

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24350081

研究課題名(和文)ヘムオキゲナーゼ研究の集大成

研究課題名(英文)Compilation of heme oxygenase catalysis

## 研究代表者

齋藤 正男 (Ikeda-Saito, Masao)

東北大学・多元物質科学研究所・名誉教授

研究者番号：70302239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヘム分解酵素の反応において重要なヘム取り込み及び生成物放出過程を詳細に検討した。X線結晶解析と分子動力学計算を組み合わせ、ヘム取り込み及び鉄・生成物ビリベルジン放出に伴う構造変化の解明に成功した。また、結核菌及び黄色ブドウ球菌ヘム分解酵素(MhuD及びIsdG)の反応生成物を決定し、これらのヘム分解酵素はCO放出を伴わずに新規分解反応でヘムを新規分解物に変換しその過程で病原性細菌が必要とする鉄を遊離することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Heme oxygenase (HO) converts heme into biliverdin, CO, and iron by three step monooxygenation reactions. Crystal structures of the heme-free, iron-biliverdin and biliverdin complexes have been solved, and the HO protein structural changes associated with the heme-binding and biliverdin-release have been determined by the molecular dynamic simulations. In addition, the final reaction products of a new type heme degradation enzyme, MhuD of *M. tuberculosis* and its homologue IsdG of *S. aureus*, have been established. We have found that that these enzyme degrade heme without CO release, demonstrating a new way to degrade heme.

研究分野：生物無機化学

キーワード：ヘム 酸素活性化 結晶構造解析 反応機構 共鳴ラマン散乱 EPR 分子動力学

### 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 は高等動物のヘムを代謝し鉄恒常性を担うと考えられていたが、近年 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ている。また病原性細菌 (大腸菌 O157、ジフテリア菌など) にも HO の存在が明らかとなり宿主ヘムから鉄イオン獲得に重要な役割を果たし、更には毒性の発現にも関連していることが示されている。

HO は生理的に重要なだけでなく、その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。この生物化学的・生理学的に重要な反応は申請者を含む多くの研究者によって精力的に研究され、ヘムからビリベルジンに至る変換過程についてはほぼ解明されていた。しかし、ヘムの取り込みやビリベルジンや鉄の遊離機構には不明な点が多かった。

近年、黄色ブドウ球菌や結核菌において、HO とは異なる構造を持つヘム分解酵素 (IsdG 及び MhuD) が相次いで報告されたが、ヘム分解産物の同定すら出来ておらず反応機構解明にはほど遠い状態であった。

### 2. 研究の目的

本研究は、各種分光学的・タンパク質工学・X線結晶構造解析・分子動力学計算・酵素反応解析などを駆使して、種々のヘム分解酵素の反応および構造を解明することを目的とする。(1)HO 反応については反応機構の完全解明を目指し、主にヘム取り込み・鉄及びビリベルジン放出機構について検討する。さらに(2)IsdG 型酵素の構造と反応解明に取り組み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 によるヘム分解反応解析では、基質ヘムの結合していないヘム非結合型、 $Fe^{3+}$ -ビリベルジン結合型、ビリベルジン結合型反応中間体を結晶化し、原子レベルで構造を決定する。さらにこれらの結晶構造に基づいて分子動力学計算を行い、ヘム結合及びビリベルジン遊離反応機構を決定する。

(2)IsdG 型酵素に関しては、結核菌由来の MhuD 黄色ブドウ球菌由来の IsdG 及び IsdI を用い、その溶液構造を共鳴ラマンや EPR などの分光測定で決定することを目指す。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。

### 4. 研究成果

(1)HO へム分解反応におけるヘムの取り込み及びビリベルジン放出に関しては、ヘム非結合型、 $Fe^{3+}$ -ビリベルジン結合型、ビリベルジン結合型の結晶構造をそれぞれ 1.8 Å, 1.9 Å, 1.85 Å 分解能で決定した。ヘム非結合型の構造は概ねヘム結合型と同様であるがヘム鉄軸配位子である His20 を含むヘリックスが解けてループとなっていることが明らかとなった。分子動力学計算結果は結晶構造の妥当性を支持するのみならず、ヘム結合が引き起こすタンパク質構造変化の順序を予測することが出来た。

$Fe^{3+}$ -ビリベルジン結合型、ビリベルジン結合型の結晶構造はヘム結合型とほぼ同じ全体構造を保持していることが明らかとなった。更に既報のビリベルジン複合体結晶構造とは異なりビリベルジンはヘリカル構造を維持していた。更に還元剤の量を減らすことにより  $Fe^{3+}$ -ビリベルジン結合型から一部鉄が遊離した結晶構造も得る事が出来、軸配位子 His20 から  $Fe^{3+}$ が遊離して出来た空間に入り込んだ水分子が His20 ビリベルジンのピロール2つと水素結合を形成しビリベルジン複合体構造を安定化していることが明らかとなった。(1)の成果を報告した論文は JBC Papers of the Week に選ばれ高い評価を得た。(2)結核菌ヘム分解酵素 MhuD は活性中心

