

機関番号：37104

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20770092

研究課題名 (和文) ヘムオキシゲナーゼへの還元力供給経路に関する生化学的・構造生物学的研究

研究課題名 (英文) Structural and biochemical studies about electron pathways in heme oxygenase-redox counterpart complex

研究代表者

杉島 正一 (SUGISHIMA MASAKAZU)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：30379292

研究成果の概要 (和文)：ヘムオキシゲナーゼ (HO) は NADPH-シトクロム P450 還元酵素 (CPR) からの還元力と分子状酸素を用いて、ヘムを分解する酵素である。本研究は NADPH からヘムへの還元力の供給経路解明および HO-CPR 複合体の立体構造解析を目的とし、反応の中間段階であるヒドロキシヘムからベルドヘムへ至る反応に必要な還元力の供給経路、ヘムの持つ二つのプロピオン酸側鎖の還元力授受における役割について検討した。HO-CPR 複合体の良質な結晶は得られなかったが、複合体を安定化する条件を見出した。

研究成果の概要 (英文)：Heme oxygenase (HO) catalyzes the heme degradation utilizing molecular oxygen and reducing equivalents from NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR). The purposes of this study are the characterization of electron pathway between NADPH bound to CPR to heme bound to HO, and the structure determination of HO-CPR complex. We attempted to characterize the electron pathway from NADPH to hydroxyheme in the conversion from hydroxyheme to verdoheme, which are reaction intermediates in HO reaction, and to characterize the function of each propionate side chain of heme in the electron transfer to the heme iron. Unfortunately, we could not obtain good crystals of HO-CPR complex, but we found the condition to stabilize this transient complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：蛋白質結晶学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶解析、分子間相互作用、生体金属分子化学

## 1. 研究開始当初の背景

ヘムオキシゲナーゼ (HO) は分子状酸素と NADPH-シトクロム P450 還元酵素 (CPR) からの還元力を利用し、3段階の酸素添加反応 (ヘム → ヒドロキシヘム → ベルドヘム → ビリベルジン) によって、ヘムを部位特異的に開裂し、ビリベルジン、一酸化炭素、鉄に分解する酵

素である。HO の主要な生理的役割は老朽化した赤血球の新陳代謝によって生じた多量の遊離型ヘムを分解し、体内の鉄の恒常性を維持することである。この役割に加えて、近年、酸化ストレスに対する防御や、分解反応によって生じた一酸化炭素をシグナル伝達物質とする抗炎症作用、抗アポトーシス作用など

があることが見いだされ、注目を集めている。HO は生理的に重要な酵素であるが、その一方で反応機構においても、基質であるヘム自身が酸素を活性化する補酵素として機能する点でユニークな酵素である。このことは、HO の反応機構は、シトクロム P450 など一般のヘム含有オキシゲナーゼのそれとは全く異なることを示唆しており、その反応機構を解明すべく様々な分光学的、生化学的知見が蓄積されてきた。さらに約 10 年前にヘム-HO 複合体の立体構造が明らかになったことによって、立体構造を基盤とした反応機構の描像が描けるようになり、この分野の HO 研究が爆発的に進展し、反応機構の詳細まで明らかになりつつあった。

それに対して、電子供与体である CPR からヘム-HO 複合体中のヘム鉄への電子授受機構については研究開始当初から現在に至るまで、解明が遅れている。

## 2. 研究の目的

本研究では、電子授受機構を明らかにする目的で、以下の 3 点について研究を進めた。

(1) ヒドロキシヘムからベルドヘムへ至る反応過程における CPR 内の電子伝達経路の解明  
CPR は FMN、FAD を補酵素として持つフラビン酵素であり、シトクロム P450 への電子伝達過程においては NADPH→FAD→FMN の順番で電子が受け渡され、最終的にシトクロム P450 の持つヘムへ電子が受け渡される。

