

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21350087

研究課題名（和文） ヘムオキシゲナーゼの反応機構

研究課題名（英文） Reaction Mechanism of Heme Oxygenase

研究代表者

齋藤 正男（Masao Ikeda-Saito）

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：70302239

研究成果の概要（和文）：ヘム分解酵素の反応において最も重要なポルフィリン環開裂反応を詳細に検討した。分光測定により鉄4価錯体を開裂中間体として同定し、中間体-酵素複合体の結晶構造解析および理論計算の結果も合わせて長年の謎であった開裂機構を解明した。また、独自に発見した開裂反応の機構を解明し、新反応は動物細胞中でも進行しうることを示した。以上の結果により、ヘム分解反応の化学的理解が深まり、生理的に重要な知見も得られた。

研究成果の概要（英文）：Enzymatic heme degradation by heme oxygenase, especially its rate-limiting ring opening step, have been studied in detail. Spectroscopic analysis reveals the formation of a ferryl species as a ring opening intermediate. Crystallographic study on an intermediate-enzyme complex combined with theoretical calculations finally elucidate the rate-limiting reaction. We also examined a novel heme cleavage reaction to clarify its mechanism and the new heme catabolites were successfully detected from cultured mammalian cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：生物無機化学

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・酸素活性化・結晶構造解析・ベルドヘム・反応機構・構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

ヘムオキシゲナーゼ（HO）は、3段階の酸素添加反応によってヘム（鉄-ポルフィリン錯体）を鉄イオン・一酸化炭素（CO）・ビリベルジンに分解する酵素である。従来 HO は高等動物のヘム代謝を担うとされてきたが、最近の研究から CO やビリベルジンが細胞内シグナリングや抗酸化作用を持ち、血圧調整・神経細胞保護・細胞死などに深く関与す

る事が示された。また、植物や細菌などにも HO の存在が明らかになり、特に病原性細菌（大腸菌 O157、ジフテリア菌など）では宿主ヘムからの鉄イオン獲得に重要であり、毒性の発現とも密接に関連していることが示された。

HO 反応は生理的に重要なだけでなく、その極めて特異な反応機構にも興味を持たれている。ヘム分解に必要な酸素活性化は基質

であるヘム自身が行っており、14にも及ぶ反応中間体を経て反応が進行する。この酵素学的・生理学的に重要な反応は多くの研究グループによって精力的に研究され、ヘムからベルドヘム中間体までの変換過程についてはほぼ解明されていた。しかし、ヘム分解の主な律速段階に当たるベルドヘムの開環機構には不明な点が多く、HO 反応の完全な理解を妨げていた。最近になって、我々の反応解析によってようやくその概要のみが明らかとなったが、酵素構造や開環中間体の構造は想像の域を出ておらず、解明にはほど遠いものであった。

さらに最近我々は生理的に可能な条件下で、HO が従来とは異なる様式でベルドヘムを開環させる新たな反応（新 HO 反応）を発見した。その反応機構解明の重要性は言を俟たないが、その生理的意義を考える上では、細胞内でも同様の新反応が起こりえるかも重要となる。また近年になって、HO とは異なるファミリーに属するヘム分解酵素群（IsdG 型、HutZ 型）が細菌から相次いで発見された。これらの酵素群は次世代抗生物質の有望なターゲットであるが、その反応メカニズムや生成物に関する情報はほとんど得られておらず、HO 型酵素との類似点・相違点も明らかでなかった。

2. 研究の目的

本研究は、種々のヘム分解酵素の反応および構造を、各種分光学的手法・タンパク質工学・X線結晶構造解析・酵素反応解析などを駆使して解明することを目的とする。(1) 古典的 HO 反応については反応機構の完全解明を目指し、主にベルドヘム開環機構について検討する。(2) 新 HO 反応については機構解明とともに、生体内からの新規生成物検出を行い、生体内での進行の証明を試みる。さらに(3) IsdG 型酵素の構造と反応解明にも取り組む。これらの情報に基づいて生物のヘム分解戦略の全体像を明らかにし、ヘム分解が関与する既知の生理現象の理解や未知反応の発見に努める。また薬剤開発などへの応用も視野に入れた知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) HO によるベルドヘム開環機構については、ベルドヘム-HO 複合体を嫌気条件下で結晶化し、原子レベルでの構造を決定する。さらにこの構造に基づいた理論計算を行うことで、提案している反応機構の妥当性を検証する。さらに、開環中間体の構造をメスバウアー分光法などで検討し、その同定を行うことで、完全な機構解明を目指す。

