

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05326

研究課題名(和文)生物に必須なポルフィリン環の構築メカニズムの解明：テトラピロールの生成と環化

研究課題名(英文)Elucidation of the construction mechanism of porphyrin ring essential for organisms: Formation and cyclization of tetrapyrrole

研究代表者

佐藤 秀明 (Sato, Hideaki)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：60271996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：8種の酵素が進める動物のヘム生合成経路のうち、第3段階で働くヒドロキシメチルビルランシンターゼ(HMBS)は、ジピロメタン補因子に4分子の基質を順次縮合して生成物を合成する。本研究では、テトラピロールの構築について理解を深めるため、HMBSの反応機構について構造生物学的手法により検討した。ホロ型および補因子に1-4分子の基質を連結した反応中間体(ES1-ES4)を単離し、そのうちのホロ型とES2、またそれらと基質誘導体との複合体について結晶構造解析に成功した。得られた立体構造からHMBS反応の分子機構を考察した。特にピロール鎖の構築は、単一の基質結合部位での縮合反応の繰り返しで進むと判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘム生合成経路においてピロール環を含む基質4分子からテトラピロールを構築する酵素HMBSが、どのように基質を捕らえて連結していくのかについて、基質誘導体との複合体の立体構造に基づいて示すことができた。このHMBSの基質結合部位に基質誘導体が結合した複合体の立体構造は、本研究で初めて明らかになったものである。研究成果は、ヘム生合成が遺伝的に障害されてポルフィリン前駆体が蓄積するポルフィリン症の原因の理解につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In the animal heme biosynthesis pathway catalyzed by eight enzymes, hydroxymethylbilane synthase (HMBS) that catalyzes the third step forms a product by sequentially condensing four molecules of substrate with dipyrromethane cofactor. In this study, in order to well-understand the construction of tetrapyrrole, the reaction mechanism of HMBS was investigated by structural biology techniques. Holo-HMBS and reaction intermediates (ES1 ~ ES4), in which 1 to 4 molecules of substrate are linked to the cofactor, were isolated, and crystal structures of holo-HMBS, ES2, and the complexes of them with a substrate derivative were analyzed. From the obtained crystal structures, the molecular mechanism of the HMBS reaction was considered. In particular, it was found that the construction of the pyrrole chain proceeds by repeating the condensation reaction at a single substrate-binding site.

研究分野：酵素化学

キーワード：ヘム生合成 ポルフィリン生合成 テトラピロール X線結晶構造解析 酵素反応機構

### 1. 研究開始当初の背景

動物のヘム合成経路は8つの酵素が進める代替が利かない重要な代謝経路であり、どの酵素が欠損してもヘム前駆体が体内に蓄積して難治性疾患のポルフィリン症を発症する。ヘム合成経路の途中で4分子のポルホビリノーゲン (PBG) から1分子のヒドロキシメチルピラン (HMB) を合成するヒドロキシメチルピランシンターゼ (HMBS) については、これまでに大腸菌やヒト、シロイヌナズナのホロ酵素で結晶構造が決定され、それらに基づいて一応のHMB合成機構が提唱されてきた(図1)。しかし、HMBS-基質複合体などの構造は研究開始当初には報告がなく、補因子や基質の結合様式を含めた反応機構の詳細は不明であった。一方、HMBを環状化するウロポルフィリノーゲン III シンターゼ (UROS) に関しては、ヒトや高度好熱性細菌 *T. thermophilus* などで酵素単独の結晶構造が報告されており、溶液中では2つのドメインが比較的柔軟に動く可能性が示唆されている。また、競合阻害剤を用いたNMRによる活性部位マッピングでは、ドメイン間の溝に活性部位が存在する可能性が示されている。さらに、Leeper、Battersbyらは基質類似体および想定される中間体の類似体を化学合成し、阻害実験などからスピロ型中間体を経る反応機構を提案している。しかし、これまでに基質やその類似体と結合したUROSの結晶は得られておらず、反応機構を議論できるような詳しい構造解析は進んでいない。さらに、酵素の非存在下でも自発的に環化してしまう不安定なHMBを、HMBSからUROSへ安定に受け渡す機構についても未知である。このように、生物に必須なポルフィリン環がどのようにして構築されるのかについての理解は十分ではない。

