

平成22年 4月20日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19750150  
 研究課題名（和文） ヘムオキシゲナーゼ-1によるヘム分解機構の解明  
 研究課題名（英文） Investigation of the mechanism of heme degradation by heme oxygenase-1  
 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

研究成果の概要（和文）：ヘムオキシゲナーゼと反応中間体 $\alpha$ -ベルドヘムの複合体を嫌気下で調製し、複合体におけるベルドヘムのオキサポルフィリン環の一電子還元について光電気化学的手法により還元電位を求めた。また、この電気化学的還元およびシトクロム P450 還元酵素から複合体への電子伝達における、CO 等のリガンドの効果について検討した。さらに、嫌気条件下で複合体の結晶構造を解明し、ヘムオキシゲナーゼによる生理的なベルドヘム分解機構について考察した。

研究成果の概要（英文）：Heme oxygenase (HO) catalyses the degradation of heme via three successive monooxygenase reactions. To probe the cleavage mechanism of oxaporphyrin ring of ferrous  $\alpha$ -verdoheme, an intermediate in the HO reaction, ferrous verdoheme-rat HO-1 complex was prepared under anaerobic conditions. Electrochemical reduction of the complex was performed under anaerobic conditions and the reduction potential for one-electron reduction of the oxaporphyrin ring of ferrous verdoheme was determined. Effects of ligands such as CO on the electrochemical reduction and the electron transfer from NADPH-cytochrome P450 reductase to the complex were investigated. In addition, the crystal structure of rat HO-1 in complex with ferrous  $\alpha$ -verdoheme was determined. On the basis of results in these experiments, the degradation mechanism of ferrous verdoheme under the physiological condition has discussed.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,900,000	540,000	3,440,000

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：ヘム代謝，酵素反応機構，酸化還元電位，構造生物学

## 1. 研究開始当初の背景

ヘムオキシゲナーゼ(HO)は、基質であるヘムが自己触媒的にO<sub>2</sub>を活性化し、3段階

の酸素添加反応によってヘムを開環して、ビリベルジンと鉄イオン、一酸化炭素(CO)を生成する酵素である。この反応の進行に

は、NADPH-シトクロムP450還元酵素(CPR)からの電子の供給が不可欠である。HOによるヘム分解機構の理解は、我々を含めた内外の研究者による構造生物学的観点からの研究により、近年大きく進展した。一方、HOの生理的役割は、生体にとって有害な遊離ヘムの分解だけでなく、抗酸化物質としてのビリベルジンや神経伝達物質としての可能性のあるCOの生成にあるとも考えられ、HOに関する臨床的研究も活発になってきている。

HO反応の第1段階(ヘム→ $\alpha$ -ヒドロキシヘム)は $\alpha$ -メソ位の炭素における水酸化である。この反応の活性酸素種は ferric hydroperoxide (Fe(III)-OOH)であり、これが求電子的に $\alpha$ -メソ位の炭素を攻撃することが明らかにされた。第2段階( $\alpha$ -ヒドロキシヘム→ $\alpha$ -ベルドヘム)では特にその電子要求性について、内外の研究者間で議論されてきた。我々は酸化型の $\alpha$ -ヒドロキシヘムは $O_2$ のみでベルドヘムへ転換されることを既に報告した。近年、還元型の $\alpha$ -ヒドロキシヘムも $O_2$ のみでベルドヘムに転換され、反応には815nm付近に吸収極大を示す未同定の間体が介在することを明らかにし、酸化型と還元型の $\alpha$ -ヒドロキシヘムでは反応性が異なることを報告した。第3段階( $\alpha$ -ベルドヘム→ビリベルジン鉄(III)錯体)については、ベルドヘムの化学合成が困難であったためにこれまで十分な検討がなされてこなかったが、我々は4種のベルドヘム異性体を合成・単離する系を既に確立している。