(2) 新 HO 反応については各種反応解析と分光測定を組み合わせて検討し、その反応機構・化学量論などを解明する。また、動物の

培養細胞中のヘム代謝物を分析する手法を開発し、新規生成物の検出によって新 HO 反応が生体内でも進行することを証明する。

(3) IsdG 型酵素に関しては、結核菌由来の MhuD を使い、その溶液構造を共鳴ラマンや EPR などの分光測定で検討する。また、反応の基本特性を明らかにし、特に生成物の構造決定を質量分析・NMR などを駆使して試みる。

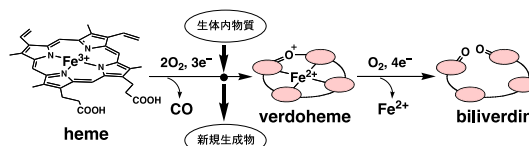


図1 HO 反応機構と新規ヘム代謝反応

4. 研究成果

(1) 嫌気グローブボックス中で高純度のベルドヘム-HO 複合体を調製し、その結晶化を行った。X線構造解析の結果、Fe(II)-ベルドヘム複合体は 1.95Å 分解能で、N₃⁻結合型は 1.70Å 分解能で構造決定することに成功した(図2)。これらの結晶構造ではベルドヘム鉄に水分子または N₃⁻分子が結合しており、活性中心の水クラスターと水素結合ネットワークを形成していた。このような構造は水クラスターの重要性を指摘した我々の提案

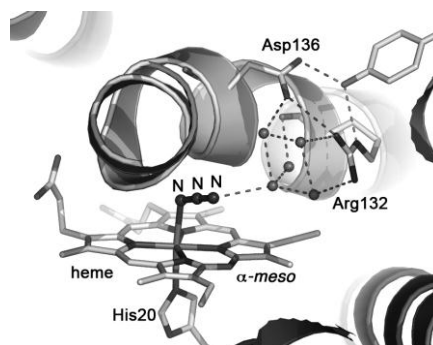


図2 アザイド結合型ベルドヘム-HO 複合体の結晶構造

メカニズムと合致する。なお、他の研究グループから報告されていたベルドヘム-HO 複合体構造では鉄配位子や水クラスターの構造が異なっていたが、これらは結晶化過程などでベルドヘムが分解していたためであることも明らかにした。

次に、得られた結晶構造に基づいて理論計算を行い、提案メカニズムを検証した。その結果、FeOOH-ベルドヘムを鍵中間体とする提案メカニズムはエネルギー的にも妥当であることが示され、活性中心の水クラスターがポルフィリン環への酸素添加・開環反応に重要であることが示された。また、観測可能な中間体として、鉄4価錯体の生成が予測され

た。

従来の研究から、ベルドヘム複合体と過酸化水素の反応において開環中間体が生成することを見いだしていた。この中間体についてメスバウアー分光法による同定を試みた。⁵⁷Fe でラベル化したベルドヘムを合成し、複合体調製の後、過酸化水素との反応を行った。嫌気状態で反応液迅速凍結システムも構築することで、経時的なメスバウアー分光法変化の測定に成功した(図3)。この結果、過酸化水素により生成する中間体は短寿命の鉄4価錯体であることが確実に示された。

以上の結果は、我々が従来から提案してきた反応機構を強く支持しており、長年の謎であったポルフィリン環開裂機構の解明に成功した。

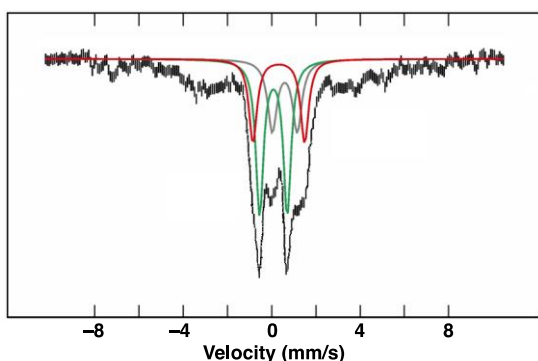


図3 ベルドヘム開環中間体のメスバウアー分光法

(2) 新 HO 反応については本研究以前にその概要を検討しており、生成物の割合が酸素濃度に応じて変化することを見いだしていた。そこで、酸素の有無における反応を詳細に検討した結果、閉環型と開環型中間体が平衡にあり、酸素がその平衡に影響を与えていると考えられた。