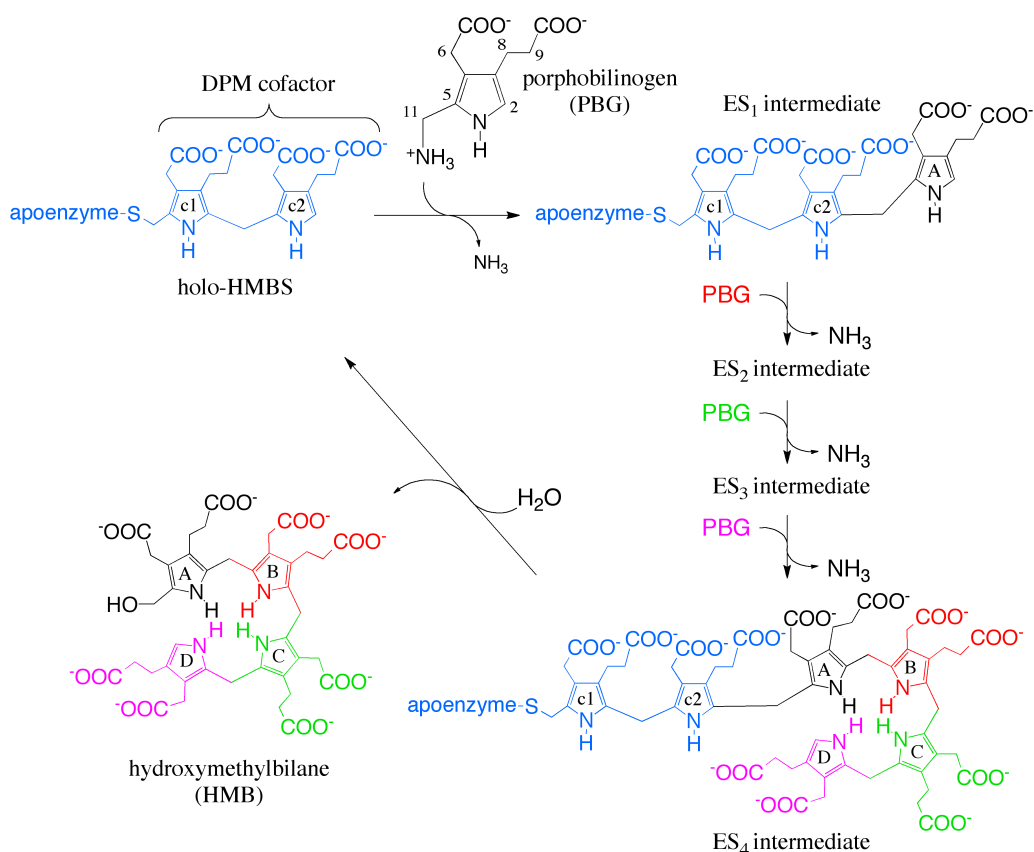


図1. HMBSの反応サイクル

### 2. 研究の目的

ヘムタンパク質の補欠分子族ヘムや葉緑体の色素クロロフィルでは、側鎖の配置が対称的でない。これは両者に共通のポルフィリン合成経路において、HMBSの合成する鎖状テトラピロールのHMBが、UROSによって環状化される際に、そのD環ピロールの反転を伴うためである。本研究では、HMBSによる4分子のPBGから1分子のHMBへの縮合過程と、UROSによるHMBのD環反転を伴う環化過程について、結晶構造と溶液中での反応の両面から検討し、生物に必須なポルフィリンに特徴的である非対称な側鎖配置を生じる酵素反応メカニズムの解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

