

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770124

研究課題名(和文)結晶化触媒酵素の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of crystallization enzyme

研究代表者

石川 春人(Ishikawa, Haruto)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40551338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫内において、ヘムの毒性を結晶化により無毒化するタンパク質Heme Detoxification Protein (HDP) の活性中心の検討を行った。部位特異的アミノ酸変異と、ヘム結晶化アッセイ、さらに電子スピン共鳴や共鳴ラマン分光法を組み合わせ、ヘム結晶化に重要なヒスチジン残基を同定した。また、サシガメにおいて同様にヘムを結晶化する膜タンパク質 α -glucosidase (AGLU) を再構成タンパク質として大量調整することに成功した。AGLUに関する、電子スピン共鳴や共鳴ラマン分光法による検討を行い、ヒスチジン残基が活性中心に存在する事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：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 identification of the critical amino acid residues for the Hz formation by using the site-directed mutagenesis, ESR, and resonance Raman measurements. We also investigated that the active site residues in α -glucosidase (AGLU) in a blood-sucking bug. Spectroscopic characterization of the recombinant AGLU revealed that a histidine residue exists in the active site.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：金属タンパク質 ヘム 酵素 マラリア

1. 研究開始当初の背景

本研究で利用するヘムの結晶はヘモゾイン(Hz)と呼ばれ、マラリア原虫内で初めて発見されたものである。Hzはマラリア原虫の生育に強く関与していることが知られている。マラリア原虫は赤血球中で増殖する際にヘモグロビンを分解して栄養を得ているが、その際にヘモグロビンの活性中心であるヘムが大量に生成する。ヘムは生体内における様々な蛋白質の活性中心として働いているが、蛋白質から遊離した状態では自身の高い反応性によるラジカル産生が問題となる。哺乳類の場合、遊離したヘムはヘムオキシゲナーゼと呼ばれる酵素により速やかに代謝され解毒されるのに対し、マラリア原虫はヘムオキシゲナーゼを持たないため大量のヘムを結晶化することで無毒化している。Hz形成の阻害剤はマラリア治療薬として利用されており、本研究の結果は結晶生成機構の解明だけでなくマラリア治療薬の開発にも重要である。

研究対象とした酵素はヘムを結晶化するマラリア原虫由来の Heme Detoxification Protein (HDP)と吸血性のサシガメ由来のα-グルコシダーゼ(AGLU)である。これら二つの酵素は全く相同性を持たず、さらにHDPが可溶性蛋白質であるのに対しAGLUは膜蛋白質であるにもかかわらず両者ともヘムを結晶化することが知られていた。いずれも近年新たに発見された蛋白質であり立体構造や活性中心の構造などは明らかになっていない。HDPに関しては既に研究に取り組んでおり、結晶生成の初期段階においてヘムがHDPに結合することが明らかになっていった。本研究ではHDPによるヘム結晶化だけでなく、全く相同性を持たない2種類の酵素による反応機構を検討することで、蛋白質が触媒する結晶化分子機構解明を目指して研究を推進した。

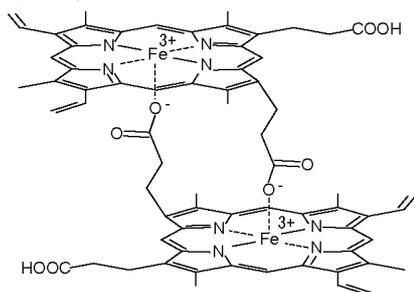


図1 Hzの基本骨格

2. 研究の目的

(1) HDPによるヘム結晶化機構の検討

ヘムの結晶であるHzはヘムの二量体を基本骨格を持った構造であることが既に報告されている(図1)。ヘムは側鎖に2つのプロピオン酸基を持っており、一方が二量体の相手側のヘム鉄に結合することで二量体を安定化し、もう一方は隣接する二量体と水素結合を形成することで結晶を形成している。Hz形成は酵素が存在しない場合、高温で数十時間の反応を必要とするが、HDP存在下では

数十分で速やかに反応が進行する。HDPは結晶核となるヘム二量体の形成を触媒していると予測しているが詳細は不明であり、各種分光法を利用して反応機構を検討した。

(2) 再構成AGLUの調整およびヘム結晶化機構の検討

AGLUのクローニングは既に終了しており、大腸菌による発現ベクターに組み込まれている状態から研究を開始した。発現系と精製について検討を行い、結晶化活性を持つ再構成蛋白質の調整を行った。その後は電子吸収スペクトル測定や共鳴ラマン測定などの分光学的手法を用いてAGLUによるヘム結晶化の分子機構について研究を推進した。