HO に対しての電子伝達過程も同様であると考えられていたが、以前の我々の研究により、ベルドヘムからビリベルジンへ至る反応過程に必要な電子については、人為的に作成した FMN 欠損 CPR を用いても反応を触媒できることが明らかとなり、この過程では必ずしも FMN を介さないことが明らかとなった (Higashimoto Y. et al. J. Biol. Chem. 281 (2006) 31659-31667)。逆にヘムからヒドロキシヘムへ至る反応過程では FMN が必須であることも明らかとなった。そこで、本研究ではヒドロキシヘムからベルドヘムへ至る過程において、FMN が必要かどうか検討した (図 1)。

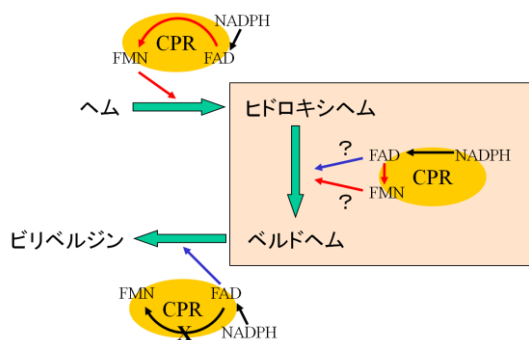


図 1 HO の反応過程における電子伝達経路の違い

(2) ヘムプロピオン酸側鎖の電子伝達における役割

ヘムプロピオン側鎖はヘム分子の持つ唯一の酸解離基であることから、電子授受に必要な側鎖であると考えられており、実際にヘムプロピオン酸側鎖に化学的修飾を加えた化合物を用いた HO 反応の解析がなされている。本研究では、我々はヘム分子に二本あるプロピオン側鎖の片方をメチル基に置換した片足ヘム二種類 (図 2) を用いて、HO に対する反応性および複合体の立体構造解析を目的とした。

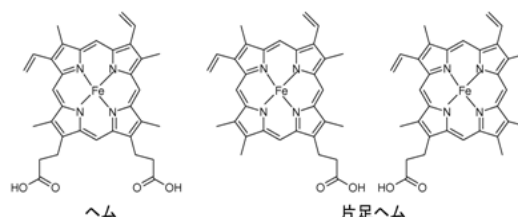


図 2 ヘムと片足ヘム

(3) HO-CPR 複合体の構造解析

HO-CPR 間の電子授受機構を明らかにするうえで、欠かせないのが複合体の構造基盤である。それぞれ個別の蛋白質の立体構造は決定されているが、複合体の立体構造は明らかではない。そこで、この複合体の X 線結晶解析による立体構造決定を目的とした。

## 3. 研究の方法

実験すべてにおいて必要な HO (HO-1) および CPR は大腸菌を用いて発現させたラット由来組換え蛋白質を用いた。HO および CPR はそれぞれ膜結合領域を持つが、その領域を除いた蛋白質を発現し、実験に使用した。蛋白質は各種クロマトグラフィーを行うことにより、高純度に精製したものを使用した。

(1) ヒドロキシヘムからベルドヘムへ至る反応過程における CPR 内の電子伝達経路の解明  
ヒドロキシヘムはヘムから坂本らの手法 (Sakamoto H. et al. J. Biol. Chem. 274 (1999) 18196-18200) に従って有機合成した。得られたヒドロキシヘムを嫌気条件下で HO に結合させ、野生型 CPR および FMN 欠損型 CPR を用いて、還元速度の違いを検討した。

(2) ヘムプロピオン酸側鎖の電子伝達における役割

大阪大学大学院工学研究科の林 高史教授に提供いただいた片足ヘムを基質とし、反応過程における吸収スペクトルの変化を比較した。また、片足ヘムにアスコルビン酸を添加することにより、酸化還元的に片足ベルドヘムを合成し、片足ベルドヘムを基質とする場合の反応性についても検討した。

さらに片足ヘム-HO と CPR の親和性を表面プ

ラズモン共鳴法によって測定した。片足へムのHOに対する結合方向を確認するために、シアノバクテリア由来HO-2とそれぞれの片足へムの複合体を結晶化し、大型放射光施設SPring-8の放射光を用いて、X線結晶解析を行った。シアノバクテリア由来HO-2を用いた理由はラット由来HOと片足へム複合体の良質な結晶が得られなかったためである。シアノバクテリア由来HO-2はラット由来HO-1と43%の相同性を持つホモログ蛋白質である。本HO-2は膜結合領域を持たないため、全長を大腸菌を用いて発現させ、得られた組換え蛋白質を各種クロマトグラフィーによって精製し、使用した。