一方我々は、ラットHO-1について、ヘムを結合していないアポ型やヘム結合型、 $N_3 \cdot$ ヘム結合型等の結晶構造を決定し、HOは既知のヘム酵素とは異なるユニークなヘムポケットをもつことを明らかにしてきた。すなわち、ヘム鉄の遠位軸配位子となるアミノ酸が存在せず、代わりにGly139, Gly143の主鎖がヘム鉄に最も接近している。その構造から、我々は、第1段階の水酸化反応におけるO-O結合の開裂に対して、Gly143が関与するinversed heterolysis機構を提唱した。またアポ型の構造から、「誘導適合」によってヘムが結合されること、さらに、CO・ヘム結合型の立体構造から、HOが自ら産生するCOによって反応阻害を受けない構造的基盤を明らかにした。さらに、ビリベルジン鉄錯体結合型の構造から、ビリベルジンがHOから遊離するメカニズムを推定した。

このような酵素反応解析や結晶構造解析の進展にも関わらず、HOによる一連のヘム分解反応のうち、「 $\alpha$ -ヒドロキシヘムのベルドヘムへの転換反応」や「ベルドヘム開環反応」については、未解明な点が多く残る。

## 2. 研究の目的

このような背景を考慮すれば、研究全体の目標はHOによる多段階のヘム分解反応の全容を明らかにすることである。とりわけ本研究においては、第3段階のベルドヘム開環反応の詳細なメカニズムを、分光学的、酵素反応速度論的および構造生物学的手法により明らかにすることを目的とする。

このベルドヘム開環反応には、第1段階と同様なベルドヘムの中心金属の鉄による $O_2$ の活性化が提唱されている。しかし、ベルドヘムの鉄の $O_2$ 親和性はヘム鉄に比べて極めて低く、モデル化合物を用いた実験ではオキサポルフィリン環の還元により生じたラジカル体への $O_2$ 付加が報告されていることから、オキサポルフィリン環への $O_2$ のラジカル付加によって生じるオキソ架橋の開裂も考えられる。これらを検証するために、ベルドヘム・HO-1複合体の電気化学的な還元挙動を検討する。また、ベルドヘム・HO-1複合体へのCPRからの電子伝達も検討する。さらに、ベルドヘム・HO-1複合体を結晶化してその構造を解明し、活性部位周辺に関する情報を得る。これらの知見を総合して、 $O_2$ の活性化の行なわれる部位がベルドヘムの環上なのかそれとも中心金属上なのかを明らかにし、反応経路を考察する。

## 3. 研究の方法

HOによるベルドヘム開環反応は、 $O_2$ と電子を消費して進行するが、ベルドヘムの中心の鉄上に配位した $O_2$ が活性化されるのか、あるいは一電子還元されたオキサポルフィリン環に直接 $O_2$ が付加するのかは、まだ確定していない(図1)。また、ベルドヘムからビリベルジンが生成するまでに必要とされる電子数もはっきりしていない。そこで、このような点について明らかにするために、以下の実験を行なった。

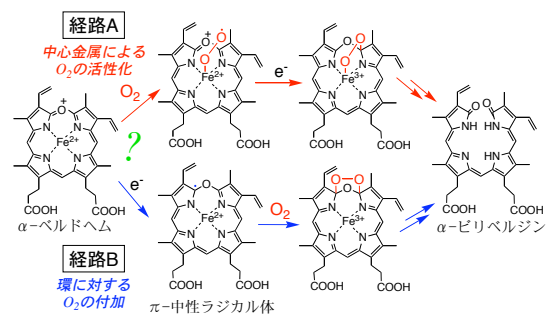


図1:  $\alpha$ -ベルドヘム開環機構の予想

(1) HO-1に結合したベルドヘムの電気化学的還元: HOによってベルドヘムがビリベルジン鉄錯体に転換される開環過程には、ベルドヘムのオキサポルフィリン環が一電

子還元されたベルドヘム  $\pi$ -中性ラジカル体が中間体として関与する可能性が提案されてきた (図1の経路B)。これを検証するため、嫌気条件で鉄(II)  $\alpha$ -ベルドヘムとラットHO-1の複合体を調製し、分光学的および電気化学的手法により検討を加えた。まず、複合体をグローブボックスを用いた嫌気条件で電気化学的に還元し、ベルドヘムのオキサポルフィリン環が還元されたラジカル体が生成するか否かを紫外可視吸収スペクトルにより調べた。また、複合体のベルドヘムのオキサポルフィリン環に対する一電子還元の還元電位を、吸収スペクトルを測定しながら電気化学的手法により求めた。さらに、 $O_2$ の代わりにCOやピリジン等の種々のリガンドを軸配位させた配位子結合型のベルドヘム・HO-1複合体を嫌気条件で調製し、同様の光電気化学的手法を用いて、各種配位子がベルドヘムのオキサポルフィリン環の電気化学的還元反応に及ぼす影響について調べた。

