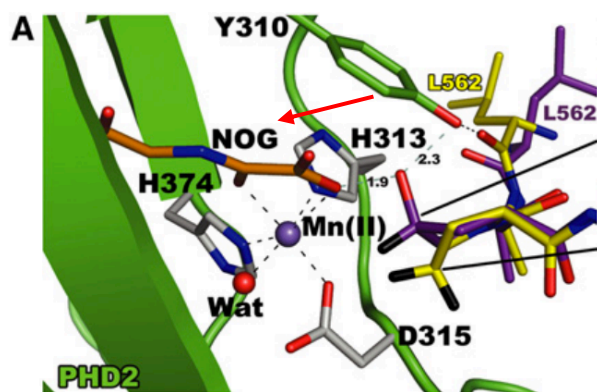


## ・プロリンのコンフォメーションの変化による基質のリリースに関する因果関係

セミナーでは、プロリンのコンフォメーション変化によって基質がリリースされやすくなるという説明をいたしました。この原因について論文中で詳細な考察はなされておりませんが、紹介した論文の Schofield 先生の研究室でポスドクをされている中嶋さんによると、基質のリリースにはコハク酸の産生と 310 番目のチロシンのコンフォメーションが関係しているかもしれないとのことでした。

基質が酸化されると 2OG の脱炭酸と共にコハク酸が生じ、コハク酸は内在的な阻害剤として働くことが知られています。2OG、NOG の代わりにコハク酸を阻害剤とした場合の結晶構造解析から、310 番目のチロシンのコンフォメーションが下の図の赤矢印の方向に移動することが見られたそうです。310 番目のチロシンが移動することで基質との相互作用が弱まると考えられます。未発表のデータですのでさらに詳細な原因はわかりませんが、現在のところ明らかにされているのはここまでだと思います。



## ・酸素と水の遅い交換が酸素センサーとして働くのはなぜか？

PHD2 は酸素依存的な反応性を示すことで「酸素センサー」として働くという表現をいたしました。ここでいう「酸素センサー」というのは、酸素濃度が低い時には働かず酸素濃度が高い時には働く、特定の酸素濃度を閾値とした On/Off スイッチとしてのセンサーではなく、酸素濃度に比例して HIF $\alpha$  の量を調節する役割を持ったセンサーです。HIF $\alpha$  は酸素量に寄らず常に産生されているタンパク質で、酸素が多い時はすぐに PHD によって分解を受けますが、酸素量が減少すると PHD の活性が酸素量に応じて下がり、HIF $\alpha$  がその速度に応じて増加します。

紹介した論文のイントロには次のような記述があります。

"O<sub>2</sub>-dependent post-translational modifications of HIF enable **a graded hypoxic response** by regulating both the levels and the activity of HIF- $\alpha$  isoforms." (Tarhonskaya, H. et al., *Biochem. J.* **463**, 363–372 (2014))

今回のセミナーでは PHD の酸素センサーとしての働きが”a graded hypoxia response”、酸素量に応じた線型的な HIF $\alpha$  の量の調節であることを説明できておりませんでした。具体的にどのようにして”a graded hypoxia response”を実現しているのかの補足説明を以下に示します。

酸素濃度が 0 に近づくと PHD の機能が止まるスイッチでは”a graded hypoxic response”とはなりません。”A graded hypoxic response”となるには酸素の濃度によって反応速度が決まる必要があります。これらを満たすためには酸素の  $K_m$  値が高く、基質、2OG の  $K_m$  が低い必要があります。 $K_m$  が十分大きければ、セミナーでお示した下の近似式が酸素量の大きい時にもその反応速度は酸素濃度に比例し、”a graded hypoxic response”となります。

$$v([S],[2OG],[O_2]) = \frac{k_{cat} \cdot [E]_T \cdot [O_2]}{K_m + [O_2]} \approx \frac{k_{cat} \cdot [E]_T \cdot [O_2]}{K_m} \quad (K_m \gg [O_2])$$

"Studies of the transient kinetics of several 2OG oxygenases reveal a fast reaction of the enzyme Fe(II)·2OG complexes with O<sub>2</sub> [18–22]."

"We have shown that the PHD2·Fe(II)·2OG complex undergoes a relatively slow reaction with O<sub>2</sub> and have proposed that this biochemical property may be related to the O<sub>2</sub>-sensing function of the PHDs in a biological context [23]."

