

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20750125

研究課題名 (和文) 新規ヘム分解反応の解明と生体内検出

研究課題名 (英文) A novel heme catabolism: Reaction mechanism and detection from biological systems

研究代表者

松井 敏高 (MATSUI TOSHITAKA)

東北大学・多元物質科学研究所・講師

研究者番号：90323120

研究成果の概要 (和文)：

ヘムオキシゲナーゼ(HO)はヘム分解を触媒する酵素であるが、申請者は新たな HO 反応を発見し、従来とは異なるヘム代謝産物が生成することを見いだした。本研究では、新規 HO 反応のメカニズム解明を目指し、HO の反応および構造を詳細に解析した。また、新規代謝産物を生物試料から検出することに成功し、新規 HO 反応が生体内でも進行することを示した。本成果により、新規 HO 反応の生理的意義を解明するための基盤情報が得られた。

研究成果の概要 (英文)：

Heme oxygenase (HO) is an enzyme that catalyzes oxidative heme degradation. We recently have found a novel heme catabolic reaction by HO to produce new products *in vitro*. In this research project, the HO reactions were extensively studied by means of reaction analysis, structural analysis and theoretical calculation to clarify the novel HO reaction. The new heme catabolite was successfully detected in mammalian cell culture so that the novel HO reaction can proceed in living organisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：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・反応機構・酸素活性化・ベルドヘム

## 1. 研究開始当初の背景

ヘムオキシゲナーゼ (HO)はヘムを酸化的に分解し、鉄イオン・一酸化炭素 (CO)・ビリベルジンに変換する酵素である。HO 反応はヘム代謝のみでなく、ビリベルジンによる抗酸化作用、CO によるシグナル伝達などの生理機能を有する。近年、O<sub>2</sub>センサーとしての重要性も解明されつつあり、HO の活性制御や反応産物の生理機能に関する研究が盛んに行われている。

HO 反応は全14ステップにおよぶ複雑な反応であり、主な律速段階はベルドヘム中間体が開環してビリベルジンを与える反応である。申請者は、HO 反応機構の解明に携わるなかで、ポルフィリン環が“ビリベルジンではない色素”に開裂する新規ヘム代謝反応を *in vitro* 実験で発見した。この新規 HO 反応は生理的に可能な条件で観測され、新たな反応経路により HO の反応特性は大きく変化する。よって、新反応は生体内でも進行し、HO 生理機能に大きな影響を与える可能性が高いと考えられた。しかし、新 HO 反応の触媒特性やメカニズムの変化は明らかでなく、実際の生体内でも進行するかは不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、新 HO 反応の詳細を明らかにし、その生理的意義の解明に向けた基盤情報の整備を主な目的とする。

新 HO 反応のメカニズム解明に当たっては、まず、通常のヘム代謝反応の機構解明が必須となる。特に、律速段階となるベルドヘム中間体の開環メカニズムは未だ不明な点が多く、新 HO 反応においてもベルドヘム中間体が中心的役割を果たしていることが示唆されている。次に、新 HO 反応自体のメカニズムを検討し、生成物に変化する機構を中心に解明を試みる。また種々の反応条件における活性や生成物変化を定量的に明らかにすることで、新 HO 反応が HO の触媒特性にどのような影響を与えるかを明らかにする。

新 HO 反応の生理的意義の解明に向けては、まず、新規ヘム代謝産物が有する抗酸化能を測定し、通常生成物との比較により、新反応が HO の抗酸化特性に与える影響を明らかにする。さらに、新規ヘム代謝産物の動物細胞からの検出を試み、新 HO 反応が生体内でも

進行することを証明する。触媒特性の変化と併せて、新 HO 反応が生体に与える影響を正確に予測する。

## 3. 研究の方法

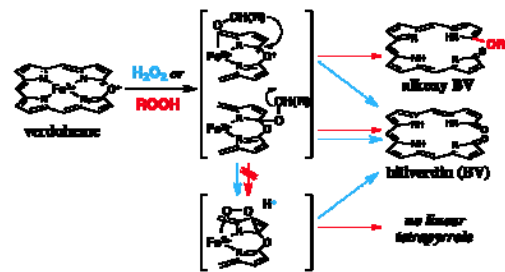
ベルドヘム中間体の開環メカニズムに関して、まずベルドヘム-HO 複合体を完全嫌気状態で結晶化し、その構造を決定した。さらに、アルキル過酸化化物との反応を行い、その生成物解析によって反応機構を絞り込んだ。また、Mössbauer 分光測定によって反応中間体の同定を試み、結晶構造に基づいた理論計算も行うことで、提案したメカニズムの妥当性についても検証した。

