., Nomura, K., Hayashimoto, H., Chida, T., Yoshino, N., Wayama, M., Ogasawara, K., Nakamura, Y., Tooyama, I. and Furuyama, K.	4. 巻 65
2. 論文標題 Establishment of a cell model of X-linked sideroblastic anemia using genome editing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Hematol	6. 最初と最後の頁 p57-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exphem.2018.06.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久保田美子、金子桐子、鈴木亘、Kamata Costantine Chasama、古山和道
2. 発表標題 ミトコンドリア内ヘム依存的ALAS1分解の調節機構 Heme-dependent degradation of mitochondrial protein ALAS1
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保田 美子、草壁 香帆里、久慈 強、金子 桐子、野村 和美、博多 修子、古山 和道
2. 発表標題 ヘム合成経路の律速酵素ALAS1の分解経路の抑制によるゲノム不安定性の誘導
3. 学会等名 日本生化学会東北支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子桐子、久保田美子、野村和美、林本遥、千田大誠、吉野直人、和山真里奈、小笠原勝利、中村幸雄、遠山育夫、古山和道
2. 発表標題 ALAS2変異による鉄芽球性貧血のモデル細胞構築
3. 学会等名 第682回岩手医学会例会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 金子 桐子, 林本 遥, 千田 大誠, 久保田 美子, 野村 和美, 小笠原 勝利, 和山 真里奈, 吉野 直人, 中村 幸夫, 遠山 育夫, 博多 修子, 古山 和道
2. 発表標題 遺伝性鉄芽球性貧血モデル細胞の樹立
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第84回例会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 亘, 久保田 美子, 金子 桐子, 古山 和道
2. 発表標題 LC-MSiによるミトコンドリアマトリクスアプロテアーゼC1pXPおよびLONP1の基質探索・同定
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazumichi Furuyama
2. 発表標題 Congenital Sideroblastic Anemia
3. 学会等名 " IRON HACK, A NCBI/NIH Biohackathon at USF "
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保田美子, 金子桐子, 鈴木亘, Kamata Costantine Chasama, 古山和道
2. 発表標題 ミトコンドリア内ヘム依存的ALAS1分解の調節機構
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担 者	古山 和道  (Furuyama Kazumichi)  (80280874)	岩手医科大学・医学部・教授   (31201)	

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
---------	---------