

令和元年6月20日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07280

研究課題名(和文) シトクロムP450還元酵素からシトクロムP450への電子移動機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of the electron transfer mechanism from cytochrome P450 oxidoreductase to cytochrome P450

研究代表者

杉島 正一 (Sugishima, Masakazu)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：30379292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：シトクロムP450は小胞体膜やミトコンドリア膜に結合したヘム酵素であり、そのヘム鉄に結合した酸素分子を活性化し、様々な脂質(ステロイドや薬物などの異物)の水酸化反応を触媒する。様々な脂質に対応するために、基質特異性の異なる数多くのP450が知られており、ヒトの場合50種以上のP450が知られている。

P450の反応には還元力が必要で、還元力の供給相手の一つであるCPRとP450の複合体結晶化を目指した。初期スクリーニングの結果、2種類のP450がCPRと安定な複合体を形成すると予想されたが、実際の相互作用は弱く、結晶化には適さないと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の結果はCPR-P450複合体の立体構造決定にはつながらなかったが、本複合体の構造決定が達成できれば、既知のCPR-HO複合体の立体構造との比較などにより、CPRという酵素の機能全般の理解へとつながると考えられる。また、CPR-P450複合体の立体構造からQM/MM法による量子化学計算を用いた電子移動反応の解析や、MDシミュレーションによるCPRのダイナミクスに関する研究の進展が期待される。これらの研究はCPRに関する遺伝病であるAntley-Bixler症候群(指定難病の一つ)の治療法確立につながるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Cytochrome P450s are endoplasmic reticulum and mitochondria membrane-bound heme enzymes which activates molecular oxygen bound to the heme iron to catalyze the hydroxylation reaction of various lipids such as steroids and drugs. Reducing equivalents must be supplied for P450 reaction and we tried to crystallize the complex of P450 and CPR which is one of the redox counterpart of P450. In the results of first screening, it is predicted that two kinds of P450s may form a stable complex with CPR, but it was not directly confirmed by the further analysis. Thus we conclude that these P450s are not suitable for the crystallization of the complex.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 タンパク質間相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シトクロム P450 は小胞体膜やミトコンドリア膜に結合したヘム酵素であり、そのヘム鉄に結合した酸素分子を活性化し、様々な脂質（ステロイドや薬物などの異物）の水酸化反応を触媒する。様々な脂質に対応するために、基質特異性の異なる数多くの P450 が知られており、ヒトの場合 50 種以上の P450 が知られている。

P450 が酵素反応に必要な酸素分子を活性化するためには、鉄硫黄クラスターを補因子とするアドレノキシニン(Adx)やフラビン酵素である CPR からの還元力が必要であり、この電子移動経路の詳細を明らかにするためには、酸化還元複合体の立体構造が必要である。Adx-P450 複合体については、バクテリアホモログにおいて、すでに構造解析例がある (Tripathi S. et al. (2013) Science 340, 1227-30, Hiruma Y. et al. (2013) J. Mol. Biol. 425, 4353-65) が、CPR-P450 複合体に関しては、いまだに構造解析例がない。CPR は P450 以外にヘム代謝における主要酵素であるヘムオキシゲナーゼ(HO)に還元力を供給することが知られている。HO は小胞体膜に結合した酵素で、基質としてヘムを結合する。HO も P450 と同様にヘム鉄に結合した酸素分子を活性化させるために還元力が必要である。これまでに我々は HO の酵素反応機構に関する生化学・構造生物学的研究を進めており、その中で、CPR-HO 複合体の結晶構造解析に成功している (図 1)。