### (3)HO-CPR 複合体の構造解析

HO、CPR、へム結合型HO、NADP<sup>+</sup>結合型CPRを用い、それぞれ様々な混合比率、様々な蛋白質濃度で、それぞれ数百種類の結晶化条件を検討した。

HO-CPR 複合体はゲルろ過クロマトグラフィーによる精製で分離してしまう不安定な複合体であり、結晶化が困難であると予想される。そこで安定な複合体を形成させるため、HOとCPRの融合蛋白質作製、架橋試薬による複合体の安定化、CPRのループ領域数残基を切除した変異CPRとHOの複合体形成を検討した。

## 4. 研究成果

(1)ヒドロキシへムからベルドへムへ至る反応過程におけるCPR内の電子伝達経路の解明  
嫌気条件下で酸化型ヒドロキシへム-HO複合体の還元型への変換を野生型CPRおよびFMN欠損型CPRを用いて、検討した。還元はHOに対して5等量のNADPH、1/100等量のCPRを加えることによって開始し、pH 7.4、室温で実験を行った。還元型へムの変換は可視吸収スペクトルの変化によって確認した。野生型CPRを用いた場合は約30分以内に完全に還元型へムの変換が完了したのに対して、FMN欠損型CPRを用いた場合は60分後にも顕著な変化が見られなかった。以上のことからヒドロキシへムからベルドへムへ至る反応過程ではFMNを経由する電子伝達過程であることが明らかになった。

(2)へムプロピオン酸側鎖の電子伝達における役割

片足へム二種類とHOの複合体を調製し、CPRとの相互作用を検討したが、通常のへム複合体との顕著な違いは見られなかった。反応部位特異性についても、通常のへムを用いた場合と同様に $\alpha$ -メテン部位が開裂される。しかし、反応中の吸収スペクトルの変化については、両者ともへムを用いた場合と同様の反応経路をたどっていると示唆されるもの

の、片方の片足へム複合体のほうが、もう片方に比べて、若干遅いという結果が得られた。これは片足ベルドへムを用いた場合についても同様であった。

シアノバクテリア由来HO-2とそれぞれの片足へムの複合体の立体構造を解析したところ、両者ともにプロピオン酸側鎖がへムポケットの内側を向く配向をしていた。これは、両者の結合方向が表裏逆であることを示している。表裏が逆になっても、開裂部位である $\alpha$ -メテン部位のHOに対しての位置は変わらないので、部位特異性についての結果と矛盾するものではない。

これは、片足へムをアポミオグロビンに結合させた場合には、それぞれの片足へムの結合方向が一定であるという結果と異なる(Harada K. et al. Biochemistry 46 (2007) 9406-9416)。

つまり、アポミオグロビンではへムのメチル側鎖とビニル側鎖の違いをプロピオン酸側鎖より厳しく認識しているが、HOでは逆にプロピオン酸側鎖を厳しく認識しているということである(図3)。

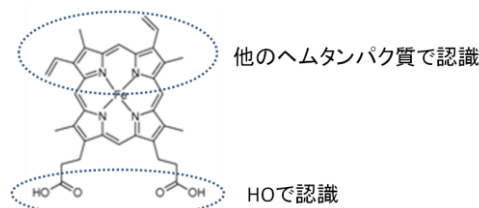


図3 蛋白質による認識部位の違い

この事実は、へム蛋白質の分子認識という意味では興味深い結果だが、電子授受経路を調べるという意味では、どちらの片足へムを用いても、プロピオン酸側鎖のHOに対する相対位置は同じということを示しており、片足へムを用いた実験は不適当という結果を示している。実際に様々な生化学的結果がどちらの片足へムを用いてもほぼ同じという点とも一致する。ただ、反応解析の面では両者に若干の違いが見られている。これはへム分子の表裏によって酸素分子に対しての反応性が若干異なるということを示唆しているのかもしれない。

