

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 4月23日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770141

研究課題名（和文）ヘム無毒化酵素の反応機構解明

研究課題名（英文）Reaction Mechanism of Heme Detoxification Enzyme

研究代表者

石川 春人 (ISHIKAWA HARUTO)

大阪大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：40551338

研究成果の概要（和文）：タンパク質から遊離したヘムの毒性を結晶形成により無毒化するタンパク質、Heme Detoxification Protein (HDP)に着目し、ヘムの結晶であるヘモゾイン(Hz)形成反応機構の解明を目指して研究を行った。様々な分光学的解析を行うために、再構成タンパク質として発現・精製の検討を行い、活性を保持したHDPを高純度で大量に調製することに成功した。電子スピン共鳴や共鳴ラマン分光測定の結果から、HDPの活性中心にはヒスチジン残基が存在することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Free heme is a pro-oxidant and catalyzes the production of reactive oxygen species that is toxic to cells. Heme detoxification protein (HDP), potent in converting heme into an insoluble crystalline form called hemozoin (Hz), was found in the malaria parasite. We succeeded in the high-yield expression of recombinant HDP in *E.coli*. ESR and resonance Raman measurements for the HDP-heme complex revealed that a histidine residue binds heme.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：酵素の触媒機構、ヘム

1. 研究開始当初の背景

ヘム無毒化酵素の反応機構研究において最も重要な点は、この反応がエイズ・結核と並ぶ世界三大感染症の一つであるマラリアと強く関連していることである。マラリア原虫は感染後赤血球内で増殖するが、その際に赤血球の主要成分であるヘムタンパク質・ヘモグロビンを栄養分として利用している。タンパク質部分の「食べ残し」となるヘムはマ

ラリア原虫に対して毒性を持つため、マラリア原虫は体内に蓄積したヘムを結晶化することで効率的に無毒化を行っている。哺乳類の場合、細胞内における過剰のヘムはヘムオキシゲナーゼと呼ばれる酵素によって速やかに分解され無毒化が行われるのに対し、マラリア原虫はヘムオキシゲナーゼによる分解ではなく結晶化を利用した無毒化機構を採用している。マラリア治療薬のいくつかは、

ヘム結晶化を阻害することでマラリア原虫の増殖を抑えており、ヘム結晶化の分子機構解明は効果的なマラリア治療薬の開発に繋がると考え、研究を開始した。

2. 研究の目的

マラリア原虫がヘモゾイン (Hz) と呼ばれるヘムの結晶を形成することは 1900 年代初頭に報告されているが、Hz 形成の反応機構の詳細は未だ明らかとなっていない。本研究では新たにマラリア原虫から発見されたヘム結晶化を触媒するタンパク質 HDP (Heme Detoxification Protein) を研究対象として、生化学・タンパク質科学・構造生物学などの手法を駆使することで HDP がヘム結晶化を触媒する機構を分子レベルで解明することを目指した。

これまでの研究で HDP はタンパク質内部に複数個のヘムを結合し、内部で Hz 形成を触媒していることが予想されているが、その詳細は不明である。本研究では分光学的な手法を活用し、HDP のヘム結合部位および反応機構の解明に取り組んだ。

HDP は発見されたばかりのタンパク質であり、研究開始当初は純度の高い試料を大量に調製する手法も確立されていなかった。様々な分光学的手法を利用するには、HDP 試料の大量調製は必須であったため、大腸菌を用いて HDP を再構成タンパク質として調製する手法の開発を第一の目標として研究を進めた。新たな手法により調製した HDP がヘム結晶化活性を持つことを確認した後、各種分光法と部位特異的アミノ酸置換を組み合わせることで、反応の初期段階でヘムが結合するアミノ酸を同定し、反応機構の端緒を得ることを目指した。また、タンパク質の立体構造はその反応機構を理解する上で非常に重要であるため、HDP の結晶化についても検討を行った。

物質の結晶化は立体構造決定や創薬の分野において非常に重要であるが、その詳細な機構は不明な点が多い。本研究で対象とした HDP は小分子を結晶化する非常に珍しい酵素であり、物質の結晶化機構を理解する助けとなることが期待される。また、HDP が結晶化するヘムは可視領域に吸収帯を持つだけでなく、プロピオン酸基やビニル基など特徴的な構造を持っており、物質の結晶化機構を分光学的に捉えるのに非常に適した基質である。そのため HDP によるヘムの結晶化機構の解明は、マラリア原虫内部における解毒機構としてのみでなく様々な物質の結晶化の反応機構解明に繋がるものと考え、研究を推進した。

3. 研究の方法

(1) HDP 発現・精製系の構築

ヘム結晶化の活性を持つことが報告されている *Plasmodium falciparum* 種の HDP の cDNA は DNA 合成により調製済みであり、大腸菌発現用のプラスミドベクターに組み込んだ状態から研究をスタートした。立体構造の解明を行うには大量に純度の高い再構成タンパク質を得る必要があるため、大腸菌の菌種や発現ベクターのプロモーターおよび発現用のタグなど、発現・精製の最適条件の検討を行うことで、早期に発現系の最適化を行うことを目標とした。