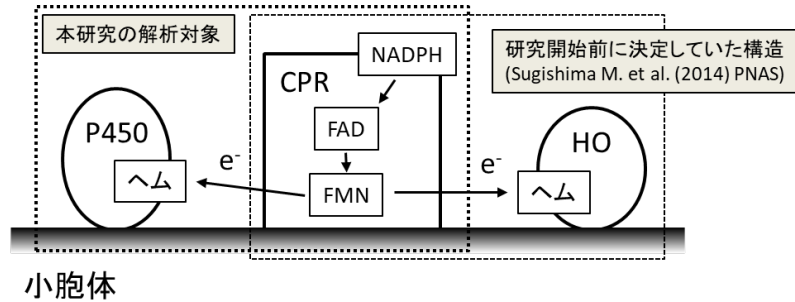


図 1 CPR からヘム蛋白質への還元力受け渡し

2. 研究の目的

そこで、本研究では CPR-P450 複合体の構造決定を目指し (図 1)、CPR から P450 への電子移動機構を明らかにしようとした。得られた結果は CPR-HO 複合体の立体構造との比較などにより、CPR という酵素の機能全般の理解へとつながる。CPR-P450 複合体の立体構造から QM/MM 法による量子化学計算を用いた電子移動反応の解析や、MD シミュレーションによる CPR のダイナミクスに関する研究の進展が期待される。

CPR に関する遺伝病として、Antley-Bixler 症候群という病気 (指定難病の一つ) が知られている。この病気は CPR の機能不全により、ステロイドホルモン合成にかかわる P450 が機能不全に陥り、女兒の場合は男性ホルモンの過剰、男児の場合は男性ホルモン不足を呈する。その結果として、性器異常、二次性徴の異常、骨合併症などが報告されている。CPR-P450 複合体の構造解析により、CPR から P450 への電子移動機構が明らかになることによって、本疾患の遺伝的背景と作用機序について理解が深まり、疾患克服への糸口がつかめることも期待される。

3. 研究の方法

安定な CPR-P450 複合体を得ることが結晶化へと至る近道であると考え、P450 が発現している肝臓の膜画分から CPR と強く相互作用する P450 をスクリーニングした。スクリーニングのために、HO-1 と安定な複合体を形成した TGEE という CPR 変異タンパク質を用いた。図 2 に概要を示した通り、免疫沈降法および共精製法により、TGEE と相互作用するタンパク質を抽出した。その後、質量分析法により、結合した P450 を同定し、その P450 の発現精製系を確立して、結晶化、構造解析へとつなげる手法をとった。

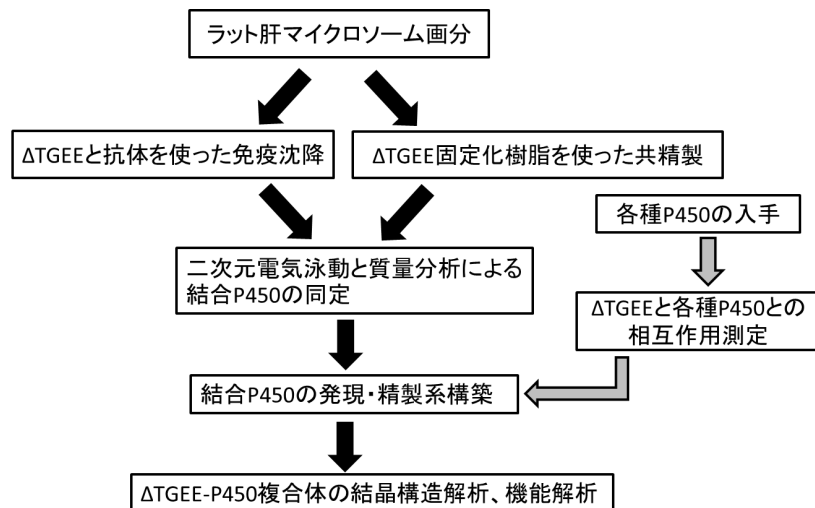


図 2 研究計画概要

4. 研究成果

3. のスクリーニングの結果、2 種類の P450 が同定され、それらの発現精製系を確立した。し

かし、ゲルろ過クロマトグラフィーおよび表面プラズモン共鳴法によって、それらの精製 P450 と TGEЕ との相互作用を確認したところ、弱い相互作用しか示さなかった。すなわち、これらの P450 は TGEЕ との複合体結晶化には適さないと考えられた。現在は天然の P450 と CPR の融合タンパク質である P450-BM3 の構造解析を検討している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Iijima M., Ohnuki J., Sato T., Sugishima M., Takano M. "Coupling of Redox and Structural States in Cytochrome P450 Reductase Studied by Molecular Dynamics Simulation" (2019) Sci. Rep. 掲載決定, 査読あり