(3)HO-CPR 複合体の構造解析

HO、CPR、へム結合型HO、NADP<sup>+</sup>結合型CPRを用い、それぞれ様々な混合比率、様々な蛋白質濃度で、それぞれ数百種類の結晶化条件を検討した。しかし、良質な複合体結晶は得られなかった。

HO-CPR 複合体はゲルろ過クロマトグラフィーによる精製で分離してしまう結晶化にとっては不安定な複合体であり、安定な複合体を得ることが良質な結晶を得るために重要である。そこでHO-CPR 融合蛋白質の遺伝子

工学的作成や架橋試薬によって得られた複合体についても、結晶化を検討した。しかし、良質な結晶は得られなかった。

このような結晶化条件の検討過程で、複数の国外の研究グループから CPR の構造と機能について、以下のような報告がなされた (Hamdane D. et al. J. Biol. Chem. 284 (2009) 11374-11384, Ellis J. et al. J. Biol. Chem. 284 (2009) 36628-36637)。CPR の FMN 結合ドメインと連結ドメイン間に存在するループ領域数残基を切除した変異 CPR では、ドメイン間の配置が野生型と異なることが構造解析によって明らかとなった。従来から野生型 CPR のドメイン配置では、シトクロム P450 との複合体形成において不都合が生じることが予想されており、変異蛋白質で見られたドメイン配置 (open conformation) を、野生型 CPR でも、一時的に形成することによって、電子伝達が行われる機構が提唱された (図 4)。

我々は CPR から HO への電子伝達過程においても、CPR が一過的なドメイン配置の転換を行い、HO へ電子伝達を行うのではないかと考え、同様のループ切除型変異 CPR と HO の相互作用を検討した。この変異 CPR はゲルろ過

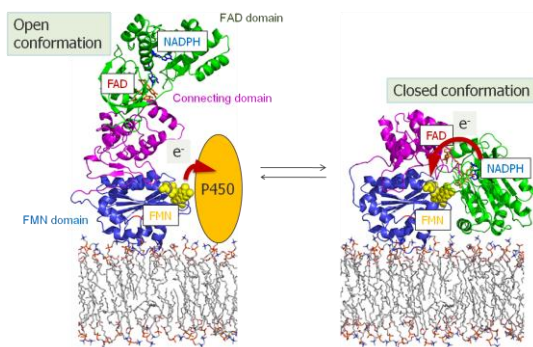


図 4 CPR におけるドメイン配置の転換と電子伝達反応

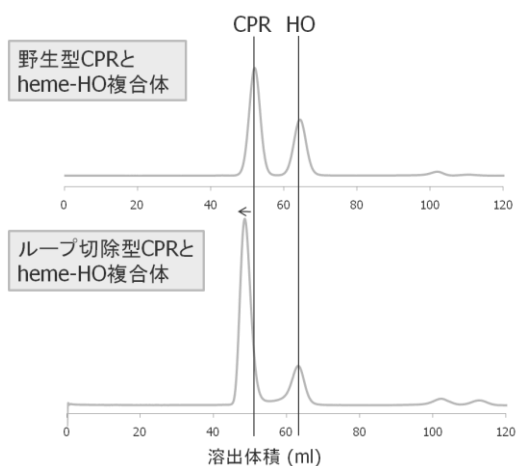


図 5 ゲルろ過クロマトグラフィーによる CPR とヘム-HO 複合体形成の確認

クロマトグラフィーによる精製でも分離しない安定な複合体を HO と形成し (図 5)、野生型と比べて、速度は遅いものの、ヘム-HO 複合体を還元できることを確認した。

また、これまでに CPR との相互作用に重要な役割を果たす HO の表面アミノ酸残基 (K149, K153, R185) が同定されているが (Higashimoto Y. et al. J. Biol. Chem. 280 (2005) 729-737)、これらが変異 CPR との相互作用においても関係していることを架橋試薬との反応性によって確認した。これは、HO と CPR の相互作用様式が変異 CPR においても同様であることを示唆している。