(2) 分光法を利用したヘム結合様式の検討

一般的なヘムタンパク質の場合、分光学的に優れたプローブであるヘムを有効に利用することで活性部位近傍の構造情報を得ることが可能である。しかし、HDP においてヘムは活性中心であると共に基質でもある。つまり HDP はヘムを結合すると同時に結晶化の反応がスタートしてしまい、最終的にはヘムは HDP から解離してしまう。ヘムの結合様式を解明するためには結晶化反応が進行しない状態を作り出す必要があった。そこで、ヘム結晶化が酸性条件下であるマラリア原虫の食胞内においてのみ効率的に進行することに着目し、アルカリ条件下での分光測定を試みた。具体的な分光法としては紫外可視吸収測定、共鳴ラマン測定、電子スピン共鳴測定を行った。

(3) 部位特異的アミノ酸置換による活性部位の同定

各種分光法を利用することで、ヘム鉄に結合しているアミノ酸残基の種類を決定可能であると期待される。しかし、アミノ酸残基の種類だけでなく、具体的なアミノ酸残基番号を同定することは、今後のヘム結晶化における反応機構を考える上で非常に重要であると考えられた。そこで、アミノ酸残基の種類を同定した後、遺伝子工学的手法を用いることで、そのアミノ酸残基をヘム鉄に結合不可能な種類のアミノ酸残基に置換した。この変異体のヘム結合様式およびヘム結晶化活性を検討することにより、ヘム結晶化反応における活性中心に存在するアミノ酸残基番号の同定を目指した。

(4) ヘム結晶化反応の検討

現在予想している HDP によるヘム結晶化はタンパク質内部に少なくとも2つのヘムが二量体形成に適した位置に結合し、互いのプロピオン酸基がヘム鉄に配位することで効率的な結晶化を触媒する機構である。この場合、ヘム鉄の配位環境は水溶液中の遊離の状態から一度 HDP 内部のアミノ酸残基に結合し、その後プロピオン酸基に置き換わることが予測される。ヘム鉄の配位環境は各種分光

法に特徴的なスペクトルを与えるため、経時変化を観測することで詳細な結晶化の反応機構を検討することが可能であると期待される。本研究期間内では基礎データとして用いるための FT-IR および共鳴ラマン測定を検討し、ヘムの結晶生成過程を分光学的にとらえることが可能であることが示唆される結果を得た。

(5) HDP の立体構造決定

HDP 全体構造の決定はヘム結晶化機構の解明において重要であることはもちろん、抗マラリア薬の開発にも大切である。本研究では、再構成 HDP の大量調製に成功した後、タンパク質全体構造の決定に向けたエクソ線結晶構造解析に関しても取り組んだ。

4. 研究成果

(1) HDP 発現・精製系の構築

大腸菌での大量発現系構築を目指し、様々な種類の発現ベクター、融合タンパク質、宿主の組み合わせについて検討を行った。具体的には pET ベクター、pGEX ベクター、pMAL ベクター、pCold ベクターなどに HDP の遺伝子を組み込むことで、GST や MBP など発現を促すタンパク質を融合すること、また pCold ベクターを利用することで低温での発現誘導を行い可溶性を向上させることなどを試みた。

当初は可溶性タンパク質として大腸菌から取り出すことを目標として検討を続けたが、融合タンパク質の種類や発現条件、宿主などを工夫しても大部分の HDP は不溶性タンパク質である封入体として得られた。検討を行った融合タンパク質の中では MBP 融合 HDP のみ、わずかに可溶性タンパク質を得ることができた。この MBP 融合 HDP はヘム結晶化の活性が存在したが、分光学的な検討を行うには発現量が不十分であったため、可溶性タンパク質として HDP を得る系については検討を中止した。

封入体として得られた HDP タンパク質を適切な条件で可溶化し再構成すると、ヘム結晶化の活性を持つことが明らかとなった。過去の報告では HDP 精製のためにヒスチジンタグを融合していたが、ヒスチジンタグはヘムを結合する可能性が報告されており、未知のヘム結合タンパク質における機能解明には不適切であると考え、融合タグを持たない HDP の精製系確立を目指した。精製方法の検討の結果、非常に高純度の HDP タンパク質を大腸菌から得ることが可能となったため、大腸菌から再構成した融合タグを持たない HDP を利用して各種分光法による測定を推進した。

(2) 分光法を利用したヘム結合様式の検討

大腸菌から精製した HDP タンパク質はヘム結晶化活性を持っているため、ヘム結合様式を検討するために HDP とヘムを混合した場合、速やかに結晶生成反応が進行してしまい、HDP 内部の結合部位を検討することが出来ない。そこで、ヘム結晶化活性が酸性条件下でのみ進行する pH 依存的反応であることを利用した。アルカリ性および中性条件下では HDP はヘムを安定に結合し、ヘムタンパク質に特徴的な電子吸収スペクトルを示した。この結果は HDP 内部にヘムの中心に存在する鉄と結合するアミノ酸残基が存在していることを示唆している。