おもに HMBS が触媒する PBG 4 分子から HMB 1 分子を合成する過程の解明に取り組んだ。これまでに報告された補因子を結合したホロ型の立体構造や変異体の活性測定から、HMBS の活性部位はドメイン間の溝にあると推定された。そこで、基質 PBG やその誘導体である 2-ヨードポルホビリノーゲン (2-I-PBG) を用いて、反応中間体である ES1~ES4 型の各複合体を調製し、X 線結晶構造解析を行った。また、早稲田大学先進理工学部の高野光則教授のご協力を得て、ES2 の揺らぎを分子動力学 (MD) シミュレーションによって解析した。得られた解析結果から HMBS の基質結合部位を示し、4 分子の PBG がどのように活性部位に結合し、どのアミノ酸残基が縮合反応に関わるのかを考察した。

### 4. 研究成果

#### (1) HMBS 反応中間体の単離

ヒト HMBS は大腸菌で大量発現させ、リゾチーム処理、超音波破碎、硫酸分画、4 段階のカラムクロマトグラフィーを経て、ホロ型として調製した。このホロ型 HMBS の希薄溶液に数当量の基質 PBG を加えて monoQ カラムクロマトグラフィーで精製することで、補因子に 1~4 分子の基質を連結した反応中間体 (ES1~ES4) を単離した。それぞれを結晶構造解析に用いた。

#### (2) ホロ型 HMBS とその基質誘導体複合体の構造解析

ホロ型とその基質誘導体 2-I-PBG との複合体の結晶を調製し、それぞれ分解能 1.84 Å、2.40 Å で結晶構造解析を行った。HMBS に基質誘導体を結合させた複合体の立体構造の報告は、本研究が初めてである。

2-I-PBG は全体構造や補因子の位置を変化させずに、ドメイン間の補因子近傍に結合することが示された (図 2)。2-I-PBG の結合には Arg26、Ser28、Gln34、Arg173、Asp99 などのアミノ酸残基側鎖が直接関与しており、ここが基質結合部位であると考えられる。また、ホロ型ではディスオーダーしていた lid ループが、2-I-PBG 存在下では基質結合部位を覆うように観測された。

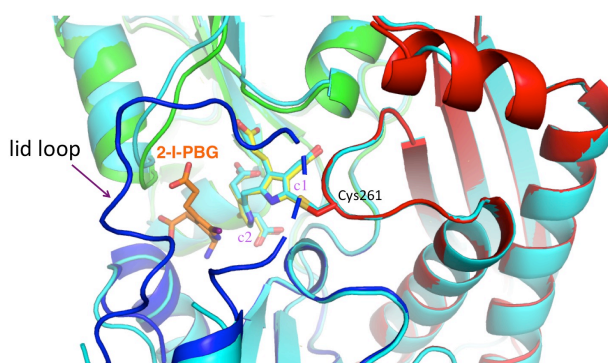


図2. ホロ型HMBSの活性部位。基質誘導体なし(水色)とあり(青、緑、赤色)での比較。c1、c2は補因子。lidループが基質結合部位を覆うように存在。

#### (3) ES2 とその基質誘導体複合体の構造解析

2 分子の基質を連結した反応中間体 ES2、および ES2 と 2-I-PBG との複合体の結晶を調製し、それぞれ分解能 1.79 Å、2.31 Å で結晶構造解析を実施した。HMBS の反応中間体と基質誘導体との複合体について、立体構造の報告はこれが初めてである。

ES2 の全体構造はホロ型と変わらなかった。しかし、活性部位では基質 2 分子に由来するジピロール (A、B) が、ホロ型で補因子が元々存在していた位置に観測され、補因子部分 (c1、c2) は補因子結合ループと共に奥側にずれた配置となっていた (図 3)。

