

平成21年6月1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18550159
 研究課題名（和文）生物が利用するポルフィリンの側鎖が非対称であることの生理的意義
 研究課題名（英文）PHYSIOLOGICAL ROLE OF THE SIDE-CHAIN ASYMMETRY OF PORPHYRINES THAT ARE UTILIZED IN NATURE
 研究代表者
 小俣 義明（OMATA YOSHIKI）
 横浜薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号：20268840

研究成果の概要：生物が利用するポルフィリン類が非対称な分子であることを決定づける、生合成過程4段階目のウロポルフィリノーゲンⅢ合成酵素（UROS）の性質を検討した。先天性骨髄性ポルフィリン症患者では UROS の機能が劣っているが、ヒト UROS の場合には酵素の内部に存在するシステインが機能低下と関係していることが判った。アミノ酸変異酵素の性質から基質の結合や反応に関わるアミノ酸を同定し、酵素と基質の結合状態を推定した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	690,000	4,090,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ポルフィリン、ウロポルフィリノーゲン、ウロポルフィリノーゲンⅢ合成酵素、
 先天性骨髄性ポルフィリン症、ヒドロキシメチルピラン、
 ヒドロキシメチルピラン合成酵素

1. 研究開始当初の背景

（1）ヘム、クロロフィル、ビタミン B₁₂ 等の生合成に利用されるポルフィリンは4つのピロール環側鎖の配置が分子の中心に対して対称にはなっていない。生物が非対称なポルフィリンしか利用しないのは理由があると考えられ、生合成過程及びポルフィリン類を利用する酵素に認識される配向を決めていることは容易に想像される。しかしポルフィリンの主な機能である中心に配

位した金属の活性化に関してならば側鎖の配置は重要な意味を持たないにも関わらず、生合成過程でわざわざ対称性を低くする意義や機構に関しての具体的な研究はほとんどない。ヘムの生合成経路は8段階からなり、側鎖の配置が非対称になるのは4段階目のウロポルフィリノーゲンⅢ合成酵素（UROS）によるウロポルフィリノーゲンⅢの生成でD環が逆向きになることによって為される。ウロポルフィリノーゲンⅢまで

の生合成過程はヘムだけでなく全てのポルフィリン類に共通であり、しかもここで生じた非対称性は続く過程でも解消されることがないので、生理的に利用される全てのポルフィリンが対称性の低い異性体であるのは UROS による反応で決定されている。

(2) 初期の研究に於いて特定の炭素を同位体標識した化合物を用いた酵素反応の生成物の解析から D 環が逆向きなのはピロール環の修飾ではなく、HMB 合成酵素 (HMBS) によって作られた鎖状テトラピロールであるヒドロキシメチルピラン (HMB) から、UROS によって環状のウロポルフィリノーゲン III を生成する際に、D 環を反転させることによってピロール環側鎖のカルボキシメチル基 (A) とカルボキシエチル基 (P) の位置が入れ替わることで行われることが判っている (図 1)。その

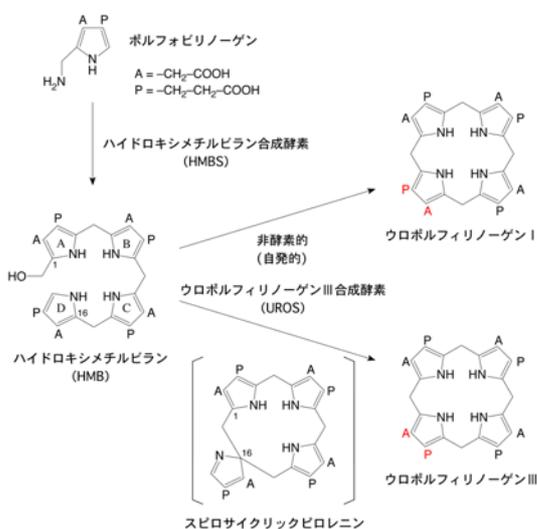


図 1 ウロポルフィリノーゲンの生合成過程

後イギリスのグループが、化学合成した基質及び想定される中間体アナログを用い、酵素との結合及び阻害の研究を長年に渡り膨大に行った結果、スピロ化合物を経ることによる D 環の分子内再配置機構が提唱されている。これはこの中間体と殆ど同じ構造を持つスピロラクタム化合物が UROS 活性を阻害したことによっているが、酵素内でこの中間体を生じることが証明されている訳ではない。