さらに動物細胞からの新規生成物の検出に成功した。新規生成物はビリルビン(通常のヘム代謝産物)と同様、細胞から培地中に排出されていた。培地からヘム代謝物を固相抽出し、HPLCなどで分析したところ、新規生成物の産生が明確に確認された。新規生成物の生成量は低酸素状態で増加する傾向にあり、精製酵素系での結果と一致した。これらの結果は新 HO 反応が生体内でも進行していることを示すと同時に、その生体内挙動は精製酵素系での知見に基づいて予見可能なことを示唆している。今後、その特性を詳細に検討することにより、新反応が持つ生理的意義を明らかにできると期待される。

(3) MhuD は活性中心に2分子のヘムを結合できる点で、他の IsdG 型酵素とは異なる。diheme-MhuD 複合体の結晶構造は報告されているが、ヘム分解活性は monoheme-MhuD

複合体のみに見られた。monoheme 複合体の溶液構造を明らかにするために共鳴ラマン分光法を測定したところ、His 配位のヘムに特徴的なシグナルが得られた。NO 結合型ヘムの EPR スペクトルは窒素性配位子の存在を直接的に示しており、最終的に変異実験によって軸配位子を His75 と同定した。

MhuD (結核菌由来 IsdG 型酵素) によるヘム分解反応を検討したところ、ビリベルジン(HO 生成物)やスタフィロピリン(IsdG 生成物)とは異なる新規生成物が得られた(図4)。精密質量を測定した結果、MhuD 生成物の組成式は $C_{34}H_{32}N_4O_7$ と予想され、驚くべきことに、MhuD ではヘム分解に伴う CO 放出が無いと示唆された。実際、MhuD 反応では CO は全く発生しておらず、MhuD のヘム分解機構が HO とは全く異なることが明らかとなった。今後、MhuD 生成物の構造を決定し、この特異なメカニズムを明らかにすることで、結核菌に特異的なヘム分解戦略の解明が期待される。このような機構・構造の違いは抗生物質の良いターゲットになると考えられ、今後の薬剤開発などにも期待される。