現在は、表面プラズモン共鳴を用いた変異 CPR と HO の詳細な相互作用解析や、変異 CPR と HO の複合体の結晶化について検討を行っている。

## 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 8 件)

- ① Yamaoka M., Sugishima M., 以下 3 名 “Protein dynamics of heme-heme oxygenase-1 complex following carbon monoxide dissociation” J. Raman Spectrosc. 査読有, 42 (2011) 910-916.
- ② Watanabe A., Hirata K., Hagiwara Y., Yutani Y., Sugishima M., 以下 3 名 “Expression, purification and preliminary X-ray crystallographic analysis of the cyanobacterial biliverdin reductase” Acta Cryst. F, 査読有, 67 (2011) 313-317.
- ③ Sato H., Higashimoto Y. Sakamoto H., Sugishima M., 以下 4 名 “Reduction of oxaporphyrin ring of CO-bound  $\alpha$ -verdoheme complexed with heme oxygenase-1 by NADPH-cytochrome P450 reductase” J. Inorg. Biochem., 査読有, 105 (2011) 289-296.
- ④ Sugishima M., 以下 5 名 “Crystal structures of the substrate-bound forms of red chlorophyll catabolite reductase: implications for site-specific and stereospecific reaction” J. Mol. Biol., 査読有, 402 (2010) 879-891.
- ⑤ Hagiwara Y., Sugishima M., 以下 7 名 “Structural insights into vinyl reduction regiospecificity of phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase (PcyA)” J. Biol. Chem., 査読有, 285 (2010) 1000-1007.
- ⑥ Sugishima M., 以下 4 名 “Crystal structure of red chlorophyll catabolite



reductase: enlargement of the ferredoxin-dependent bilin reductase family" J. Mol. Biol., 査読有 389, (2009) 376-387.

- ⑦ Takahashi K., Harada S., Higashimoto Y., Shimokawa C., Sato H., Sugishima M., 以下 2 名 "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, 査読有, 48 (2009) 1654-1662.
- ⑧ Sato H., Sugishima M., 以下 6 名 "Crystal structure of rat haem oxygenase-1 in complex with ferrous verdohaem: presence of a hydrogen-bond network on the distal side" Biochem. J., 査読有, 419 (2009) 339-345.

[学会発表] (計 32 件)

- ① 原田二郎、原田英里砂、東元祐一郎、杉島正一、以下 5 名、NMR によって揺らぎが観測されたヘムオキシゲナーゼ表面アミノ酸の機能解析、日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月 26 日、横浜
- ② Shimokawa C., Harada S., Higashimoto Y., Sato H., Sugishima M., Noguchi M., Roles of zinc and iron in peptide amidation. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), 2010 年 12 月 19 日、Honolulu
- ③ 渡邊彩、平田邦生、萩原義徳、油谷裕子、杉島正一、以下 3 名、微細結晶を用いたシアノバクテリア由来ビリベルジンリダクターゼの結晶学的研究、平成 22 年度日本結晶学会年会、2010 年 12 月 3 日、大阪
- ④ Sugishima M., Structural insights into ferredoxin dependent bilin reductases, The 10th Conference of the Asian Crystallographic Association (AsCA2010), 2010 年 11 月 2 日、Busan
- ⑤ Harada E., Sugishima M., 以下 3 名, Elucidation of heme-recognition mechanism of rat heme oxygenase-1 by relaxation dispersion spectroscopy, XXIVth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), 2010 年 8 月 22-27 日、Cairns
- ⑥ 杉島正一、以下 5 名、基質結合型結晶構造から推定される red chlorophyll catabolite reductase の反応機構、第 10 回日本蛋白質科学会年会、2010 年 6 月 18 日、札幌
- ⑦ 原田英里砂、杉島正一、以下 3 名、NMR によるヘムオキシゲナーゼのヘム認識機構の解明、第 10 回日本蛋白質科学会年会、2010 年 6 月 17 日、札幌
- ⑧ 杉島正一、以下 5 名、Hinge 欠損型 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と相互作用解析、平成 22 年度日本生化学会九州支部例会、2010 年 5 月 23 日、鹿児島
- ⑨ 平順一、杉島正一、以下 3 名、カベオリンによるヘムオキシゲナーゼ-1 の活性阻害および阻害機構の解明、平成 22 年度日本生化学会九州支部例会、2010 年 5 月 22 日、鹿児島
- ⑩ 佐藤秀明、杉島正一、以下 4 名、ベルドヘム-ヘムオキシゲナーゼ-1 複合体の構造解析、日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月 29 日、東大阪
- ⑪ 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、日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月 28 日、東大阪
- ⑫ 杉島正一、以下 5 名、シロイヌナズナ由来 red chlorophyll catabolite reductase および F218V 変異体の基質結合型結晶構造、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 18 日、熊本
- ⑬ 杉島正一、以下 4 名、クロロフィル代謝関連酵素 Red chlorophyll catabolite reductase の立体構造、日本結晶学会 2009 年年会、2009 年 12 月 5 日、西宮
- ⑭ 萩原義徳、杉島正一、以下 7 名、フェレドキシシン依存性ビリル還元酵素 PcyA の部位特異的還元反応を制御する構造要因、日本結晶学会 2009 年年会、2009 年 12 月 5 日、西宮
- ⑮ 杉島正一、以下 4 名、クロロフィル代謝関連酵素 Red Chlorophyll Catabolite Reductase の立体構造、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、神戸
- ⑯ 岩崎浩之、杉島正一、以下 4 名、ラットヘムオキシゲナーゼ-1 と基質ヘムとの結合における誘導適合モデルのカロリメトリー解析、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、神戸
- ⑰ 古賀真也、岩崎浩之、小松英幸、杉島正一、以下 3 名、ヘム分解酵素ヘムオキシゲナーゼのヘム結合解析とヘムセンサーとしての応用、第 58 回高分子討論会、2009 年 9 月 17 日、熊本
- ⑱ 佐藤秀明、杉島正一、以下 4 名、 $\alpha$ -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一部会シンポジウム、2009 年 9 月 14 日、福岡

