

報を維持できる DNA 修復機構が必須である。色素体 DNA の複製修復機構の研究の歴史は長いがまだまだ不明な点が多い。今後の研究の進展が期待される。

- 1) Mori, Y., Kimura, S., Saotome, A., Kasai, N., Sakaguchi, N., Uchiyama, Y., Ishibashi, T., Yamamoto, T., Chiku, H., & Sakaguchi, K. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **334**, 43–50.
- 2) Kimura, S., Uchiyama, Y., Kasai, N., Namekawa, S., Saotome, A., Ueda, T., Ando, T., Ishibashi, T., Oshige, M., Furukawa, T., Yamamoto, T., Hashimoto, J., & Sakaguchi, K. (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1585–1592.
- 3) Bendich, A.J. (2004) *Plant Cell*, **16**, 1661–1666.
- 4) Petersen, J.L. & Small, G.D. (2001) *Nucleic Acids Res.*, **29**, 4472–4481.
- 5) Draper, C.K. & Hays, J.B. (2000) *Plant J.*, **23**, 255–265.
- 6) Hada, M., Hino, K., Buchholz, G., Goss, J., Wellmann, E., & Shin, M. (2000) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1288–1291.
- 7) Kimura, S. & Sakaguchi, K. (2006) *Chem. Rev.*, **106**, 753–766.
- 8) Hase, Y., Trung, K.H., Matsunaga, T., & Tanaka, A. (2006) *Plant J.*, **46**, 317–326.
- 9) Sakai, A., Takano, H., & Kuroiwa, T. (2004) *Int. Rev. Cytol.*, **238**, 59–118.
- 10) Sato, N., Terasawa, K., Miyajima, K., & Kabeya, Y. (2003) *Int. Rev. Cytol.*, **232**, 217–262.
- 11) Nielsen, B.L., Rajasekhar, V.K., & Tewari, K.K. (1991) *Plant Mol. Biol.*, **16**, 1019–1034.
- 12) Tuteja, N. (2003) *J. Exp. Bot.*, **54**, 2201–2214.
- 13) Saotome, A., Kimura, S., Mori, Y., Uchiyama, Y., Morohashi, K., & Sakaguchi, K. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **345**, 1283–1291.
- 14) Fukata, H., Mochida, A., Maruyama, N., & Fukasawa, H. (1991) *J. Biochem. (Tokyo)*, **109**, 127–131.
- 15) Wall, M.K., Mitchenall, L.A., & Maxwell, A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7821–7826.
- 16) Ishibashi, T., Kimura, S., & Sakaguchi, K. (2006) *J. Biochem. (Tokyo)*, **139**, 99–104.
- 17) Cao, J., Combs, C., & Jagendorf, A.T. (1997) *Plant Cell Physiol.*, **38**, 1319–1325.

木村 成介^{1,2}, 早乙女 愛¹, 武内 亮¹, 坂口 謙吾¹

(¹ 東京理科大学理工学部応用生物科学科,

² 現所属; カリフォルニア大学デービス校植物学部)

Plastid DNA replication and repair

Seisuke Kimura^{1,2}, Ai Saotome¹, Ryo Takeuchi¹ and Kengo Sakaguchi¹ (¹Department of Applied Biological Science, Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda-shi, Chiba 278–8510, Japan; ²Presently, Section of Plant Biology, University of California, Davis)

投稿受付: 2006年11月21日

ヘム代謝が仲介する多様な生理活性

1. はじめに

2006年でGordon Research Conference (GRC)は75周年を迎えた。私にとっては1992年にTetrapyrrole Compound SessionのGRCに初めて機会を与えられて以来5度目の参加であった。多くの常連参加者は、多感な若き日に参加し、少なからぬ学問的刺激を受け、研究者への道を歩むきっかけになったと話す。私自身も2年に1度のGRCに参加する度に先端情報のみならず、独特の雰囲気により意欲を新たにし、研究活動の原動力にしている一人であり、最近では研究室の大学院生にも応募させ、国際的な刺激を受けるよう促している。生体内のメジャーなTetrapyrrole Compoundはヘムであることから、このSessionには世界中からヘム研究に携わる科学者が集まることになる。筆者はヘム合成系代謝異常症の分子生物学的な解析に端を発し、ヘム分解系の果たす多彩な役割の究明へと研究を展開している。ヘムタンパク質に関連した最近の話題は2003年に本誌でも特集が組まれ、その多様な生理機能がまとめられているので、参照していただきたいが、本稿ではこれまでに私が手掛けてきた研究成果を中心に、生体内の古くて新しい、普遍かつ神秘的なヘム代謝調節機構に関することをまとめてみたい。