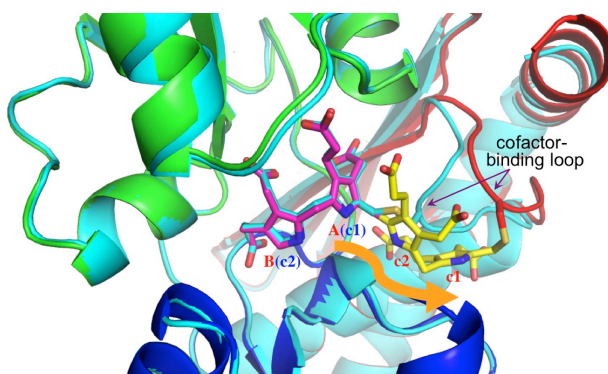


図3. ホロ型(水色)とES2(青、緑、赤色)の活性部位の比較。基質2分子(A、B)の連結に伴って、補因子(c1、c2)の奥側への移動がみられる。



ES2 と 2-I-PBG との複合体の活性部位では、2-I-PBG の結合に伴ってテトラピロール鎖は移動せず、2-I-PBG はドメイン間でテトラピロール鎖の末端近傍に結合していた (図 4A)。この結果から、ES2 では 3 番目の基質分子がドメイン間のテトラピロール鎖の末端近傍に結合して、縮合反応が進行することが示唆された。また、基質誘導体の結合位置は、ホロ型に 2-I-PBG が結合した場合とほぼ同じであった (図 4B)。

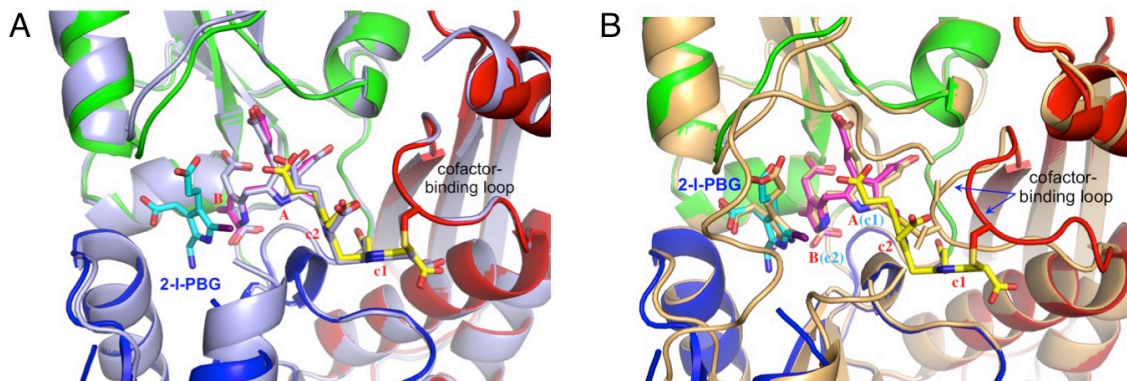


図4. (A) ES2の活性部位。基質誘導体なし(藤色)とあり(青、緑、赤色)での比較。テトラピロール鎖の配置はほぼ同じ。(B) 基質誘導体存在下でのホロ型(橙色)とES2(青、緑、赤色)の活性部位の比較。基質誘導体の結合部位はほぼ同じ。

#### (4) ES2 の MD シミュレーション

高野光則教授 (早稲田大学先進理工学部) のご協力により、ES2 の揺らぎを MD シミュレーションで解析した。ES2 の基質結合部位を覆う lid ループとそれに協調したテトラピロール鎖 (特に c1 ピロール) の揺らぎが観測され、連続する縮合反応に必要な外部からの基質の導入とオリゴピロール鎖の移動に対する、HMBS 分子全体のコンホメーション変化の重要性が示唆された (図 5)。