(3) HDPとAGLUの比較による結晶化酵素の反応機構検討

全く異なるアミノ酸配列を持つ二種類の酵素の反応機構を比較・検討することで結晶生成を分子レベルで解明することを目指した。特に両者の反応中間体のスペクトルを比較することで、HDPとAGLUが類似した反応機構を持っているかを明らかにすることを試みた。またポルフィリン誘導体や中心金属の置換を行った類似化合物の結晶化も試みることで様々な物質の結晶化に応用できるかの検討を目指した(図2)。

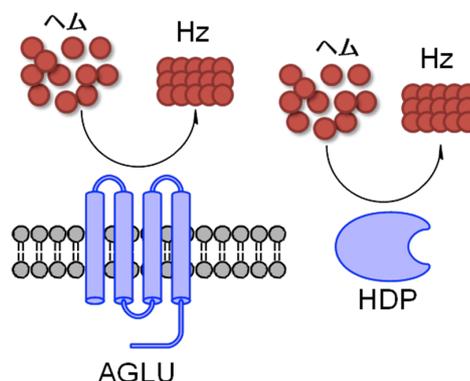


図2 HDPとAGLUによるヘムの結晶化

3. 研究の方法

(1) HDPによるヘム結晶化機構の検討

一般的なヘム蛋白質の場合、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開始してしまい、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る。そこでヘム結晶化が酸性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、中性・アルカリ性条件下での分光測定を試みた。これまでの研究で中性およびアルカリ性条件下では反応が進行せず、安定にヘムを結合する

ことが明らかになっており、紫外可視吸収測定、共鳴ラマン測定、電子スピン共鳴測定などを利用して活性部位近傍の構造を検討した。

(2) 再構成 AGLU の調整およびヘム結晶化機構の検討

AGLU のクローニングに成功した状態から大腸菌での発現を試みた。膜蛋白質であるため前述の HDP とは発現・精製手法が大きく異なることが予想された。単離した AGLU のヘム結晶化効率率は報告されておらず、再構成蛋白質の品質は AGLU が Hz 形成活性を持つことを利用して評価を行った。効率的な発現・精製手法を確立した後、HDP での実験で確立したヘム結晶化活性の測定を行った。

また AGLU に関しても HDP 同様に活性部位にはヘムに結合するアミノ酸残基が存在する可能性が高いと考えられたため、紫外可視吸収測定、共鳴ラマン測定、電子スピン共鳴測定などを利用して活性部位近傍の構造を検討した。アミノ酸残基の種類を決定した後、部位特異的アミノ酸置換と組み合わせることで活性部位のアミノ酸残基の同定を試みた。

(3) HDP と AGLU の比較による結晶化酵素の反応機構検討

これまでの研究から HDP、AGLU とともに Hz の基本骨格である 2 量体形成を触媒していると考えられた。そのため蛋白質内部に 2 つのヘムを結合する可能性が考えられるが詳細は明らかになっていなかった。各種分光法を組み合わせることで反応機構を検討するとともに必要に応じて部位特異的アミノ酸置換も利用することで分子レベルでの結晶化機構の解明を試みた。

4. 研究成果

(1) HDP によるヘム結晶化機構の検討

HDP はヘムの結晶化を触媒するために、タンパク質内部に複数のヘムを結合し、結晶核となるヘム 2 量体形成を触媒している可能性が予測されていた。そこでまず、HDP 1 分子に対してヘムが何等量結合するかを、紫外可視吸収スペクトル測定により検討した。その結果、HDP は 2 当量のヘムを結合する事が明らかとなった。

以前の我々の研究により、ヘムに配位している活性中心のアミノ酸残基はヒスチジンである事が推測されていたため、HDP 内部に存在する 9 個のヒスチジン残基をそれぞれヘムに結合不可能なアラニン残基に置換した変異体を作成した。また、9 個全てのヒスチジン残基をアラニン残基に置換した 9HA 変異体を作成した。

各変異体による Hz 形成活性を比較したところ、9HA 変異体では天然型の約半分の活性となった。この結果は、HDP による Hz 形成機構においてヒスチジン残基が重要な役割を

果たしている事を強く示唆している。また、個々のヒスチジン残基変異体では、His122Ala、His172Ala、His175Ala、His197Ala の 4 種類において同様に天然型の半分程度の活性を示した (図 3 A)。