2. ヘム合成系の障害による代謝異常症: 5-アミノレブリン酸脱水酵素 (ALAD) 欠損性ポルフィリン症 (ADP) における分子異常の多様性

ヘム合成に関与する8種類の酵素のうち、第2酵素ALAD (E.C. 4.2.1.24)の遺伝的欠損により発症するADP¹⁾は、劣性遺伝性であるため稀であり、現在のところ世界中でも6例が報告されているのみで日本では未だ報告はない。図1はこれまでに同定されたヒトALADの分子異常をまとめたものである。筆者らは3例目のADPから新規点変異と初めての2塩基欠失変異を発見し(図1, ⑧⑩)²⁾、その後の3症例の遺伝子解析を手掛けた。4例目のADPは高齢発症が特徴で、当初多血球血症と診断されていた。筆者らがALAD遺伝子を解析した結果、この患者は活性低下の原因となる点変異(図1, ⑦)をヘテロで持っていたが、何らかの要因でclonal expansionが起こり、多血球

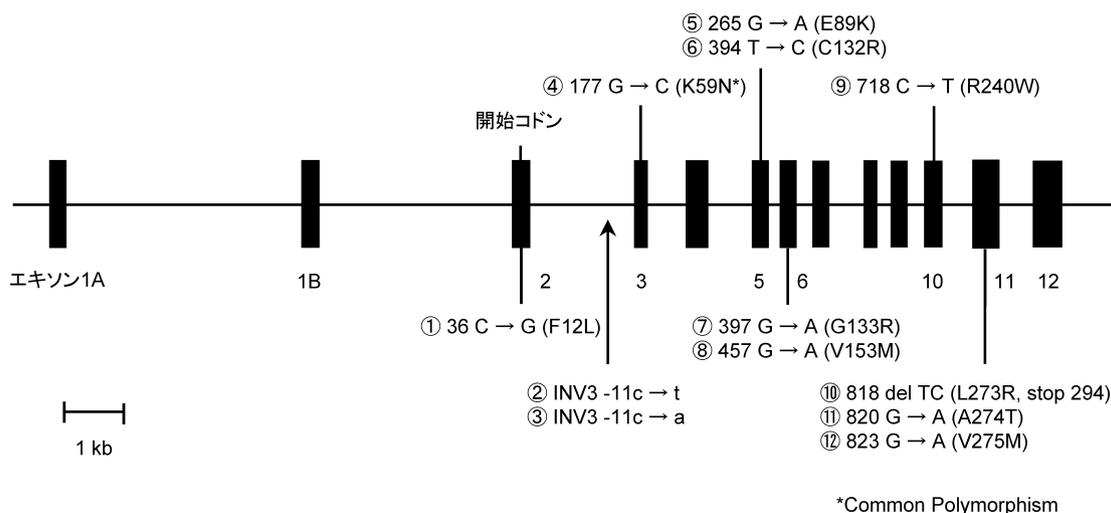


図1 ヒト ALAD で発見されている分子異常

ヒト ALAD 遺伝子は 13 エキソンからなる。現在までに報告されている分子異常は各症例によって多様で 6 エキソンに点在しており、イントロン領域のものもある。

血症と共に赤血球特異的な ALAD 活性の著明な低下を伴う ADP として発症したものと考えられた³⁾。なお、本症例で同定された変異 K59N (図 1, ④) については、発現実験により遺伝子多型であることを証明した³⁾。5 例目の患者は ALAD 遺伝子のエキソン領域は正常であったが、活性低下者である両親から各々遺伝した点変異を 2 種類、イントロン領域に有していた (図 1, ②③)。これらの分子異常が酵素活性低下をもたらしたメカニズムは今後解明されるべき問題である。

一方、ALAD は種々の環境毒の標的酵素であり、中でも鉛中毒との因果関係は古くから知られている。筆者らが最近報告した 6 例目の ADP からは、ALAD 酵素活性発現に重要で、鉛による酵素阻害の標的である亜鉛結合領域を形成しているシステイン残基の置換 (図 1, ⑥) が発見された⁴⁾。複合ヘテロ接合体として発症した患者の他方の対立遺伝子からは別の点変異 (図 1, ⑤) が同定され、亜鉛結合領域の近傍に位置する酸性アミノ酸から塩基性アミノ酸への置換が立体構造に影響を及ぼす可能性が考えられた (図 2A, B)。これらの点変異をヘテロで発現した場合、正常 ALAD で認められる鉛による活性低下が起こらず (図 2C)、酵素阻害は亜鉛結合を障害することによるものであることが示唆された⁴⁾。