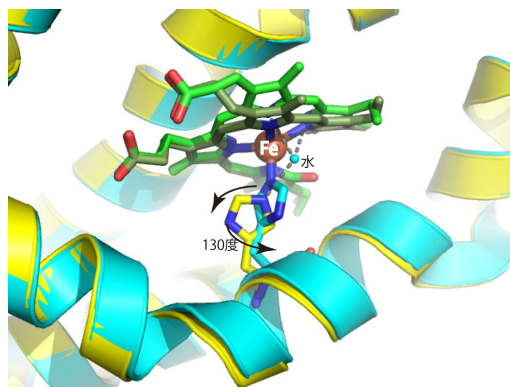


図1  $Fe^{3+}$ -ビリベルジン複合体(青緑色)とビリベルジン複合体(黄色)の構造。

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。ヘム分解活性のない di-heme-MhuD 複合体の結晶構造は報告されているが、活性のある mono-heme-MhuD 複合体の溶液構造を明らかにするために共鳴ラマンスペクトル及び NO 結合型ヘムの EPR スペクトル、変異体実験を行いヘム鉄の軸配位子を His75 と同定した。

MhuD ヘム分解反応生成物の精密質量分析と NMR により解析を行い、生成物はビリベルジン (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 (図4) であ

ることを決定しマイコピリンと命名した。マイコピリン反応は C1 炭素がアルデヒド基として残留し CO の遊離しない新規のヘム分解反応であることを明らかとなった。MhuD と類似構造を持つ IsdG はヘムをスタフィロピリン、鉄、CO に変換すると報告されているが、CO 遊離を検討した結果 CO ではなくアルデヒドが遊離することが判明した。HO とは異なり MhuD 及び IsdG ではヘムが大きく歪んでおり、それが反応性の違いの原因であると考えられている。MhuD 反応生成物を報告した論文は Best of JBC 2013 賞を獲得し非常に高い評価を得ており、*Acc. Chem. Res.* からの執筆招待や数多くの海外学会・研究会から招待講演依頼を受けてた。

今後、MhuD, IsdG の特異なヘム分解メカニズムを明らかにすることで、結核菌及び黄色ブドウ球菌に特異的なヘム分解戦略の解明が期待され、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。

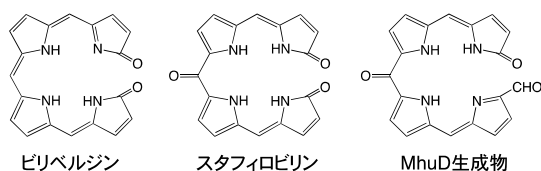


図2 ヘム分解生成物の骨格構造

## 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 7件) 全て査読あり

M. Watanabe-Matsui, T. Matsumoto, T. Matsui, M. Ikeda-Saito, M. Muto, K. Igarashi, and K. Murayama, Heme binds to an intrinsically disordered region of Bach2 and alters its conformation. *Arch. Biochem. Biophys.* (2014), 565, 25-31

A. Wilks and M. Ikeda-Saito, Heme utilization by pathogenic bacteria: Not all pathways lead to biliverdin. *Acc. Chem. Res.* (2014), 47, 2291-2298

M. Unno, A. Ardèvol, C. Rovira, and M. Ikeda-Saito, Structures of the substrate-free and the product-bound forms of HmuO, a heme oxygenase from *Corynebacterium diphtheriae*: X-ray crystallography and molecular dynamics investigation. *J. Biol. Chem.* (2013), 288, 34443-34458

T. Matsui, S. Nambu, Y. Ono, C. W. Goulding, K. Tsumoto, and M. Ikeda-Saito, Heme degradation by *Staphylococcus aureus* IsdG and IsdI liberates formaldehyde rather than carbon monoxide. *Biochemistry* (2013), 52, 3025-3027

S. Nambu, T. Matsui, C. W. Goulding, S. Takahashi, and M. Ikeda-Saito, A new way to degrade heme: The *Mycobacterium tuberculosis* enzyme MhuD catalyzes heme degradation without generating CO. *J. Biol. Chem.* (2013), 288, 10101-10109

T. Uchida, Y. Sekine, T. Matsui, M. Ikeda-Saito, and K. Ishimori, A heme degradation enzyme, HutZ, from *Vibrio cholera*. *Chem. Commun.* (2012) 48, 6741-6743

M. Unno, T. Matsui, and M. Ikeda-Saito, Crystallographic studies of heme oxygenase with an unstable reaction intermediate, verdoheme. *J. Inorg. Biochem.* (2012), 113, 102-109  
[学会発表](計 4件)

M. Ikeda-Saito, *Heme Degradation Mechanisms by Two distinctive heme degradation enzymes, heme oxygenase and IsdG-type enzymes, S. aureus IsdG and M. tuberculosis MhuD*. Key Note Lecture, The 8<sup>th</sup> International Conference on Heme Oxygenases, BioIron, and Oxidative Stress, Sydney, Australia (2014.10.8)

M. Ikeda-Saito, *Paradigm Shift in Heme Degradation: Heme Oxygenase and IsdG* Session Lecture, The 12<sup>th</sup> European Biological Inorganic Chemistry Conference, Zurich, Switzerland (2015.8.26)

M. Ikeda-Saito, *Two Distinct Heme Degradation Enzymes; The Heme Oxygenase and the IsdG-type Enzymes*, Keynote Lecture, Gordon Research Conference, Biology and Chemistry of Tetrapyrroles, New Port, RI, U. S. A. (2014. 7. 24)

M. Ikeda-Saito, *Two Distinct Heme Degradation Proteins, Heme Oxygenase and IsdG*, Session Lecture, The 8<sup>th</sup> International Conference on Oxygen-binding and Sensing Proteins, Sheffield, UK (2014. 7. 24)

[図書](計 0件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

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

(2)研究分担者 なし

(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・准教授  
研究者番号：90323120

海野 昌喜 (Masaki Unno)  
茨城大学・理工学研究科・教授  
研究者番号：10359549