(2) CPRからベルドヘム・HO-1複合体への電子伝達： 生理的な電子供与体であるCPRとNADPHを嫌気条件下で添加し、複合体中のベルドヘムのオキサポルフィリン環が還元されるか否かを吸収スペクトル変化の観測により検討した。CO等の軸配位子の影響についても調べた。

(3) ベルドヘム・HO-1複合体の結晶構造の解明： ベルドヘム開環過程のメカニズムを探るもうひとつのアプローチとして、鉄(II)  $\alpha$ -ベルドヘム・HO-1複合体の結晶化と構造解析に取り組んだ。比較的安定であると考えられる $N_3$ 配位型  $\alpha$ -ベルドヘム・HO-1複合体を嫌気条件で調製し、結晶化した。その立体構造をSPring-8のBL38B1ビームラインを用いて解析した。ベルドヘム・HO-1複合体では、ヘム鉄上にOH<sup>-</sup>が配位していることがESRスペクトルから示唆されていたのでこれを検証し、またベルドヘムに近接しているアミノ酸残基の配置に関する知見を得た。

このような実験から得られた情報を総合して、 $O_2$ の活性化が行なわれる部位がベルドヘムの中心金属上なのか (図1の経路A)、それともオキサポルフィリン環上なのか (図1の経路B) を特定し、HOによるベルドヘム開環反応のメカニズムの詳細を考察した。

#### 4. 研究成果

各電位における鉄(II)  $\alpha$ -ベルドヘム・HO-1複合体の吸収スペクトルを測定したところベルドヘム  $\pi$ -中性ラジカル体の生成が確認された。ネルンストプロット解析により、HO-1に結合した鉄(II)ベルドヘムのオキ

サポルフィリン環に対する一電子還元反応の還元電位として  $-0.47$  V vs. NHEを得た。しかしながら、この値はCPRの補欠分子族FMN、FADや補酵素NADPHの酸化還元電位よりも0.1 V以上低いことから、HO-1に結合した鉄(II)ベルドヘムの環のNADPH/CPR系による還元は熱力学的に起こりにくいことが明らかとなった。すなわち、生理的条件におけるHOによるベルドヘムの開環は、オキサポルフィリン環の一電子還元ではなく、中心の鉄への $O_2$ の配位により開始されることが示唆された (図1の経路A)。

一方、HO-1に結合したCO配位型鉄(II)ベルドヘムの環の還元電位は $-0.41$  V vs. NHEであり、CPRの各補欠分子族の酸化還元電位よりはやや低いものの、HO-1に結合したCO配位型ベルドヘムの環がNADPH/CPR系によって還元される可能性を示唆していた。また、ピリジンやイミダゾール、 $N_3^-$ をリガンドとした場合には、このような還元電位の上昇は認められなかった。

これをさらに詳しく検討するため、CPRとNADPHを反応系に加えた時の鉄(II)  $\alpha$ -ベルドヘム・HO-1複合体の紫外可視吸収スペクトル変化を嫌気条件で観測したところ、外来配位子を添加しない場合には反応が進行しないのに対し、COを配位させた場合には一電子還元反応による  $\pi$ -中性ラジカル体の生成が確認できた。この結果は、ベルドヘムの鉄にCOが配位することによってオキサポルフィリン環の還元電位が上昇し、CPRからオキサポルフィリン環への電子伝達が容易になったことを示している。生理的条件におけるHOによる鉄(II)  $\alpha$ -ベルドヘムの分解過程でも、まず $O_2$ が鉄に軸配位した後、オキサポルフィリン環がCPRにより還元されて、ビリベルジン鉄錯体への転換が進行するものと推測される (図1の経路A)。