さて、I 型チロシン血症では異常代謝産物であるサクシニルアセトンが ALAD を拮抗阻害することが知られている。スウェーデンではこれに基づき、新生児末梢血中の ALAD 活性を調べることによりチロシン血症のスクリー

ニングを行っている。このテストにより ALAD 活性が正常の 12% と診断された新生児はチロシン血症ではなかったが、未報告の異常 ALAD の保因者であることを筆者らは明らかにした⁵⁾。同定された分子異常 F12L (図 1, ①) は活性中心から離れた所に位置しているにもかかわらず、発現実験により不活性でしかも安定な酵素タンパク質を生成することから、四次構造に影響する可能性を考え、未変性ゲル電気泳動により活性な八量体を形成できないことを示して報告した⁵⁾。この点変異は、血縁関係のない別の家系からも検出され、しかも発端者はヘム合成系の第 6 酵素も部分欠損している dual porphyria であった⁶⁾。F12L の特徴は、保因者はいずれも正常 ALAD タンパク質を半分発現しているにもかかわらず、活性は約 30% 以下に低下していることで、正常タンパク質による活性な八量体形成に対しても何らかの影響を受けている可能性が考えられる。この報告がきっかけとなり、E. Jaffe らは大腸菌で発現させた変異 ALAD の構造解析を行い、不活性な六量体を形成していることを明らかにした。その後、他の変異 ALAD についても六量体/八量体編成動態を検討し、亜鉛結合部位に影響する変異 E89K, C132R (図 1, ⑤⑥) を除く変異 ALAD は六量体/八量体によって活性発現を説明できることを報告した⁷⁾。すなわち、ADP は酵素欠損症としては最初の conformational disease であるということになる。

現在までに発見されている ADP 患者は、高齢発症の一例⁸⁾を除いて全て異なる対立遺伝子上の異なる分子異常を

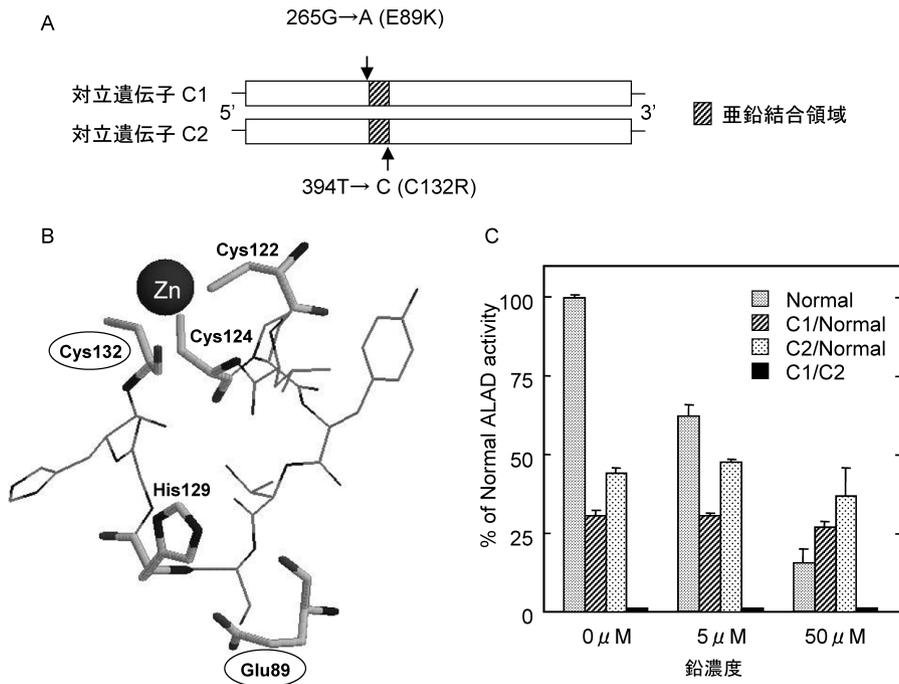


図2 ADP一症例で発見されたALADの分子異常
 A 各々の対立遺伝子の亜鉛結合領域近傍に新規分子異常が存在していた。
 B 立体構造からみた亜鉛結合領域とE89とC132の位置関係
 C 変異ALADはいずれも亜鉛結合を標的とする鉛による阻害効果が認められなかった。