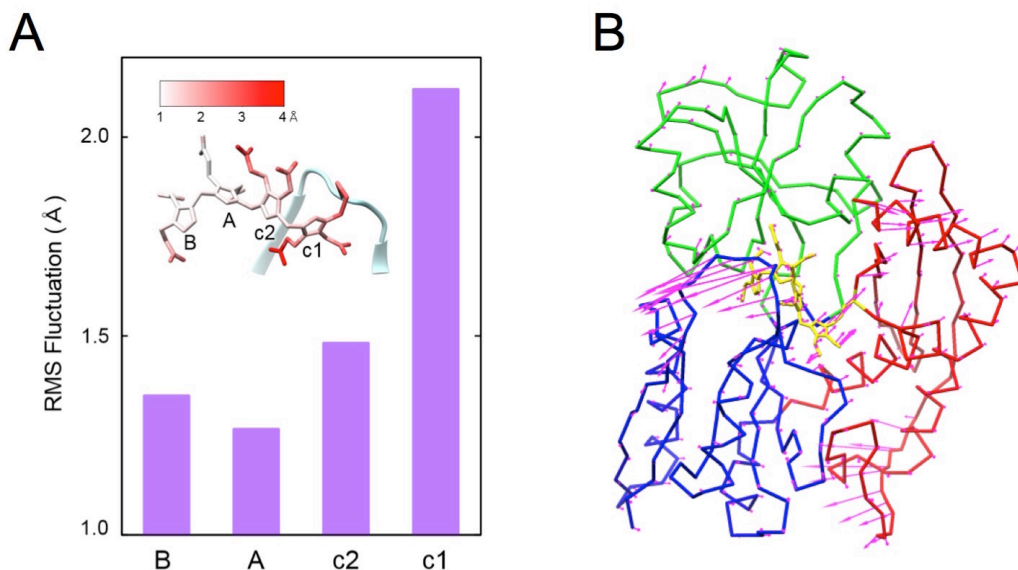


図5. ES2の立体構造の揺らぎに関するMDシミュレーション。テトラピロール鎖の根元のc1ピロール付近(A)と、基質結合部位を覆うlidループ(B)の揺らぎが特に大きい。

#### (5) ES3 と ES1、アポ型 HMBS の構造解析

3 分子の基質を連結した反応中間体 ES3 の結晶化と構造解析にも取り組んできた。これまでのところ、予想に反して ES2 に相当する立体構造が観察されている。少なくとも結晶化前の溶液試料の質量分析では ES3 の存在が確認できていることから、結晶化途中での末端ピロールの解離もしくは結晶内でのオリゴピロール鎖末端の揺らぎが原因と推測され、調製方法の改良などを試みている。

一方、基質を 1 分子だけ連結した反応中間体 ES1 については、予備的な結果として補因子 + 基質 1 分子に相当する電子密度が観測されている。今後、より詳細に解析する予定である。また、尿素や塩酸を用いて補因子を除いたアポ型 HMBS の調製にも取り組んできたが、これまでのところ結晶化に必要な量は得られていない。

### (6) HMBS 反応機構の考察

これまでに得られたホロ型と ES<sub>2</sub>、またそれらと基質誘導体との複合体の立体構造から、次のような HMBS 反応の分子機構が考えられる。まず基質 PBG が補因子近傍の基質結合部位に結合し、補因子と基質のピロール環が架橋されて、オリゴピロール鎖がピロール環 1 単位だけ活性部位の奥側にずれる (図 6)。次に別の基質分子がオリゴピロール鎖末端の近傍の同じ基質結合部位に結合し、架橋以降の過程を繰り返してヘキサピロール鎖まで伸長する。最後にこれの加水分解で HMB が解離する。特に、オリゴピロール鎖の構築は、単一の基質結合部位における縮合反応の繰り返しによって進行するものと考察した。

本研究の基質誘導体を用いた構造解析で明らかになった、基質 (誘導体) の結合に関与するアミノ酸残基 (Arg26、Ser28、Gln34、Arg173、Asp99 など) については、活性低下を伴うそれぞれの変異体が急性間欠性ポルフィリン症患者で報告されていることから、基質結合に重要な役割を果たしていることが強く示唆される。