(3) UROS の研究を困難にしている理由の 1 つは、基質である HMB が水溶液中では極めて不安定で、アルカリ性では数分の寿命があるものの中性～酸性では直ちに非酵素的に環化してウロポルフィリノーゲン I に変換してしまうことである。つまり HMB が環化するのは自発的な反応であり、実際 UROS による反応ではピロール環の回転と云

う大きな変化があるが、ATP など外部からのエネルギーを必要としない。UROS の作用は反応の立体特異性を決定づけることにあると考えられるが、その機構はまだ解明されていない。UROS 研究が進まないもう 1 つの理由は、組織から抽出、精製した酵素が不安定で、特に熱に対する安定性が低いことにあると考えられ、本研究の前段階では、ヒト UROS を大腸菌で発現し、精製する方法を確立することで今までに精製された標品に比べて熱に対する安定性が極めて高い酵素標品を得ている。

2. 研究の目的

(1) UROS が存在しない場合には HMB は非酵素的に環化するが、この際には D 環は反転せずに側鎖が順序通りに配置したウロポルフィリノーゲン I となるので、環化する為の反応性は基質に内在している。酵素としての UROS の役割は、基質が中間体の生成に適した配向になるよう 1 位にあるヒドロキシメチル基のメチル炭素と D 環 16 位の炭素を近づけることと、その後で想定されているスピロ中間体はウロポルフィリノーゲン I にもウロポルフィリノーゲン III にもなり得るので、回転の方向がウロポルフィリノーゲン III の生成に向かうような立体障害を中間体に与えることにあると考えられる。本研究では溶液中における動的構造と結晶中における静的構造の両面からこの作業仮説を証明することにより、UROS による D 環反転機構を明らかにし、ポルフィリンの代謝においてポルフィリンの非対称性が果たす役割の研究に寄与することを目的とする。

(2) ヘムは生体にとって必須な為、生合成経路の酵素が一部でも欠損していると致死となるが、活性が低い場合には生存してもその前駆物質が蓄積する。ヒトの先天性骨髄性ポルフィリン症 (CEP) の場合には UROS 活性が先天的に劣っており、CEP 患者では HMB からウロポルフィリノーゲン III への変換が充分でない為に HMB は非酵素的に環化しウロポルフィリノーゲン I が生成する。ヘムの生合成で続く反応を触媒するウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素は基質特異性が低い為に、ウロポルフィリノーゲン I も基質として 4 つのカルボキシメチル基が脱炭酸されメチル基となったコプロポルフィリノーゲン I を生じるが、その次の段階を触媒するコプロポルフィリノーゲン III 酸化酵素は側鎖の位置と反応の特異性が

高くコプロポルフィリノーゲンⅢのみを基質とし、コプロポルフィリノーゲンⅠは利用されない。その結果としてコプロポルフィリノーゲンⅠが蓄積し、ポルフィリンの光感受性の為に皮膚に重篤な光過敏症を呈するようになる。ヒト UROS の酵素的性質や HMB からウロポルフィリノーゲンⅢへの変換の機構を明らかにすることによって、活性を回復させる或いは補う為の治療や創薬に応用させる。

3. 研究の方法

(1) ヒト UROS を未修飾の状態で大腸菌で発現させるベクターは既に作成してあったが、精製には3段階のカラムを用いる為に操作が煩雑なので、アミノ酸を点変異させた酵素を容易に精製する為に GST 融合タンパク質として発現させるベクターを構築した。市販の GST 融合タンパク質発現ベクター (Amersham Biosciences pGEX-6P) をそのまま用いたのでは、GST 部分をプロテアーゼで除去した後でN末端に天然タンパク質には存在しないアミノ酸残基が多く残る。そこでマルチクローニング部位を変異させることで *Nde* I 認識配列を導入し、GST 部分を切断した後のN末端 Met の上流には Gly-Pro-His-のみが残るよう改良して用いた。アミノ酸変異酵素は、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用い、常法により作成した。発現したタンパク質は溶菌後、グルタチオン固定化カラムに吸着させ、カラム上でのプロテアーゼ処理により1段階で精製した。

(2) UROS の基質である HMB は水溶液中では不安定な為に定量的に反応系に加えることが困難であり、UROS 活性の測定は、前段階の酵素である HMBS とその基質であるポルフォビリノーゲンを反応系に共存させて UROS の基質を供給することによって行う。この場合にも生成した HMB は非酵素的にウロポルフィリノーゲンⅠへ変換するが、この反応は UROS によるウロポルフィリノーゲンⅢへの変換に比べると遅いので、反応を弱アルカリ性で短時間(3分)行い UROS 非存在下でのコントロールを正しく設定することで UROS 活性を知ることができる。また、HMB は直接定量することができず、酸性状態でウロポルフィリノーゲンⅠへ変換させた後に生じたウロポルフィリンⅠとして定量する。Km の測定に際しては、1点のデータに対して、UROS 添加時に存在していた総ウロポルフィリン量、HMB から非酵