合わせ持つ複合ヘテロ接合体として発症していた。ADPは劣性遺伝性疾患であるため、人口の2%程度存在していると推定されている保因者は通常は発症しないが、各種環境毒に対するハイリスク群を形成していると考えられる。地下鉄サリン事件がきっかけとなって、米国NIHが取り上げた環境遺伝子（毒物への暴露時に表現される異常遺伝子）の一つがALADであり、社会医学的にも注目に値する。

3. ヘム分解系の果たす役割

ヘム分解は小胞体に局在する heme oxygenase (HO) を律速酵素とし、続いて細胞質酵素 biliverdin reductase (BVR) により最終産物である bilirubin (BR) を生成する(図3)。HOは単に、生物界の普遍的物質であるヘムを分解するだけでなく、特異的な反応生成物を介して、多様な生理現象に関わっていることが最近明らかにされている。筆者らは、吸入麻酔薬ハロタンによる肝障害の発症メカニズムに着目して研究するうち、ラットを用いたモデルでHOの誘導型イソ酵素であるHO-1が一過性に中心静脈周辺の肝実質細胞で誘導されることを見出した。ハロタン肝障害の原因とされていた代謝産物ハロタンラジカルは、

薬物代謝酵素 cytochrome P450 (P450) による代謝活性化で生成する。肝臓においてP450は主たるヘムタンパク質であることから、ハロタンがP450の自殺基質となり、プロオキシダントであるヘムを遊離する可能性を考えた。関連する各因子の経時変化を検討したところ、ハロタン吸入後肝臓におけるP450活性の有意な低下に伴い細胞内遊離ヘム含量が増加し、ヘムが強力な誘導物質であるho-1が誘導されるという動態が認められた。この結果から、P450の崩壊に伴う細胞内遊離ヘム濃度の上昇は酸化ストレスの原因としての肝障害の増悪化につながるという仮説を立てた(図3)。事実、ハロタン吸入前にヘミン投与によりHO-1を誘導しておくこと、細胞障害は著明に改善されたことから、細胞内のプロオキシダントである遊離ヘムの消去系としてのHOの生理的役割を証明することができた⁸⁾。その後、虚血性腎不全モデルにおいても障害部位である尿細管特異的にHO-1が誘導されることを見出した。HOの特異的阻害剤であるSn-mesoporphyrinにより虚血性腎不全は著しく悪化し、塩化スズを皮下投与して腎特異的にHO-1を誘導することにより虚血-再環流による腎障害を予防することができた。これらの実験結果は、腎尿管