新 HO 反応についても詳細な反応解析を行い、触媒活性の解析・反応機構の決定などを試みた。また、新規生成物の抗酸化特性を *in vitro* でビリルビンと比較した。

新規生成物の細胞からの検出には U937, HeLa, Raw264.7 の各細胞株を用いた。培地中に放出される代謝物の固相抽出法を開発し、HPLC により分析・定量を行った。

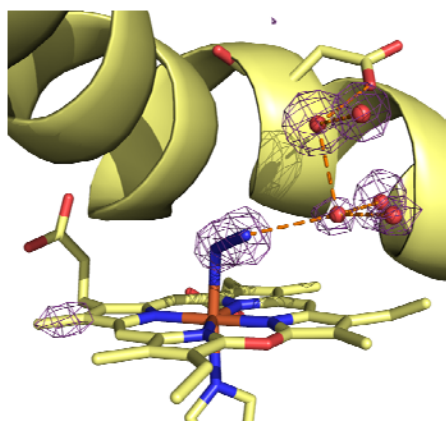
## 4. 研究成果

(1) ベルドヘム開環反応の酸素源としてアルキルパーオキシドを用いると、開環部にアルコキシ基が導入された生成物が得られた。この結果から、酸素・過酸化水素はベルドヘム鉄に結合し、Fe-OOH 型活性種の末端 OH 基が分子内転移することによって開環反応が進行することが強く提案された。

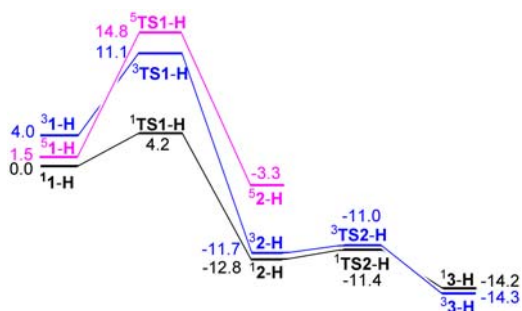


(2) ベルドヘム-HO 複合体の嫌気条件下での結晶化に成功し、Fe(II)複合体およびそのアザイド結合型の構造解析に成功した。HO に特徴的な活性中心の水素結合ネットワークは保たれており、Fe-OOH 近傍の水分子が

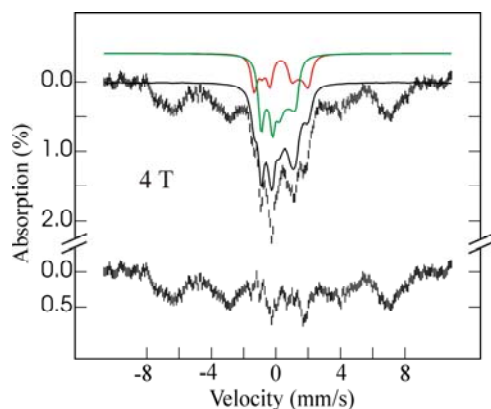
OH 基の転移に重要であることが示唆された。



(3) 上記の結晶構造を元に理論計算を行ったところ、Fe-OOH 型を活性種とする機構はエネルギー的にも十分に起こりえることが示された。経路によっては活性化エネルギーが最大 4 kcal/mol 程度しかなく、非常に進行しやすい反応であることが示された。



(4) <sup>57</sup>Fe でラベルしたベルドヘムを合成し、HO との複合体の調製後、過酸化水素との反応により生成する中間体の Mössbauer スペクトルを測定した。2 種の生成物が観測され、うち 1 つは予想されていた Fe(IV) 錯体であった。今後、より詳細な分光測定を行い、これら中間体の同定を進めることにより、ベルドヘム開環機構の完全解明が可能と考えられる。



(5) HO には 2 つのアイソフォーム (HO-1, HO-2) が存在するが、そのいずれにおいても新 HO 反応は進行した。メカニズムは両アイソザイムではほぼ同じであり、ポルフィリン環の開裂は酸素非依存的に進行した。また、新反応では酸素濃度に応じて生成物が変化すること示し、その濃度依存性とメカニズムを明らかにした。さらに、新規生成物の合成法を開発し、抗酸化作用は通常生成物と大きくは変わらないことを見いだした。これらの結果から、新反応が生体内で進行した場合、HO の抗酸化作用には影響がほとんどないものの、酸素センサーとしての機能は大きな影響を受けると考えられる。