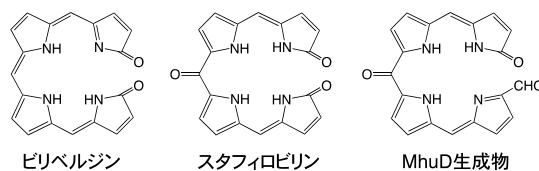


図4 ヘム分解生成物の骨格構造

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 M. Watanabe-Matsui, A. Muto, T. Matsui, A. Itoh-Nakadai, O. Nakajima, K. Murayama, M. Yamamoto, M. Ikeda-Saito, K. Igarashi, Heme regulates B-cell differentiation, antibody class switch, and heme oxygenase-1 expression in B cell as a ligand of Bach2. *Blood* (2011), 117, 5438-5448、査読有り
- ② 海野昌喜, 松井敏高, 齋藤正男, 金属タンパク質の X 線結晶構造解析: ヘム分解酵素の反応中間体. *日本結晶学会誌* (2011), 53, 213-218、査読有り
- ③ 松井敏高, ヘム分解における酸素活性化: 活性酸素の有効利用. *生物物理* (2011), 51, 132-133、査読有り
- ④ T. Matsui, M. Unno, M. Ikeda-Saito, Heme oxygenase reveals its strategy for catalyzing three successive oxygenation reactions. *Acc. Chem. Res.* (2010), 43, 240-247、査読有り
- ⑤ 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. *Inorg. Chem.* (2010), 49, 3602-3609、査読有り
- ⑥ Z. Du, M. Unno, T. Matsui, M. Ikeda-Saito, G. N. La Mar, Solution ¹H NMR characterization of substrate-free *C. diphtheriae* heme oxygenase: Pertinence for determining magnetic axes in paramagnetic substrate complexes. *J. Inorg. Biochem.* (2010), 104, 1063-1070、査読有り
- ⑦ W. Lai, H. Chen, T. Matsui, K. Omori, M. Unno, M. Ikeda-Saito, S. Shaik, Enzymatic ring-opening mechanism of verdoheme by the heme oxygenase: A combined X-ray crystallography and QM/MM study. *J. Am. Chem. Soc.* (2010), 132, 12960-12970、査読有り
- ⑧ Y. Ito, S. Nakagawa, A. Komagata, M. Ikeda-Saito, Y. Shiro, H. Nakamura, Heme-dependent autophosphorylation of a heme sensor kinase, ChrS, from *Corynebacterium diphtheriae* reconstituted in proteoliposomes. *FEBS Lett.* (2009), 583, 2244-2248、査読有り
- [学会発表] (計 19 件)
- ① T. Matsui, M. Ikeda-Saito, *Ring-opening mechanism of verdoheme by heme oxygenase*, ICBC 15, Canada, Vancouver (2011.8.7)
- ② M. Ikeda-Saito, M. Unno, T. Matsui, *Heme oxygenase catalytic mechanism*, 15th International conference on biological inorganic chemistry, Canada, Vancouver (2011.8.7)
- ③ M. Ikeda-Saito, T. Matsui, M. Unno, *Heme oxygenase catalytic mechanism*, International symposium on activation of dioxygen and homogeneous catalyst, Japan, Nago (2011.7.3)
- ④ M. Ikeda-Saito, T. Matsui, M. Unno, *Heme oxygenase catalytic mechanism*, Pacificchem 2010, U. S. A., Honolulu (2010.12.20)
- ⑤ T. Matsui, M. Ikeda-Saito, *Ring-opening mechanism of verdoheme catalyzed by heme oxygenase*, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, USA, Honolulu (2010.12.18)
- ⑥ 松井敏高, 海野昌喜, 齋藤正男, ヘム分解酵素によるベルドヘム開環メカニズム, 第 4 3 回酸化反応討論会, 東京 (2010.11.13)
- ⑦ T. Matsui, M. Unno, M. Ikeda-Saito, *Ring opening mechanism of verdoheme catalyzed by heme oxygenase*, 第 4 8 回日本生物物理学会年会, 仙台 (2010.9.20)
- ⑧ M. Ikeda-Saito, T. Matsui, M. Unno, *Catalytic mechanism of heme oxygenase, a central enzyme for heme catabolism*, 1st Asian chemical biology conference, Korea, Seoul (2010.6.25)
- ⑨ 松井敏高, 海野昌喜, 齋藤正男, ヘムオキシゲナーゼによるベルドヘム開環反応, 第 37 回 生体分子科学討論会, 山口 (2010.6.19)
- ⑩ 海野昌喜, 篠原正将, 高山昂一郎, 渡邊朋子, 田中秀治, 酒井隆一, 佐々木誠, 齋藤正男, 構造を基にしたグルタミン酸受容体 *GluR5, GluR6* 選択的化合物の設計, 2009 年日本結晶学会年会, (2009.12.5) 兵庫県西宮市
- ⑪ 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 4 2 回酸化反応討論会, 仙台 (2009.11.14)
- ⑫ 海野昌喜, 篠原正将, 高山昂一郎, 渡邊朋子, 田中秀治, 酒井隆一, 佐々木誠, 齋藤正男, 構造を基にしたグルタミン酸受容体 *GluR5* 選択的化合物の設計, 日本化学会関東支部茨城地区研究交流会, 日立 (2009.11.6)
- ⑬ 海野昌喜, 篠原正将, 高山昂一郎, 渡邊朋子, 田中秀治, 酒井隆一, 佐々木誠, 齋藤正男, 構造を基にしたグルタミン酸受容体 *GluR5* 選択的化合物の設計, 第 8 2 回日本生化学会大会 (2009.10.22) 兵庫県西宮市
- ⑭ M. Ikeda-Saito, *Structure of heme oxygenase catalytic intermediates*, 42nd IUPAC Congress, United Kingdom, Glasgow (2009.8.2)
- ⑮ 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, Japan, Takayama (2009.8.1)
- ⑯ M. Unno, T. Matsui, M. Ikeda-Saito, *Structure and catalytic mechanism of heme oxygenase*, 14th International conference on biological inorganic chemistry, Japan, Nagoya (2009.7.30)
- ⑰ M. Ikeda-Saito, T. Matsui, M. Unno, *Structural biological inorganic chemistry of heme oxygenase catalysis*, 14th International conference on biological inorganic chemistry, Japan, Nagoya (2009.7.30)
- ⑱ 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, Japan, Nagoya (2009.7.25)

- ⑱ M. Ikeda-Saito, *Structural insights into heme oxygenase catalysis*, 34th Federation of european biochemical societies congress, Czech Republic, Prague (2009.7.8)

センター・准教授
研究者番号：10359549

〔図書〕（計1件）

- ① M. Unno, M. Ikeda-Saito, *Nanohybridization of Organic-Inorganic Materials*, Springer (2009) 193-217.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 正男 (Masao Ikeda-Saito)
東北大学・多元物質科学研究所・教授
研究者番号：70302239

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

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

海野 昌喜 (Masaki Unno)
茨城大学・フロンティア応用原子科学研究