素的に生じたウロポルフィリンⅠ量、UROS 反応後の総ウロポルフィリン量、UROS 非存在下で生じたウロポルフィリンⅠ量の4者から基質濃度と反応速度を求めた。

(3) 精製酵素を DTNB で修飾し吸光度からチオール数を測定した。DTNB 修飾は SDS の非存在下と存在下で行い、前者からタンパク質分子表面に露出したチオール数と後者からタンパク質の総チオール数を測定した。

(4) ヒト UROS の活性が熱処理により速やかに低下し、その際に分子内部に埋もれた Cys 残基が他の Cys 残基に先だって変化することが判っていた。Cys 残基がどのような分子種へ変化するのか確かめる為に、熱処理で活性の低下した酵素を常法によりトリプシンで部分分解し、MALDI-TOF マススペクトルを測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト UROS の結晶構造を空間充填モデルで見ると分子表面から全く見えない Cys 残基は唯一 Cys73 であった。このことが溶液中で保持されているか確認する為に、各 Cys 残基を Ser へ変異させた酵素を作成し、SDS の有無で総チオール数と酵素表面に露出したチオール数を測定した(表1)。野生

表1 変異 UROS のチオール数

	SDS		チオール数の差
	有	無	
WT	7.1	6.2	0.9
C14S	5.9	4.9	1.0
C73S	6.1	6.0	0.1
C119S	6.0	5.0	1.0
C130S	5.5	4.5	1.0
C143S	6.1	5.4	0.7
C241S	5.8	5.0	0.8

型の総チオール数は7、酵素表面で DTNB によって修飾されるチオール数は6であり、溶液中でも1 Cys 残基が酵素分子内部に埋もれていることが判った。C-末端に存在するものを除く各 Cys を Ser へ変異させた酵素では、唯一 Cys73Ser が SDS の有無でチオール数が変化せず、Cys73 がヒト UROS の活性に関わる埋もれた Cys であることが確かめられた。熱処理した酵素のマススペクトルでは Cys73 を含む断片の分子量が変化することが確かめられたが、変化した分子種を決定するには至らなかった。既知 UROS のアミノ酸配列の比較では Cys73 に相当する

位置が保存されているのはヒト、マウス及び *C. albicans* 等一部に限られ、多くの生物種で Cys ではないが、UROS 活性の損失が主因である CEP 患者に共通して最も多く見られる SNPs が Cys73Arg であること及び、Cys73 を Arg に変異させたヒト UROS の活性が野生型の 2% 以下しかない事実から、ヒト UROS の Cys73 が持つ酵素学的意義について更なる検討を行うことによって CEP 患者の UROS 活性を回復させる或いは補う為の治療へつながることが期待される。

(2) UROS の基質である HMB には多くのカルボキシル基があり基質結合には塩基性アミノ酸残基の関与が大きいと考えられ、また反応にはプロトンの供給が必要である。基質を結合した状態での UROS の結晶構造は明らかになっていないが、ヒト UROS の結晶構造を元に、活性中心と推測される部位近傍に存在する塩基性アミノ酸残基と水酸基を持つアミノ酸残基の点変異酵素を作成し、UROS 活性及び Km、kcat を測定した

表2 アミノ酸点変異酵素の活性

変異	活性 (%)	Km (μM)	kcat (min ⁻¹)	kcat/Km
WT	100	1.16	2100	1820
K7A	3	55.2	570	10
R	95	1.19	1810	1520
E	0.2	18.8	3.5	0.2
K10A	67	3.74	2120	570
R	83	0.68	1520	2220
R65A	1	63.5	100	1.6
K	4	6.38	131	21
E	0.2	64.4	1.1	0.02
K109A	94	1.42	2330	1640
K147A	102	1.06	2180	2060
R148A	74	1.57	1740	1110
K	43	2.37	2120	900
K153A	101	1.12	2120	1890
H173A	76	1.46	1770	1220
E	70	1.87	1550	830
Y19F	66	3.87	040	530
A	9	42.0	1570	37
T62A	2	3.40	73	22
S63A	22	4.56	724	160
T103A	1	6.31	39	6.2
Y168F	1	6.18	15	2.3
A	0.2	6.95	13	1.9
S	0.5	4.51	16	3.5
T	0.4			
S197A	47	2.25	1120	500
T227A	26	6.19	1240	200
T228A	6	20.4	576	28