DOI: 10.1038/s41598-019-45690-2

Sugishima M., Sato H., Wada K., Yamamoto K. "Crystal structure of a NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase(CYPOR) and heme oxygenase 1 fusion protein implies a conformation change in CYPOR upon NADPH/NADP⁺ binding" (2019) FEBS Lett. 593 ,868-875, 査読あり

DOI: 10.1002/1873-3468.13360

Sugishima M., Wada K., Unno M., Fukuyama K. "Bilin-metabolizing enzymes: site-specific reductions catalyzed by two different type of enzymes" (2019) Curr. Opin. Struct. Biol. 59, 73-80, 査読あり

DOI: 10.1016/j.sbi.2019.03.005

Sugishima M., Wada K., Fukuyama K. "Recent Advances in the Understanding of the Reaction Chemistries of the Heme Catabolizing Enzymes HO and BVR Based on High Resolution Protein Structures" (2019) Curr. Med. Chem. 掲載決定, 査読あり

DOI: 10.2174/0929867326666181217142715

Igarashi K., Hagiwara Y., Sugishima M., Wada K., Fukuyama K., Ikeda A., Yano N., Kusaka K., Ostermann A., Unno M. "Crystal Growth of a Bilin Reductase PcyA I86D Mutant-Substrate Complex for Neutron Crystallography" (2018) Crystal Growth & Design 18, 5174-5181、査読あり

DOI: 10.1021/acs.cgd.8b00607.

Taira J., Morita K., Kawashima S., Umei T., Baba H., Maruoka T., Komatsu H., Sakamoto H., Sacchettini J.C., Aoki S. "Identification of a novel class of small compounds with anti-tuberculosis activity by in silico structure-based drug screening." (2017) J. Antibiot. (Tokyo), 1057-1064、査読あり

DOI: 10.1038/ja.2017.106

Taira J., Ito T., Nakatani H., Umei T., Baba H., Kawashima S., Maruoka T., Komatsu H., Sakamoto H., Aoki S. "In silico structure-based drug screening of novel antimycobacterial pharmacophores by DOCK-GOLD tandem screening." (2017) Int. J. Mycobacteriol. 6, 142-148、査読あり

DOI: 10.4103/ijmy.ijmy_24_17

Taira J., Kida Y., Inatomi K., Komatsu H., Higashimoto Y., Sakamoto H. "Phosphorylation of clustered serine residues in the N-terminus of BPS domain negatively regulates formation of the complex between human Grb14 and insulin receptor." (2017) J. Biochem. 162, 113-122、査読あり

DOI: 10.1093/jb/mvx007

Takao H., Hirabayashi K., Nishigaya Y., Kouriki H., Nakaniwa T., Hagiwara Y., Harada J., Sato H., Yamazaki T., Sakakibara Y., Suiko M., Asada Y., Takahashi Y., Yamamoto K., Fukuyama K., Sugishima M., Wada K. "A substrate-bound structure of cyanobacterial biliverdin reductase identifies stacked substrates as critical for activity" (2017) Nat. Commun. 8, 14397、査読あり

DOI: 10.1038/ncomms14397

Hagiwara Y., Wada K., Irikawa T., Sato H., Unno M., Yamamoto K., Fukuyama K., Sugishima M. "Atomic-resolution structure of the phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase I86D mutant in complex with fully protonated biliverdin" (2016) FEBS Lett. 590, 3425-3434、査読あり