(6) 各種動物細胞株をヘム存在下で培養し、新規ヘム代謝産物の直接検出を試みた。U937 細胞ではビリルビン量が極端に少なく、酸化型であるビリベルジンが検出される例もあった。そこで、ビリベルジン還元酵素の活性が高いとされる HeLa 細胞, Raw264.7 細胞での反応を検討したところ、高濃度のビリルビンが検出された。これら 2 種の細胞株を用いて様々な反応条件を検討したところ、大量の細胞を用い、比較的短時間の反応を行った際に、新規ヘム代謝産物が明瞭に検出された。この結果は、新規ヘム代謝反応が生体内でも進行することを示した初めての結果である。

今後、精製酵素で得られた触媒特性を培養細胞の反応系でも検討し、生体内での新反応の挙動について明らかにすることが期待される。新反応の起こりやすい環境を明らかにし、動物などからの検出にも成功すれば、新反応が持つ生理的意義の解明につながるものと期待される。

#### 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 3 件)

1. T. Matsui, M. Iwasaki, R. Sugiyama, M. Unno, M. Ikeda-Saito, "Dioxygen activation for self-degradation of heme: Reaction mechanism and regulation of heme oxygenase", 査読有, *Inorganic Chemistry* (2010), 49, 3602-9.
2. T. Matsui, M. Unno, M. Ikeda-Saito, "Heme oxygenase reveals its strategy for catalyzing three successive oxygenation

- reactions”, 査読有, *Accounts of Chemical Research* (2010), 43, 240-7.
3. T. Matsui, K. Omori, H. Jin, M. Ikeda-Saito, “Alkyl peroxides reveal the ring opening mechanism of verdoheme catalyzed by heme oxygenase”, 査読有, *Journal of the American Chemical Society* (2008), 130, 4220-1.

[学会発表] (計 12 件)

1. 松井敏高, 大森宏平, 齋藤正男, “ベルドヘム-ヘムオキシゲナーゼ複合体の構造解析”, 第 42 回酸化反応討論会, 2009.11.15, 仙台
2. 松井敏高, “ヘムオキシゲナーゼによる合理的なヘム分解機構”, 第 82 回日本生化学会大会, 2009.10.24, 神戸
3. T. Matsui, K. Omori, M. Ikeda-Saito, “Ring Opening Mechanism of Verdoheme Catalyzed by Heme Oxygenase”, 2nd International Symposium on Bioinorganic Chemistry of the New Era, 2009.7.31, 高山
4. T. Matsui, K. Omori, M. Unno, M. Ikeda-Saito, “Crystal Structure of Verdoheme-Heme Oxygenase Complex: Implications for Oxygen Activation Mechanism”, 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 2009.7.25-2009.7.30, 名古屋
5. 松井敏高, “ヘムオキシゲナーゼにおける合理的なヘム分解戦略”, 生体分子科学討論会若手研究者討論会, 2009.6.18, 小樽
6. 松井敏高, “ヘムオキシゲナーゼの分子機構: 反応機構から何が分かるか?”, 日本化学会第 89 春季年会・特別企画公演「若手研究者が語る次世代生物無機化学」, 2009.3.30, 船橋
7. 松井敏高, 大森宏平, 海野昌喜, 齋藤正男, “ヘムオキシゲナーゼ最終段階の反応機構と構造解析”, BMB2008 (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), 2008.12.10, 神戸
8. 松井敏高, 大森宏平, 海野昌喜, 齋藤正男, “ヘムオキシゲナーゼ最終段階の反応機構と構造解析”, 第 41 回酸化反応討論会, 2008.11.28, 福岡
9. 松井敏高, “ヘム分解酵素の分子機構”, 「連携ラボ」第 4 回公開シンポジウム, 2008.10.10, つくば
10. 松井敏高, “ヘムの上手な壊し方: ヘムオキシゲナーゼの反応機構”, 第 21 回生物無機化学夏季セミナー, 2008.8.4, 京都

11. T. Matsui, M. Unno, M. Ikeda-Saito, “Structure and Molecular Mechanism of Heme Oxygenase Catalysis”, Fifth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, 2008.7.11, モスクワ
12. 松井敏高, 大森宏平, 齋藤正男, “ヘムオキシゲナーゼによるベルドヘム開環メカニズム”, 第 18 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2008.6.5-2008.6.6, 名古屋

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松井 敏高 (MATSUI TOSHITAKA)  
東北大学・多元物質科学研究所・講師  
研究者番号: 90323120