そこで、これら各ヒスチジン残基の働きを検討するために、ヘム存在下における紫外可視吸収スペクトル測定を行った (図 3 B)。His122Ala、His172Ala、His175Ala 変異体では、紫外可視吸収スペクトルに顕著な変化が観測され、活性中心のアミノ酸残基である可能性が示唆された。一方で His197Ala では、大きなスペクトル変化は見られず、ヘム鉄ではなくヘムのプロピオン酸基などへの配位により、HDP へのヘム結合を安定化していることが推測された。

HDP はヘムを 2 当量結合するため、His122、His172、His175 の 3 つのヒスチジン残基のうち、2 つがヘム鉄にそれぞれ配位していると考えられる。今回研究に用いている HDP は熱帯熱マラリア原虫由来であるが、他のマラリア原虫にも HDP は存在しており、アミノ酸配列を比較したところ、His122 と His172 は高度に保存されている事が明らかとなった。それに対して、His175 はアスパラギン残基などに置き換わっている種も存在した。一般的に活性中心に存在する重要なアミノ酸残基は高度に保存されており、HDP では His122 と His172 がヘムの結合に重要なアミノ酸残基であると結論づけた。

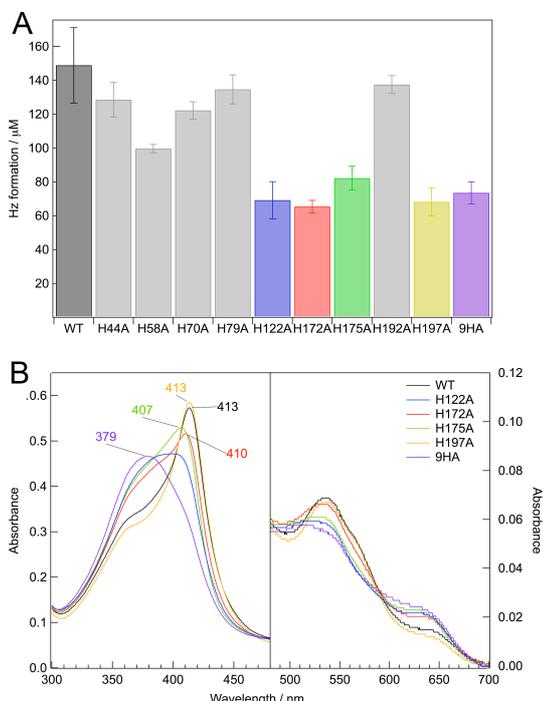


図 3 (A) HDP 変異体における Hz 形成活性。(B) HDP-ヘム複合体の紫外可視吸収スペクトル。

(2) 再構成 AGLU の調整およびヘム結晶化機構の検討

AGLU は HDP 同様、大腸菌中で封入体として

得られた。そこで、尿素及び塩酸グアニジンによる可溶化と再構成を試みた。塩酸グアニジンでは、再構成中に AGLU が沈殿してしまい、再構成タンパク質を得ることができなかった。一方、尿素による可溶化では透析による再構成が可能である事が明らかとなった。様々な精製手法を検討した結果、再構成した AGLU はゲルフィルタレーションクロマトグラフィーを用いる事で高純度に精製することができた。

H_z 形成能を調べたところ、再構成 AGLU は HDP 同様に高い H_z 形成能を持つ事が明らかになった。そこで、紫外可視吸収スペクトル測定、共鳴ラマン測定、電子スピン共鳴測定などを用いて、活性中心のヘムに結合するアミノ酸残基を検討したところ、HDP 同様にヒスチジン残基の可能性が強く示唆された。現在、AGLU 内のヒスチジン残基をヘムに結合不可能なアラニン残基に置換し、各ヒスチジン残基の役割について検討している。

(3) HDP と AGLU の比較による結晶化酵素の反応機構検討

HDP と AGLU においてアミノ酸配列の相同性は全くなく、可溶性タンパク質と膜タンパク質であることも大きな違いである。しかし、今回の研究により、HDP と AGLU の活性中心には、いずれもヒスチジン残基が存在している事が明らかとなった。ヒスチジン残基は多くのヘムタンパク質において、ヘムの結合するアミノ酸残基として働いている。H_z 形成反応は特殊な反応であるにもかかわらず、HDP や AGLU においてもヒスチジン残基が重要な役割を果たしている事は、今後のヘム結晶化機構解明研究において非常に重要な点である。

HDP では2つのヘムがヒスチジン残基に結合した後、ヘムの2量体を形成する反応機構が示唆された。HDP から放出されたヘムの2量体が結晶核として機能し、より大きな H_z の結晶を生成すると考えられる。AGLU に関しては、現在ヘムの結合数を検討しており、今後より詳細な反応機構を明らかにし、HDP との比較を通じて、タンパク質による結晶化反応機構の分子機構を解明していきたい。