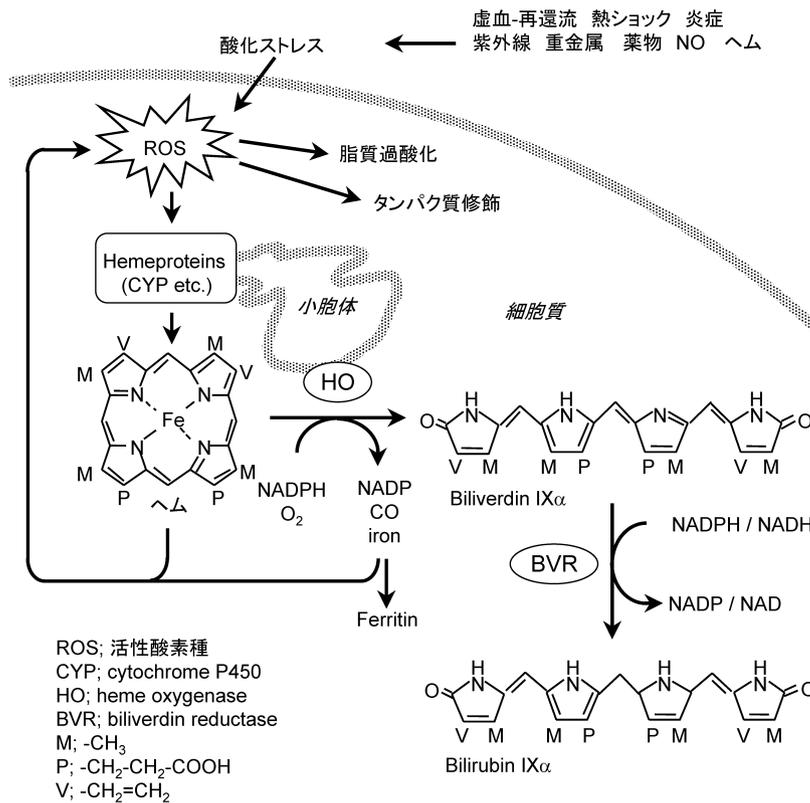


図3 細胞障害におけるHOの保護的役割

酸化ストレスによりP450の崩壊に伴う細胞内遊離ヘム濃度が上昇し、細胞障害の増悪につながる。その際HOは細胞内のプロオキシダントである遊離ヘムを消去することによりヘム仲介性の活性酸素種の生成を抑制し、悪循環を断つと考えられる。

においてHOは内因性の細胞保護的因子として機能していることを示唆した⁹⁾。

筆者らは引き続き、ラットにlipopolysaccharide (LPS)を投与して作成した敗血症性多臓器不全において臓器特異的なHO-1誘導動態を示し、誘導の程度に逆相関した障害が認められることから、酸化ストレス時におけるHOの果たす役割の重要性を示唆した¹⁰⁾。特に上位腸管では著明なHO-1誘導が認められたのに対し、大腸へと移行するにつれて誘導は微弱であった。興味深いことに、敗血症モデルでは大腸の障害が最も強く、グルタミンを全身投与することによりHO-1を前誘導しておくこと、障害はほとんど完全に予防することができた¹¹⁾。最近筆者らは、非ステロイド性解熱鎮痛薬による胃粘膜障害でも上皮細胞特異的にHO-1が誘導され、HOを阻害するとアポトーシス細胞が増加することを報告した¹²⁾。さらに、出血性ショックで特に障害の強い肺では、他の臓器と比較してHO-1の誘導がほとんど認められないこと、ヘミン投与によりHO-1を前

誘導しておくこと、障害は著明に改善されることを報告した¹³⁾。HOがストレスを軽減するメカニズムとしては、好ましからざる細胞内遊離ヘムを消去することによりヘム仲介性の活性酸素種の生成を抑制し、悪循環を断つことが考えられる。しかし他にも特異な反応生成物であるBRがラジカル消去作用を、一酸化炭素(CO)が抗アポトーシス作用を示すことにより回復をサポートしている可能性も考えられる(図3)。

ところで、肝障害からの回復は細胞増殖を伴うことから、非障害性の細胞増殖モデルとして再生肝におけるHOの発現動態を検討したところ、重篤な障害モデルである四塩化炭素肝障害と同等以上のHO-1が認められた。再生肝では細胞内の遊離ヘム含量は上昇しておらず、炎症性のマーカーも陰性であることから、HO-1誘導は少なくともストレス応答によるものではないと考えられる。再生肝と同様に細胞増殖の盛んな胎生期の諸臓器のうち胎盤は、HO-1の最大発現臓器であることを筆者らは明らかにして

いる^{14,15)}。その生理的役割としては、ヘム分解よりはむしろ反応生成物が重要である可能性が高い。中でもCOは妊娠子宮で産生が増加しており、平滑筋弛緩作用を表すことにより妊娠持続に関与しているとの報告もあることから、子宮と接触していてCO産生能のより高い胎盤が妊娠持続の鍵を握る臓器である可能性も考えられる¹⁵⁾。COはnitric oxide (NO)と同様に血管拡張作用を持つ安定なガス状メディエーターとしても知られていることから、生体内の唯一のCO産生系であるHO反応は他にも重要な役割を演じているのかもしれない。また、胎盤は胎児にとって栄養補給を担う主要臓器であることから、ヘム分解系はBR、COの他にも鉄の有効利用に活用されていることも考えられる。

4. おわりに

地球上に生息する生物の多くは、酸素を利用している。有毒ガスである酸素を活用できるのは、進化の過程でヘム合成系を樹立した後の出来事であり、その重要性から生命科学におけるヘム研究には歴史がある。最近、NO synthase や soluble guanylate cyclase 等の生理的に重要なヘムタンパク質に関する発見が相次ぎ、再びヘム研究の復活が目覚ましい。しかしながら、基本となるヘム代謝は8種類の合成系酵素と2種類の分解系酵素の細胞内動態であることには変わらない。ALADはヘム合成の必要量に比して大過剰に存在していることから、見過ごされがちであるが、なぜ律速酵素の100倍もの発現が必要であるのか、さらに、ヘム合成能を失っているにも関わらずALADを高発現している赤血球における機能は何であるか等、究明されるべき課題は残されている。筆者らのALAD研究は狭い領域の研究ではあるが、深く極めることにより、貴重な情報が得られつつあると思っている。