(Tarhonskaya, H. *et al.*, (2014))

上に示したように、PHD と同じ反応機構を用いる酸化酵素では酸素との反応は早く、PHD は比較的遅い酸素との反応性を示し、この特徴が酸素センサーとしての機能に関連しているとも書かれています。セミナー中で他のヒドロキシル化酵素との比較はほとんどしませんでした。他のヒドロキシル化酵素の場合、基質の結合によって酸素と水の交換が早くなり酸素ではなく基質依存的な反応性となっています。

これら酸素との遅い反応性と酸素の高い  $K_m$  は酸素と水の交換が律速となることで実現されます。ただ、酸素センサーとして働く上で、酸素と水の交換だけが重要なのではなく、酸素依存的な反応性を出すために基質、2OG の結合が安定であることも同程度の重要性を持っています。

今回のセミナーではご紹介いたしませんでしたが、HIF $\alpha$  をヒドロキシル化するもう一つの酵素である FIH もこの酸素センサーに重要な役割を果たしています。FIH は PHD ほど高い  $K_m$  を持たず、酸素が通常の 100 分の 1 程度でも HIF $\alpha$  の CAD と呼ばれる部分のアスパラギンをヒドロキシル化します。酸素の量が多い時は PHD のヒドロキシル化によって HIF $\alpha$  は分解されますが、酸素量が減少し始めるとそれに伴って HIF $\alpha$  が増加します。そして、FIH が働く間は HIF $\alpha$  の CAD の Asn をヒドロキシル化します。Asn がヒドロキシル化されると HIF $\alpha$  と共役転写活性化因子の結合が阻害され、転写活性化する遺伝子が制限されます。酸素量がさらに減少し FIH の活性が失われると、HIF $\alpha$  の全てのターゲット遺伝子が転写活性を受けるようになります。

このようにして、PHDは線型的なHIF $\alpha$ の量を調節する酸素センサーとして、FIHは酸素量が0になるとHIF $\alpha$ の活性を最大化するon/offスイッチとして働きます。この二重のセンサーによって、HIF $\alpha$ の働きを制御し、低酸素応答を可能としています。

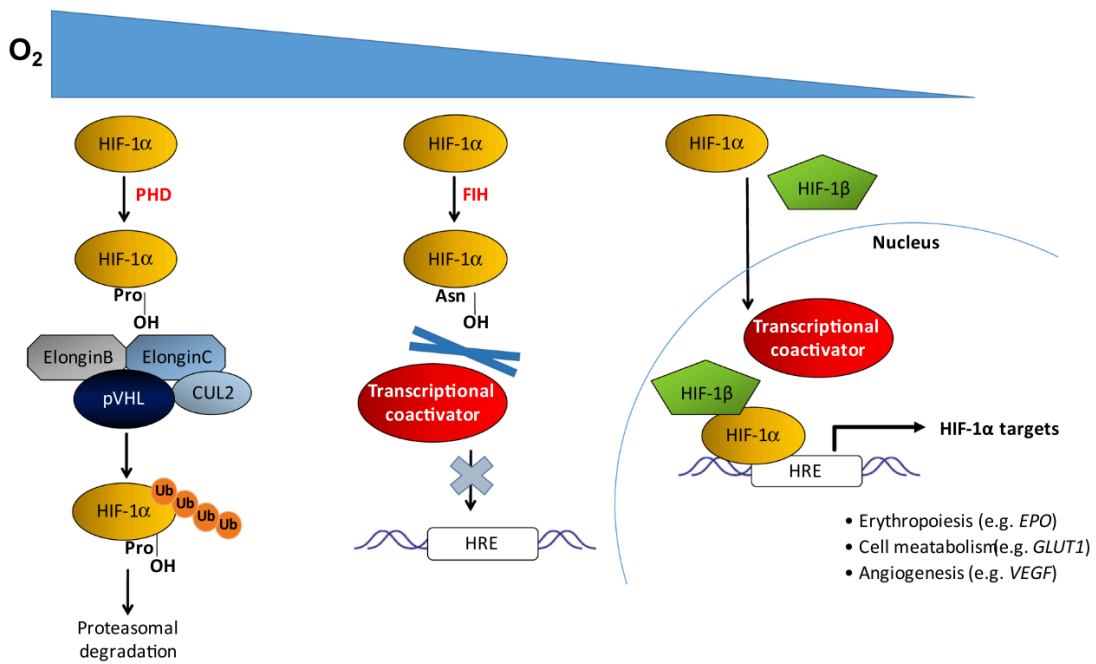


Fig. 2 Schematic of HIF-1 $\alpha$  regulation under normoxic or hypoxic condition