DOI: 10.1002/1873-3468.12387

Maeki M., Yamazaki S., Pawate S.A., Ishida A., Tani H., Yamashita K., Sugishima M., Watanabe K., Tokeshi M., Kenis P.J.A., Miyazaki M. "A microfluidic-based protein crystallization method in 10 micrometer-sized crystallization space" (2016) CrystEngComm 18, 7722-7727、査読あり

DOI: 10.1039/C6CE01671E

海野昌喜、日下勝弘、玉田太郎、杉島正一、和田啓、萩原義徳、福山恵一 "ビリン還元酵素 PcyA と基質ピリペルジン複合体の中性構造解析から見えてきたもの" (2016) 日本中

性科学会誌「波紋」、26,130-134、査読あり

https://www.jstage.jst.go.jp/article/hamon/26/3/26_130/_pdf/-char/en

Unno M., Ishikawa-Suto K., Kusaka K., Tamada T., Hagiwara Y., Sugishima M., Wada K., Ishikawa M., Fukuyama K. "Neutron Crystallography Reveals Two Protonation States of PcyA, a Biliverdin Reductase" (2016) MLF Annual Reports 2014, 15-17、査読なし
<http://j-parc.jp/researcher/MatLife/ja/publication/files/MLF%20ANNUAL%20REPORT%202014.pdf>

杉島正一 "ヘム代謝系関連酵素の構造生物学的研究" (2016) 生化学、88、171-181、査読あり

DOI:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880171

[学会発表](計26件)

佐藤秀明 他、ヒドロキシメチルピランシンターゼの反応中間体と基質類似体との複合体の結晶構造解析、日本化学会第99春季年会、2019年3月

Takao H., Hirabayashi K., Harada J., Sato H., Fukuyama K., Sugishima M., Wada K., Reaction mechanism of biliverdin reductase involved in the heme degradation, Asian Crystallographic Association (AsCA) 2018、2018年12月

杉島正一 他、HO-CPR人工融合タンパク質の結晶構造、日本結晶学会2018年度年会、2018年11月

佐藤秀明 他、2分子の基質を結合したヒドロキシメチルピランシンターゼの結晶構造、第91回日本生化学会大会、2018年9月

平順一、相良達哉、杉島正一、坂本寛、構造変化を伴うNADPH-シトクロムP450還元酵素とヘムオキシゲナーゼ-1の複合体形成の沈降平衡法による解析、平成30年度日本生化学会九州支部例会、2018年7月

杉島正一 他、NADP添加によるNADPH-シトクロムP450還元酵素とヘムオキシゲナーゼ間の相互作用増大の構造的要因、平成30年度日本生化学会九州支部例会、2018年7月

松田和也、井之上実希、平順一、小松英幸、杉島正一、坂本寛、ヘム分解関連酵素間の特異的相互作用を基盤とする分子内FRETヘムプローブの開発、平成30年度日本生化学会九州支部例会、2018年7月

Iijima M., Ohnuki J., Sato T., Sugishima M., Takano M., Coupling of the Redox and Structural States in Cytochrome P450 Reductase Studied by Molecular Dynamics, The Protein Society's 32nd Annual Symposium、2018年7月

佐藤秀明 他、基質を2分子結合したヒドロキシメチルピラン合成酵素のX線結晶構造解析、第18回日本蛋白質科学会年会、2018年6月

佐藤秀明 他、基質2分子を結合したヒドロキシメチルピランシンターゼの結晶構造解析、日本化学会第98春季年会、2018年3月

下川千寿、城田沙織、佐藤秀明、杉島正一、原田二郎、東元祐一郎、Amzel M、野口正人、癌代謝物である2-ヒドロキシグルタル酸がヒト由来ペプチドC末端アミド化酵素PAMに与える影響、2017年度生命科学系合同年会、2017年12月

高尾春奈、福山恵一、杉島正一、和田啓、黄疸の原因物質ビリルビンの生成反応機構の解明 -ビリベルジン還元酵素-基質複合体の結晶構造解析-、2017年度生命科学系合同年会、2017年12月