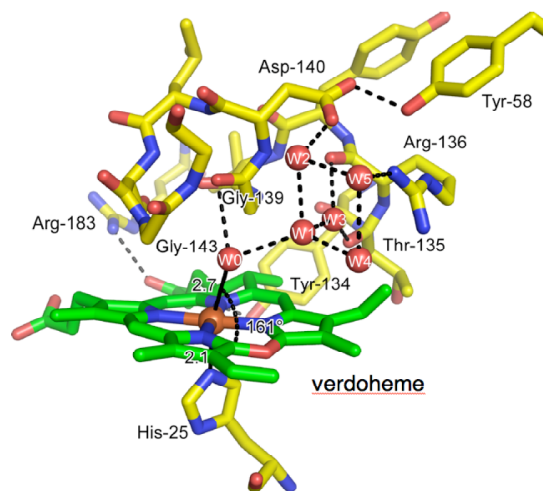


図2: ベルドヘム・HO-1複合体のベルドヘム周辺構造

さらに、全操作を嫌気下で行なうことで、ベルドヘム・ラットHO-1複合体を結晶化し、その立体構造を2.2Åの分解能で得ることができた。ベルドヘム・HO-1複合体の全体構造はヘム・HO-1複合体とほぼ同様であり、また、H<sub>2</sub>OまたはOHが遠位軸配位子としてベルドヘムの鉄に対して配位していることが明らかとなった(図2)。さらに、ヘム・HO-1複合体やビリベルジン鉄錯体・HO-1複合体と同様、ベルドヘムの遠位側には複数の水分子とアミノ酸残基で構成される水素結合ネットワークが観測された(図2)。このことより、HO反応の第1段階におけるヘムから $\alpha$ -ヒドロキシヘムへの酸素添加と同様に、第3段階の $\alpha$ -ベルドヘムからビリベルジン鉄錯体への分解においても、活性酸素中間体(おそらくはFe(III)-OOH)の生成に必要なプロトン供与体としてこの水素結合ネットワークが働いている可能性が示された。

#### 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5件)

- (1) Hideaki Sato, Masakazu Sugishima, Hiroshi Sakamoto, Yuichiro Higashimoto, Chizu Shimokawa, Keiichi Fukuyama, Graham Palmer, and Masato Noguchi: 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) 査読あり.
  - (2) Kenichi Takahashi, Saori Harada, Yuichiro Higashimoto, Chizu Shimokawa, Hideaki Sato, Masakazu Sugishima, Yasuhiko Kaida, and Masato Noguchi: Involvement of Metals in Enzymatic and Nonenzymatic Decomposition of C-Terminal  $\alpha$ -Hydroxyglycine to Amide: An Implication for the Catalytic Role of Enzyme-Bound Zinc in the Peptidylamidoglycolate Lyase Reaction, *Biochemistry* **48**, 1654-1662 (2009) 査読あり.
  - (3) Yuichiro Higashimoto, Masakazu Sugishima, Hideaki Sato, Hiroshi Sakamoto, Keiichi Fukuyama, Graham Palmer, and Masato Noguchi: 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) 査読あり.
  - (4) Hideaki Sato, Yuichiro Higashimoto, Hiroshi Sakamoto, Masakazu Sugishima, Kenichi Takahashi, Graham Palmer, and Masato Noguchi; Electrochemical Reduction of Ferrous  $\alpha$ -Verdoheme in Complex with Heme Oxygenase-1, *J. Inorg. Biochem.* **101**, 1394-1399 (2007) 査読あり.
  - (5) Hiroaki Kitagishi, Koji Oohora, Hiroyasu Yamaguchi, Hideaki Sato, Takashi Matsuo, Akira Harada, and Takashi Hayashi; Supramolecular Hemoprotein Linear Assembly by Successive Interprotein Heme-Heme Pocket Interactions, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 10326-10327 (2007) 査読あり.
- [学会発表] (計15件)
- (1) 佐藤秀明, 杉島正一, 坂本 寛, 東元祐一郎, 福山恵一, 野口正人; ベルドヘム-ヘムオキシゲナーゼ-1複合体の構造解析 (Crystal structure of verdoheme-heme oxygenase-1 complex) (日本化学会第90春季年会, 2010年3月29日, 東大阪)
  - (2) 下川千寿, 原田沙織, 東元祐一郎, 佐藤秀明, 杉島正一, 野口正人; ペプチドアミド化反応における亜鉛および鉄イオンの役割 (The roles of zinc and iron ion in peptide amidation) (日本化学会第90春季年会, 2010年3月28日, 東大阪)
  - (3) Hideaki Sato, Masakazu Sugishima, Yuichiro Higashimoto, Hiroshi Sakamoto, Chizu Shimokawa, and Masato Noguchi; Ferrous  $\alpha$ -Verdoheme in Complex with Rat Heme Oxygenase-1. Its Crystal Structure and Electrochemistry (The 6th International Congress on Heme Oxygenases: Heme Oxygenases in Biology and Medicine, 2009年10月2日, Miami Beach, Florida, U.S.A.)
  - (4) 佐藤秀明, 杉島正一, 東元祐一郎, 坂本 寛, 福山恵一, 野口正人;  $\alpha$ -ベルドヘム-ヘムオキシゲナーゼ-1複合体の電気化学と結晶構造(第24回生体機能関連化学シンポジウム・第12回バイオテクノロジー部会シンポジウム, 2009年9月14日, 福岡)
  - (5) 下川千寿, 原田沙織, 東元祐一郎, 佐藤秀明, 杉島正一, 野口正人; Peptidylamidoglycolate lyase反応における鉄および亜鉛イオンの役割(第24回生体機能関連化学シンポジウム・第12回バイオテクノロジー部会シンポジウム, 2009年9月14日, 福岡)
  - (6) 佐藤秀明, 杉島正一, 坂本 寛, 東元祐一郎, 野口正人;  $\alpha$ -ベルドヘム-ヘムオキシゲナーゼ-1複合体の結晶構造(平成21年度日本生化学会九州支部例会, 2009年5月17日, 福岡)
  - (7) 佐藤秀明, 東元祐一郎, 坂本 寛, 杉島正一, 野口正人; ベルドヘム-ヘムオキシゲナーゼ-1複合体の還元反応 (Reduction of verdoheme-heme oxygenase-1 complex) (日