今後、アポ型や他の反応中間体の立体構造についても解析を進めて、HMBS のより詳細な反応機構について明らかにする予定である。

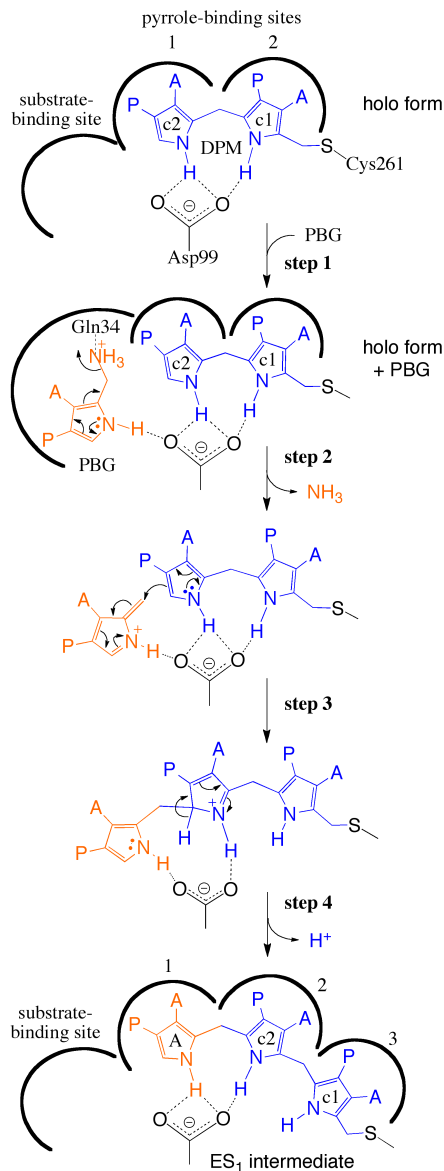


図6. HMBS反応の分子機構

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sato Hideaki, Sugishima Masakazu, Tsukaguchi Mai, Masuko Takahiro, Iijima Mikuru, Takano Mitsunori, Omata Yoshiaki, Hirabayashi Kei, Wada Kei, Hisaeda Yoshio, Yamamoto Ken	4. 巻 478
2. 論文標題 Crystal structures of hydroxymethylbilane synthase complexed with a substrate analog: a single substrate-binding site for four consecutive condensation steps	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 1023 ~ 1042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20200996	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sugishima Masakazu, Taira Junichi, Sagara Tatsuya, Nakao Ryota, Sato Hideaki, Noguchi Masato, Fukuyama Keiichi, Yamamoto Ken, Yasunaga Takuo, Sakamoto Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Conformational Equilibrium of NADPH?Cytochrome P450 Oxidoreductase Is Essential for Heme Oxygenase Reaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 673 ~ 673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox9080673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sugishima Masakazu, Wada Kei, Fukuyama Keiichi	4. 巻 27
2. 論文標題 Recent Advances in the Understanding of the Reaction Chemistries of the Heme Catabolizing Enzymes HO and BVR Based on High Resolution Protein Structures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 3499 ~ 3518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/0929867326666181217142715	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sugishima Masakazu, Wada Kei, Unno Masaki, Fukuyama Keiichi	4. 巻 59
2. 論文標題 Bilin-metabolizing enzymes: site-specific reductions catalyzed by two different type of enzymes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Structural Biology	6. 最初と最後の頁 73 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.sbi.2019.03.005	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 -

1. 著者名 Iijima Mikuru, Ohnuki Jun, Sato Takato, Sugishima Masakazu, Takano Mitsunori	4. 巻 9
2. 論文標題 Coupling of Redox and Structural States in Cytochrome P450 Reductase Studied by Molecular Dynamics Simulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45690-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugishima Masakazu, Wada Kei, Fukuyama Keiichi, Yamamoto Ken	4. 巻 295
2. 論文標題 Crystal structure of phytychromobilin synthase in complex with biliverdin IX <sub>a</sub> , a key enzyme in the biosynthesis of phytyochrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 771 ~ 782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011431	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyake Keita, Fushimi Keiji, Kashimoto Tomonori, Maeda Kaisei, Ni Ni Win, Kimura Hiroyuki, Sugishima Masakazu, Ikeuchi Masahiko, Narikawa Rei	4. 巻 287
2. 論文標題 Functional diversification of two bilin reductases for light perception and harvesting in unique cyanobacterium <i>Acaryochloris marina</i> MBIC 11017	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 4016 ~ 4031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15230	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 -