ヘム結晶化の反応はヘム中心の鉄原子が 3 価の場合に進行することが明らかとなっているが、鉄に結合しているアミノ酸残基を同定するために、鉄を 2 価に還元しさらに一酸化炭素を外部配位子として導入した。その結果、HPD と 2 価鉄を持つヘム複合体の電子吸収スペクトルは、ヘム鉄にヒスチジン残基が結合している場合に特徴的なものであった。

さらに HDP 内部に存在するアミノ酸残基を検討するために、HDP とヘム複合体の電子スピン共鳴測定を行った。電子スピン共鳴スペクトルではヘム中心の 3 価の鉄に配位したアミノ酸残基の種類により g 値が大きく変化する。HDP とヘム複合体の電子スピン共鳴スペクトルはヒスチジン残基が結合しているヘモグロビンなどに類似しており、電子吸収スペクトルの結果を支持するものとなった。また、タンパク質に結合していないヘムの電子スピン共鳴スペクトルについても測定を行い、HDP とヘム複合体とは全く異なることも確認した。以上の結果より、HDP 内部のヘム結合アミノ酸残基はヒスチジン残基であると決定した。

(3) 部位特異的アミノ酸置換による活性部位の同定

HDP 内部にはヒスチジン残基が 9 個存在している。ヘム鉄に結合しているヒスチジン残基を同定するために、ヒスチジン残基をヘム鉄に結合不可能なアラニン残基に置換した変異体をそれぞれ作成した。ヘム鉄に結合しているヒスチジン残基がアラニン残基に置換された場合、電子吸収スペクトルやヘム結晶化活性に変化が生じることが期待される。現在、順次変異体を作成し、それぞれの電子吸収スペクトルおよびヘム結晶化活性について検討を行っている。

(4) ヘム結晶化反応の検討

まず、再構成 HDP によって形成されるヘムの結晶が過去に報告されているヘムの結晶(Hz)と同じ構造であるかを検討した。結晶ではないヘムの沈殿物がアルカリ性の緩衝

溶液に再溶解することを利用して、結晶物と沈殿物を分離した。さらに再構成 HDP から得られたヘム結晶の FT-IR 測定を行ったところ、Hz に特徴的な吸収が観測された。また結晶を形成していないヘムに特徴的な吸収帯に関しては消失していることも明らかとなった。これらの結果は大腸菌から精製した融合タグを持たない HDP がヘム結晶化活性を保持していることを示している。また再構成 HDP の活性能を検討したところ、天然 HDP に匹敵する活性を保持していることも明らかとなり、大腸菌から大量の HDP を得ることに成功した。今後は共鳴ラマン分光法などを応用して、反応機構の詳細を検討する予定である。

(5) HDP の立体構造決定

HDP においてヘムは活性中心であると同時に基質でもある。そのため、HDP にヘムが結合した状態の全体構造決定は困難が予想される。しかし、反応機構の解明および抗マラリア薬の創製などにおいて、HDP の立体構造は非常に重要であるため、HDP とヘムの複合体だけでなく、HDP のみについてもタンパク質結晶化を試みた。現在、ヘムをもたない HDP に関しては、タンパク質の微結晶と考えられるものが観測されており、今後もさらに結晶化条件の検討を計画している。

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 2 件)

- ① Kenta Yamada, Haruto Ishikawa, Yasuhisa Mizutani, Protein dynamics of isolated chains of recombinant human hemoglobin elucidated by time-resolved resonance Raman spectroscopy, Journal of Physical Chemistry B, Vol. 116, 2012, 1992-1998, 査読有
- ② Haruto Ishikawa, Megumi Nakagaki, Ai Bamba, Takeshi Uchida, Hiroshi Hori, Mark R. O'Brian, Kazuhiro Iwai, Koichiro Ishimori, Unusual heme binding in the bacterial iron response regulator protein: spectral characterization of heme binding to the heme binding motif, Biochemistry, Vol. 50, 2011, 1016-1022, 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① Haruto Ishikawa, Keisuke Nakatani, Shigetoshi Aono, Yasuhisa Mizutani, Molecular mechanism of heme detoxification in malaria-causing parasite, Gordon research conference: Metals in biology, 2012.1.23, Four points sheraton, California, USA

②中谷 圭佑、石川 春人、青野 重利、水谷 泰久、ヘモゾイン形成過程における Heme Detoxification Protein とヘムの相互作用、第 38 回生体分子科学討論会、2011.6.24、筑波大学大学会館

③ Haruto Ishikawa, Keisuke Nakatani, Shigetoshi Aono, Yasuhisa Mizutani, Molecular mechanism of heme detoxification in malaria-causing parasite, 11th HFSP Awardees meeting, 2011.6.6, McGill University, Montreal, Canada

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/mizutani/index-jp.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 春人 (ISHIKAWA HARUTO)
大阪大学・大学院理学研究科・講師
研究者番号：40551338