一方、ヘム分解系に関する筆者らの研究は、臨床領域における問題解決を目指すところに端を発して、疾病治療へとフィードバックする方向に発展しつつある。かつては病態の指標でしかなかったBRが、内因性抗酸化物質としてその重要性が確立されたのも、ヘム研究の産物といえよう。移植外科領域では、HO-1を高発現させた臓器は定着が良好であるとの報告があり、再生医療の観点からも注目されている。HOに関する学術論文は年々目覚ましく増加しており、ヘム分解系の生理的役割については、近い将来にその全容が明らかにされるであろう。

本研究は、筆者が米国ロックフェラー大学で研究指導を

受けて以来現在に至るまで共同研究を続けている佐々茂博士をはじめとし、世界各国の研究者との連携により行われました。ヘム分解系と細胞障害との関わりに関する研究は、岡山県立大学を拠点として岡山大学大学院医歯学総合研究科麻酔蘇生学教室の高橋徹博士らとともに展開した成果です。また、筆者が平成5年度に開学した岡山県立大学に着任して以来、多くの大学院生の協力を得たことに対して、ここに感謝の意を表します。

- 1) Sassa, S. (1998) *Semin. Liver Dis.*, 18, 95-101.
- 2) Akagi, R., Shimizu, R., Furuyama, K., Doss, M.O., & Sassa, S. (2000) *Hepatology*, 31, 704-708.
- 3) Akagi, R., Nishitani, C., Harigae, H., Horie, Y., Garbaczewski, L., Hassoun, A., Mercelis, R., Verstraeten, L., & Sassa, S. (2000) *Blood*, 96, 3618-3623.
- 4) Akagi, R., Kato, N., Inoue, R., Anderson, K.E., Jaffe, E.K., & Sassa, S. (2006) *Mol. Genet. Metab.*, 87, 329-336.
- 5) Akagi, R., Yasui, Y., Harper, P., & Sassa, S. (1999) *Br. J. Haematol.*, 106, 931-937.
- 6) Akagi, R., Inoue, R., Muranaka, S., Tahara, T., Taketani, S., Anderson, K.E., Phillips, J. D., & Sassa, S. (2006) *Br. J. Haematol.*, 132, 237-243.
- 7) Tang, L., Stith, L., & Jaffe, E.K. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 15786-15793.
- 8) Odaka, Y., Takahashi, T., Yamasaki, A., Suzuki, T., Fujiwara, T., Yamada, T., Hirakawa, M., Fujita, H., Ohmori, E., & Akagi, R. (2000) *Biochem. Pharmacol.*, 59, 871-880.
- 9) Akagi, R., Takahashi, T., & Sassa, S. (2005) *Contrib. Nephrol.*, 148, 70-85.
- 10) Takahashi, T., Morita, K., Akagi, R., & Sassa, S. (2004) *Curr. Med. Chem.*, 11, 1545-1561.
- 11) Uehara, K., Takahashi, T., Fujii, H., Shimizu, H., Omori, E., Matsumi, M., Yokoyama, M., Morita, K., Akagi, R., & Sassa, S. (2005) *Crit. Care Med.*, 33, 381-390.
- 12) Aburaya, M., Tanaka, K., Hoshino, T., Tsutsumi, S., Suzuki, K., Makise, M., Akagi, R., & Mizushima, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 33422-33432.
- 13) Maeshima, K., Takahashi, T., Uehara, K., Shimizu, H., Omori, E., Yokoyama, M., Tani, T., Akagi, R., & Morita, K. (2005) *Biochem. Pharmacol.*, 69, 1667-1680.
- 14) Ihara, N., Akagi, R., Ejiri, K., Kudo, T., Furuyama, K., & Fujita, H. (1998) *FEBS Lett.*, 439, 163-167.
- 15) Watanabe, S., Akagi, R., Mori, M., Tsuchiya, T., & Sassa, S. (2004) *Placenta*, 25, 387-395.

赤木 玲子

(岡山県立大学保健福祉学部栄養学科)

Diversity of physiological functions mediated by heme metabolism

Reiko Akagi (Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, 111 Kuboki, Soja-shi, Okayama 719-1197, Japan)