- 本化学会第89春季年会, 2009年3月29日, 船橋)
- (8) 東元祐一郎, 杉島正一, 佐藤秀明, 下川千寿, 原田沙織, 坂本 寛, 野口正人; 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 (BMB2008), 2008年12月10日, 神戸)
- (9) 佐藤秀明, 東元祐一郎, 坂本 寛, 杉島正一, 下川千寿, 原田沙織, 野口正人; 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 (Reduction of oxaporphyrin ring of CO-bound verdoheme-heme oxygenase 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 (BMB2008), 2008年12月10日, 神戸)
- (10) Masakazu Sugishima, Hideaki Sato, Yuichiro Higashimoto, Hiroshi Sakamoto, Chizu Shimokawa, Saori Harada, Keiichi Fukuyama, and Masato Noguchi; 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 (BMB2008), 2008年12月10日, 神戸)
- (11) 東元祐一郎, 杉島正一, 佐藤秀明, 坂本寛, 野口正人; 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18日, 福岡)
- (12) 四ッ谷景子, 杉本 宏, 大槻崇史, 佐藤秀明, 吉田 匡, 小倉尚志, 城 宜嗣; 共鳴ラマン分光法によるインドールアミン2,3ジオキシゲナーゼの解析 (Analysis of substrate interaction of human indoleamine 2,3-dioxygenase by resonance Raman spectroscopy and site-directed mutagenesis) (第45回日本生物物理学会年会, 2007年12月23日, 横浜)
- (13) 佐藤秀明, 東元祐一郎, 坂本寛, 野口正人;  $\alpha$ -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 (Electrochemical reduction of ferrous  $\alpha$ -verdoheme-rat heme oxygenase-1 complex) (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 (BMB2007), 2007年12月11日, 横浜)
- (14) 東元祐一郎, 佐藤秀明, 杉島正一, 坂本寛, 野口正人; 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)

- (15) 佐藤秀明, 東元祐一郎, 坂本 寛, 野口正人; ベルドヘム-ヘムオキシゲナーゼ複合体の電気化学的還元 (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)

[その他]

ホームページ

<http://gmed.kurume-u.ac.jp/rink/index3.html>

## 6. 研究組織

### (1) 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