1. 著者名 Sugishima Masakazu, Sato Hideaki, Wada Kei, Yamamoto Ken	4. 巻 593
2. 論文標題 Crystal structure of a NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase (CYPOR) and heme oxygenase 1 fusion protein implies a conformational change in CYPOR upon NADPH/NADP <sup>+</sup> binding	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 868 ~ 875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13360	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 -

1. 著者名 Igarashi Keisuke, Hagiwara Yoshinori, Sugishima Masakazu, Wada Kei, Fukuyama Keiichi, Ikeda Atsushi, Yano Naomine, Kusaka Katsuhiko, Ostermann Andreas, Unno Masaki	4. 巻 18
2. 論文標題 Crystal Growth of a Bilin Reductase PcyA I86D Mutant-Substrate Complex for Neutron Crystallography	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Crystal Growth & Design	6. 最初と最後の頁 5174 ~ 5181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.cgd.8b00607	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 -

1. 著者名 Sugishima Masakazu, Wada Kei, Fukuyama Keiichi	4. 巻 27
2. 論文標題 Recent Advances in the Understanding of the Reaction Chemistries of the Heme Catabolizing Enzymes HO and BVR Based on High Resolution Protein Structures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 3499 ~ 3518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/0929867326666181217142715	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugishima Masakazu, Wada Kei, Unno Masaki, Fukuyama Keiichi	4. 巻 59
2. 論文標題 Bilin-metabolizing enzymes: site-specific reductions catalyzed by two different type of enzymes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Structural Biology	6. 最初と最後の頁 73 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.sbi.2019.03.005	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20件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 佐藤 秀明, 杉島 正一, 塚口 舞, 増子 隆博, 小俣 義明, 和田 啓, 久枝 良雄, 山本 健
2. 発表標題 ヒドロキシメチルピラン合成酵素の反応中間体と基質誘導体との複合体の結晶構造解析
3. 学会等名 2019年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 佐藤 秀明, 杉島 正一, 塚口 舞, 増子 隆博, 小俣 義明, 和田 啓, 久枝 良雄, 山本 健
2. 発表標題 基質誘導体を結合したヒト由来ヒドロキシメチルピランシターゼ反応中間体の結晶構造解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 秀明, 杉島 正一, 塚口 舞, 増子 隆博, 小俣 義明, 和田 啓, 久枝 良雄, 山本 健
2. 発表標題 基質誘導体を結合したヒドロキシメチルピランシターゼ反応中間体の構造解析
3. 学会等名 第43回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 秀明
2. 発表標題 ヘム合成経路におけるピロール結合反応の分子機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤秀明, 杉島正一, 塚口 舞, 増子隆博, 小俣義明, 和田 啓, 久枝良雄, 山本 健
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤秀明, 杉島正一, 塚口 舞, 増子隆博, 小俣義明, 和田 啓, 久枝良雄, 山本 健
2. 発表標題 ヒドロキシメチルピラン合成酵素 (HMBS) の酵素反応と構造変化
3. 学会等名 第42回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤秀明, 杉島正一, 塚口 舞, 増子隆博, 小俣義明, 和田 啓, 久枝良雄, 山本 健
2. 発表標題 2分子の基質を結合したヒトヒドロキシメチルピランシンターゼの結晶構造
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤秀明, 杉島正一, 塚口 舞, 増子隆博, 小俣義明, 和田 啓, 久枝良雄, 山本 健
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

久留米大学研究者紹介：佐藤秀明  
<http://research.kurume-u.ac.jp/data.php?scode=54025632885110>

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	杉島 正一  (Sugishima Masakazu)  (30379292)	久留米大学・医学部・准教授    (37104)	
研究分担者	塚口 舞 (古澤舞)  (Tsukaguchi Mai)  (40624094)	久留米大学・医学部・助教    (37104)	

	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
研究協力者	高野 光則  (Takano Mitsunori)		

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