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 5 件)

(1) Shinji Yano; Haruto Ishikawa; Misao Mizuno; Hiro Nakamura; Yoshitsugu Shiro; Yasuhisa Mizutani, Ultraviolet resonance Raman observations of the structural dynamics of Rhizobial oxygen sensor FixL on ligand recognition, *J Phys Chem B* (2013) **117**, 15786-15791. 10.1021/jp406709e 査読有

(2) Kenta Yamada; Haruto Ishikawa; Misao

Mizuno; Naoya Shibayama; Yasuhisa Mizutani, Intersubunit communication via changes in hemoglobin quaternary structures revealed by time-resolved resonance Raman spectroscopy: direct observation of the Perutz mechanism, *J Phys Chem B* (2013) **117**, 12461 - 12468. 10.1021/jp407735t 査読有

(3) Keisuke Nakatani; Haruto Ishikawa; Shigetoshi Aono; Yasuhisa Mizutani, Heme-binding properties of heme detoxification protein from *Plasmodium falciparum*, *Biochem Biophys Res Commun* (2013) **439**, 477 - 480. 10.1016/j.bbrc.2013.08.100 査読有

(4) Hitomi Sawai; Hiroshi Sugimoto; Yoshitsugu Shiro; Haruto Ishikawa; Yasuhisa Mizutani; Shigetoshi Aono, Structural basis for oxygen sensing and signal transduction of the heme-based sensor protein Aer2 from *Pseudomonas aeruginosa*, *Chem Commun* (2012) **48**, 6523 - 6525. 10.1039/C2CC32549G 査読有

(5) Yuu Yoshida; Haruto Ishikawa; Shigetoshi Aono; Yasuhisa Mizutani, Structural dynamics of proximal heme pocket in HemAT-Bs associated with oxygen dissociation, *Biochim Biophys Acta* (2012) **1824**, 866 - 872. 10.1016/j.bbapap.2012.04.007 査読有

[学会発表] (計 9 件)

(1) 大友章裕、石川春人、水野操、青野重利、水谷泰久、Protein dynamics of CooA upon CO dissociation studied by time-resolved resonance Raman spectroscopy、日本生物物理学会第 51 回年会、平成 25 年 10 月 28 日～30 日、京都

(2) 加来祥太郎、中谷圭佑、石川春人、水谷泰久、Heme binding site in *Rhodnius prolixus* α -glucosidase promoting the heme crystallization、日本生物物理学会第 51 回年会、平成 25 年 10 月 28 日～30 日、京都

(3) Akihiro Otomo, Haruto Ishikawa, Misao Mizuno, Shigetoshi Aono, Yasuhisa Mizutani, Structural changes in the heme and heme pocket upon CO dissociation of CooA observed by time-resolved resonance Raman spectroscopy, 16th International Conference on Bioinorganic Chemistry, July 22-26, 2013, Grenoble, France

(4) Haruto Ishikawa, Keisuke Nakatani, Shigetoshi Aono, Yasuhisa Mizutani,

Identification of active-site residues in heme detoxification protein, 16th International Conference on Bioinorganic Chemistry, July 22-26, 2013, Grenoble, France

(5) 石川春人、中谷圭佑、青野重利、水谷泰久、Heme Detoxification Protein によるヘム結晶化機構、第40回生体分子科学討論会、平成25年6月7日～8日、大阪

(6) 山脇 竹生、石川 春人、水野 操、中村 寛夫、城 宜嗣、水谷 泰久、酸素センサータンパク質 FixL のリガンド特異的な構造変化：部位特異的変異と紫外共鳴ラマン分光法による研究、日本化学会第94春季年会、平成26年3月27日～30日、名古屋

(7) 加来 祥太郎、中谷 圭佑、石川 春人、水谷 泰久、ヘミンの結晶化触媒活性を有するサシガメ由来 α -グルコシダーゼの分光学的研究、日本化学会第93春季年会、平成25年3月22日～25日、滋賀

(8) 山脇 竹生、石川 春人、水野 操、中村 寛夫、城 宜嗣、水谷 泰久、紫外共鳴ラマン分光法による 酸素センサータンパク質 FixL のリガンド特異的な構造変化の観測、日本化学会第93春季年会、平成25年3月22日～25日、滋賀

(9) 石川 春人、吉田 祐、青野 重利、水谷 泰久、時間分解共鳴ラマン分光法を用いた酸素センサータンパク質 HemAT の酸素脱離に伴う構造変化観測、日本化学会第93春季年会、平成25年3月22日～25日、滋賀

[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