- ⑱ 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
- ⑳ 杉島正一、以下4名、クロロフィル代謝関連酵素 Red Chlorophyll Catabolite Reductase の立体構造、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
- ㉑ Sugishima M., 以下4名, Crystal structure of red chlorophyll catabolite reductase (RCCR) reveals that RCCR and ferredoxin dependent bilin reductase were evolved from the common ancestor, International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors of Photosynthetic Organisms (ICTPPO) 2009, 2009年7月28日, Pacific grove
- ㉒ Hagiwara Y., Sugishima M., 以下7名, Molecular mechanism of the two-step reduction catalyzed by PcyA, International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors of Photosynthetic Organisms (ICTPPO) 2009, 2009年7月27日, Pacific grove
- ㉓ 杉島正一、以下4名、クロロフィル代謝関連酵素 Red Chlorophyll Catabolite Reductase の結晶構造、第9回日本蛋白質科学会年会、2009年5月20日、熊本
- ㉔ 杉島正一、以下4名、クロロフィル代謝関連酵素 Red Chlorophyll Catabolite Reductase の立体構造、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
- ㉕ 岩崎浩之、大村昇、杉島正一、以下4名、等温滴定カロリメトリーによるラットヘムオキシゲナーゼ-1 の基質結合における誘導適合モデルの検討、平成21年度日本生化学会九州支部例会、2009年5月16日、福岡
- ㉖ 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、日本化学会第89春季年会、2009年3月29日、船橋
- ㉗ 佐藤秀明、東元祐一郎、坂本寛、杉島正一、以下3名、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
- ㉘ 東元祐一郎、杉島正一、以下5名、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
- ㉙ 杉島正一、以下7名、ラット由来ベルドヘム-ヘムオキシゲナーゼ-1 複合体の結晶構造、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
- ㉚ Hagiwara Y., Sugishima M., 以下7名, Snapshots in the reaction pathway of bilin reductase PcyA, XXI congress of the International Union of Crystallography (IUCr2008), 2008年8月28, 29日、吹田
- ㉛ 萩原義徳、杉島正一、以下7名、ビリベルジン還元酵素 PcyA の反応経路における段階別スナップショット、第8回日本蛋白質科学会年会、2008年6月11日、東京
- ㉜ 東元祐一郎、杉島正一、以下5名、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

[その他]

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉島 正一 (SUGISHIMA MASAKAZU)  
 久留米大学・医学部・講師  
 研究者番号：30379292