(表2)。塩基性アミノ酸置換酵素の結果では、Lys7 と Arg65 を変異させた場合に顕著に活性が低下し、これらは UROS の結晶構造で基質結合部位と推測される溝の上下に存在しているので、基質は Lys7 と Arg65 によって両面を固定されていると考えられる。しかし、両者のアミノ酸置換による影響は異なり、65 番目は Lys ではなく Arg でなければならぬのに対して 7 番目は Ala や Glu では活性がないが Lys でも Arg でも活性は変わらなかった。つまり上下の一方はアミノ酸側鎖のアミノ基が適切な位置になければならないが、他方にはアミノ基があれば側鎖の鎖長には依存しない。この特徴により、基質の HMB はポルフィリンのように平面に固定された化合物と違って緩い構造をしていてスピロ中間体への変換などに伴う酵素のコンフォメーション変化に対しても柔軟に対応できることが示唆される。Lys10、Arg148、His173 は Lys7 と Arg65 に挟まれた空間の周囲に存在しており、基質を側面から支えていると考えられる。水酸基を持つアミノ酸残基を置換した場合には活性が低下することが多いが、本研究で立体構造から着目したのは Tyr168 である。Tyr19 の場合には Phe へ置換すると活性の低下が少ないので芳香環が重要であることが判るが、Tyr168 は Phe へ置換しても活性が消失する。Ser や Thr へ変異しても活性が無いことから、この部位には Tyr の水酸基が必要である。Tyr は優れたプロトンドナーではないが、UROS 反応では Tyr168 がプロトンを提供すると考えている。このことを検証する為に、結晶構造で Tyr168 に近接して存在する Ser63、Gly144 をそれぞれ Tyr へ置換し、Tyr168 を Ala 或いは Phe へ置換した 2 変異酵素を作成したが、活性が回復することはなく、Tyr168 をプロトン供給源とすることは現時点では仮説の域を出ない。

(3) 以上の結果を踏まえた分子モデリングにより、ヒト UROS 単体の結晶構造 (A) の基質結合モデル (B) を構築した。2008

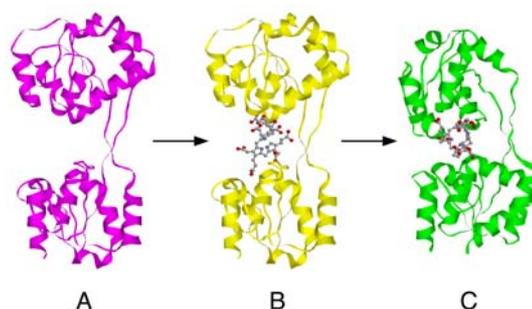


図2 基質結合による UROS の構造変化

年に好熱菌 UROS と生成物複合体の結晶構造 (C) が明らかになり、各ドメインの構造は生物種を超えて似ていたが、2つのドメインをつなぐヒンジ部分が酵素単体では伸びているのに対して、生成物複合体では曲がって生成物を挟んで2つのドメインが近づいていた。本研究で提唱した基質結合モデルは、ドメインが開いた状態の酵素に基質が結合し、酵素が閉じた状態へ変化することで反応の特異性が決定づけられる過程を表していると考えられ、今後必要なことは酵素と基質或いは中間体の複合体結晶構造を明らかにすることである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Sato, H., Sugishima, M., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., Shimokawa, C., Fukuyama, K., Palmer, G., Noguchi, M., Crystal structure of rat haem oxygenase-1 in complex with ferrous verdohaem: Presence of a hydrogen bond network on the distal side., *Biochem. J.*, 419, 339-345, 2009, 査読有
- ② Higashimoto, Y., Sugishima, M., Sato, H., Sakamoto, H., Fukuyama, K., Palmer, G., Noguchi, M., Mass spectrometric identification of lysine residues of heme oxygenase-1 that are involved in its interaction with NADPH-cytochrome P450 reductase., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 367, 852-858, 2008, 査読有
- ③ Nakashima, S., Higashimoto, Y., Noguchi, M., Sakamoto, H., Interaction between heme and synthetic peptides containing heme regulatory motifs of rat heme oxygenase-2., *Peptide Science*, 44, 249-250, 2007, 査読有
- ④ Sato, H., Higashimoto, Y., Sakamoto, H., Sugishima, M., Takahashi, K., Palmer, G., Noguchi, M., Electrochemical reduction of ferrous α -verdoheme in complex with heme oxygenase-1., *J. Inorg. Biochem.*, 101, 1394-1399, 2007, 査読有
- ⑤ Sugishima, M., Oda, K., Ogura, T., Sakamoto, H., Noguchi, M., Fukuyama, K., Alternative cyanide-binding modes to the haem iron in haem oxygenase., *Acta Crystallogr. F*, 63, 471-474, 2007, 査読有
- ⑥ Sugishima, M., Higashimoto, Y., Oishi, T., Takahashi, H., Sakamoto, H., Noguchi, M.,