杉島正一 他、NADPH-シトクロムP450還元酵素-ヘム-ヘムオキシゲナーゼ複合体の結晶構造解析能向上への取り組み、2017年度生命科学系合同年会、2017年12月

五十嵐啓介、杉島正一、和田啓、萩原義徳、日下勝弘、矢野直峰、福山恵一、Ostermann A、海野昌喜、ビリルジン還元酵素PcyA変異体I86D-BV複合体の中性子結晶構造解析、平成29年度日本結晶学会年会、2017年11月

高尾春奈、福山恵一、杉島正一、和田啓、新生児黄疸を引き起こす蛋白質ビリベルジン還元酵素の基質結合様式と反応機構、平成29年度日本結晶学会年会、2017年11月

Sugishima Masakazu 他、Crystal structure of biliverdin reductase reveals unexpected substrate binding manner; two substrates bind to the one catalytic cleft、第55回日本生物物理学会年会、2017年9月

Sugishima Masakazu 他、Crystal Structure of Cyanobacterial Biliverdin Reductase Reveals Two Biliverdin Molecules Bind to the One Catalytic Cleft、13th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors of Photosynthetic Organisms (ICTPPO)、2017年7月

Miyake K., Fushimi K., Ni-Ni-Win, Kimura H., Sugishima M., Ikeuchi M., Narikawa R., 18¹,18²-Dihydrobiliverdin as a Chromophore for Cyanobacteriochromes from Chlorophyll *d*-bearing Cyanobacterium *Acaryochloris marina*, 13th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors of Photosynthetic Organisms (ICTPPO)、2017年7月

Fukuyama Keiichi 他、Protonation States of PcyA-Biliverdin and Its I86D Mutant Protein-Biliverdin Complexes Revealed by Neutron and X-ray Crystallographic Analyses、13th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors of

Photosynthetic Organisms (ICTPP0)、2017年7月

相良達哉、平順一、杉島正一、小松英幸、坂本寛、沈降平衡法による heme oxygenase-1 と NADPH-cytochrome P450 reductase の相互作用解析、平成 29 年度日本生化学会九州支部例会、2017年5月

- ⑳ 高尾春奈、福山恵一、杉島正一、和田啓、新生児黄疸の原因蛋白質ビリベルジン還元酵素の反応機構、平成 29 年度日本生化学会九州支部例会、2017年5月
- ㉑ 五十嵐啓介、杉島正一、和田啓、萩原義徳、日下勝弘、福山恵一、海野昌喜、ビリジン還元酵素 PcyA 変異体 I86D-BV 複合体の中性子結晶構造解析に向けて、日本結晶学会平成 28 年度年会、2016年11月
- ㉒ 杉島正一 他、I86D 変異フィコシアノビルリン:フェレドキシン還元酵素(PcyA)の精密構造解析から見えてきた活性部位周辺酸性残基の水素化状態、第 89 回日本生化学会大会、2016年9月
- ㉓ Sugishima Masakazu 他、Crystal Structure of Biliverdin and NADP+ bound Biliverdin IX Reductase、9th International Conference on Heme Oxygenase Prague 2016、2016年9月
- ㉔ 佐藤秀明 他、ヒドロキシメチルピラン合成酵素-阻害剤複合体の結晶構造解析、第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016年6月
- ㉕ 杉島正一 他、NADPH-シトクロム P450 還元酵素からヘムオキシゲナーゼへの電子移動反応の生化学的検討、第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016年6月

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/view/msugishima76>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：佐藤 秀明

ローマ字氏名：(Sato Hideaki)

所属研究機関名：久留米大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：60271996

研究分担者氏名：坂本 寛

ローマ字氏名：(Sakamoto Hiroshi)

所属研究機関名：九州工業大学

部局名：大学院情報工学研究院

職名：教授

研究者番号(8桁)：70309748

研究分担者氏名：福山 恵一

ローマ字氏名：(Fukuyama Keiichi)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院工学研究科

職名：招へい研究員

研究者番号(8桁)：80032283

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。