Fukuyama, K., X-ray crystallographic and biochemical characterization of the inhibitory action of an imidazole-dioxolane compound on heme oxygenase., *Biochemistry*, 46, 1860-1867, 2007, 査読有

- ⑦ Higashimoto, Y., Sato, H., Sakamoto, H., Takahashi, K., Palmer, G., Noguchi, M., The reaction of heme- and verdoheme-heme oxygenase-1 complexes with FMN-depleted NADPH-cytochrome P450 reductase. Electrons required for verdoheme oxidation can be transferred through a pathway not involving FMN., *J. Biol. Chem.*, 281, 31659-31667, 2006, 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 佐藤秀明、ベルドヘム-ヘムオキシゲナーゼ-1 複合体の還元反応、日本化学会第 89 春季年会、2009 年 3 月 29 日、日本大学理工学部船橋キャンパス
- ② 東元祐一郎、質量分析法によるヘムオキシゲナーゼと NADPH-シトクロム P450 還元酵素、ビリベルジン還元酵素との相互作用解析、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド
- ③ 佐藤秀明、CO 配位型ベルドヘム-ヘムオキシゲナーゼ複合体のオキサポルフィリン環の還元、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド
- ④ Sugishima, M., Crystal structure of rat verdoheme-heme oxygenase-1 complex、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド
- ⑤ 東元祐一郎、質量分析法によるヘムオキシゲナーゼと NADPH-シトクロム P450 還元酵素、ビリベルジン還元酵素との相互作用解析、平成 20 年度日本生化学会九州支部例会、2008 年 5 月 17 日、九州大学箱崎キャンパス
- ⑥ 佐藤秀明、 α -ベルドヘム-ラットヘムオキシゲナーゼ-1 複合体の電気化学的還元、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007 年 12 月 11 日、パシフィコ横浜
- ⑦ 東元祐一郎、FMN 欠失 NADPH-シトクロム P450 還元酵素を用いたヘムオキシゲナーゼ反応における電子授受機構の検討、第 7 回日本蛋白質科学会年会、2007 年 5 月

- 25日、仙台国際センター
- ⑧ 杉島正一、イミダゾール-ジオキソレン化合物によるヘムオキシゲナーゼの阻害機構、第7回日本蛋白質科学会年会、2007年5月25日、仙台国際センター
 - ⑨ 東元祐一郎、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伝達機構の検討、平成19年度日本生化学会九州支部例会、2007年5月19日、宮崎県立図書館
 - ⑩ Sato, H.、Degradation of ferriprotoporphyrine IX dimethyl ester by rat heme oxygenase-1.、20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006年6月19日、国立京都国際会館
 - ⑪ Higashimoto, Y.、Reactions of heme and verdoheme in complex with heme oxygenase-1 with NADPH/FMN-depleted NADPH-cytochrome P450 reductase system.、20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006年6月19日、国立京都国際会館

[図書] (計 3 件)

- ① 小俣義明、野口正人、朝倉書店、酵素ハンドブック、2008年、877-885
- ② 野口正人、東京化学同人、生化学辞典、2007年、4、88、181、276、361、370、419、423、512、788、900、902、907、933、1128、1133、1190、1214、1226-1230、1233、1294-1296、1307、1348、1365
- ③ 野口正人、南江堂、シンプル生化学、2007年、45-53、97-104、115-134

6. 研究組織

(1)研究代表者

小俣 義明 (OMATA YOSHIAKI)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20268840

(2)研究分担者

野口 正人 (NOGUCHI MASATO)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：10124611

東元 祐一郎 (HIGASHIMOTO YUICHIRO)

久留米大学・医学部・準教授

研究者番号：40352124

佐藤 秀明 (SATO HIDEAKI)

久留米大学・医学部・準教授

研究者番号：60271996

杉島 正一 (SIGISHIMA MASAKAZU)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：30379292