

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05555

研究課題名(和文) 2種の色素分解酵素に秘められた反応のエッセンス

研究課題名(英文) Critical essence hidden in two catabolic enzymes for biological pigments

研究代表者

松井 敏高 (Matsui, Toshitaka)

東北大学・多元物質科学研究所・准教授

研究者番号：90323120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヘムを異常に歪めて結合する新型ヘム分解酵素(結核菌MhuD・黄色ブドウ球菌IsdG)について、その特殊な反応機構を解明した。MhuDについては反応の全貌解明にほぼ成功し、同一活性中心で1原子/2原子酸素添加反応を融合する初めての酵素であることを示した。IsdGについても、反応条件によってはMhuDと同様の反応が支配的となることを示した。しかし、還元速度などに応じてHCHOの遊離が促進され、細菌における生合成の制御機構の1つと提案された。さらに、新規ヘム代謝物を色素とする蛍光蛋白質の開発にも取り組み、通常生成物に対する選択性の向上など、有望な結果を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have elucidated unique reaction mechanisms of new-type heme-degrading enzymes, MhuD from *Mycobacterium tuberculosis* and IsdG from *Staphylococcus aureus*, both of which bind heme in highly distorted conformation. MhuD successively catalyzes mono- and di-oxygenation reactions in a single active site. This is the first discovery of the enzyme that fuses the two distinct reactions, leading to the produce the unique heme catabolites of MhuD. Reaction analysis on IsdG reveals, contrary to previous reports, that the MhuD-type reaction becomes dominant under normal reaction conditions. The HCHO release reported is enhanced by increasing reduction rates. This mechanism may be biologically relevant to regulate the HCHO biosynthesis in *S. aureus*. Furthermore, fluorogenic proteins that bind new heme catabolites as pigments have been developed mainly for their detection with high sensitivity.

研究分野：生物無機化学

キーワード：ヘム代謝 反応機構 結核菌 黄色ブドウ球菌 酸素添加

1. 研究開始当初の背景

ヘム(鉄-ポルフィリン錯体)は様々な生理機能を持つ色素分子であり、その分解反応もシグナル伝達や O₂ センシングなどに重要である。ほ乳類ではヘムオキシゲナーゼ(HO)が「鉄・CO・ビリベルジン(BV)」への分解を担っており(図1①)、HO反応は基質のヘム自身が O₂ を活性化する自己分解機構で進行する。近年、病原性細菌などから新しいタイプのヘム分解酵素(宿主ヘムからの鉄獲得に重要)も発見されていたが、その機構はHOと同等と考えられてきた。しかし我々は「ヘムを異常に歪めて結合する」結核菌の新型ヘム分解酵素 MhuD に注目し、MhuD が CO を放出せずにヘムを分解し、新たなヘム代謝産物(マイコピリン、図1②)を与えるという驚くべき発見をした。立体的な歪みを利用して酵素の新たな機能を引き出す機構は興味深く、その詳細の解明が望まれる。特に CO を遊離しないヘム分解はこれまでに例がなく、反応機構の特殊性を明示している。生成物の違いは結核菌の生存にも重要と考えられ、生物学的な重要性も示唆されている。MhuD の特殊な反応性はヘムの歪みに起因すると予想され、類似構造を持つ黄色ブドウ球菌の IsdG でも CO は発生しない。しかし、IsdG 反応では HCHO を遊離したスタフィロピリン(SB)が生成すると報告されており(図1③)、両反応の類似性は明確ではなく、立体的な歪みが実際にはどのような効果を持つのか不明なままであった。

上記の新規ヘム分解反応については、実際の生体内での進行を確認することも非常に重要な研究課題である。新反応では特殊な色素が生じるため、これらの蛍光検出が有用と考えられる。BV などの通常生成物については、その結合によって蛍光を発する蛋白質が知られている。これらの蛋白質をベースとして構造を最適化すれば、新規色素の選択的検出を実現する蛍光蛋白質の創出も可能と考えられる。さらに、種々の色素を利用することで、様々な分光特性の蛍光蛋白質を開発でき、新たな研究ツールの開発にも繋がると期待される。

以上の観点から、特殊なヘム分解の反応解析と生成物の検出・利用を進める本研究に着手した。

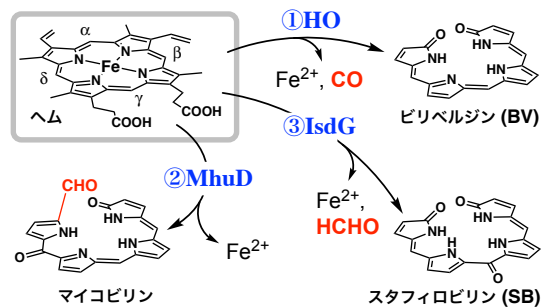


図1 種々のヘム分解反応

2. 研究の目的

本研究では基質の強い歪みが誘起する特殊なヘム分解反応の機構を解明し、そのエッセンスの抽出と理解を第1の目的とする。似て非なる2つの酵素(MhuD, IsdG)の反応を解明することで、歪みが引き起こす一般的な効果を抽出し、新たな反応制御機構の本質解明を目指す。また、各酵素での精密制御も解明することで、各生物種でヘム代謝物が微妙に異なることの生理的意義に関する知見を得る。さらに、新規ヘム代謝物を色素として用いる蛍光蛋白質の開発にも取り組む。選択的なプローブ開発により、新規代謝物の生体内検出を目指しつつ、新たな分光特性を有する有用な研究ツールの創出にも挑む。特に注目すべきは下記の3点である。

(1) 結核菌 MhuD の新反応について、その新奇な反応機構を解明する。特に特殊な反応性を有すると予想される中間体について、その生成と反応を直接検討し、従来型 HO との違いを明らかにする。

(2) 黄色ブドウ球菌 IsdG についても同様の反応解析を進める。MhuD との対比により、両者の共通点を明確化し、歪んだヘムの分解機構のエッセンスを抽出する。さらに、両者の相違点の要因を探り、各酵素における精密制御とその生理的意義を考察する。

(3) 特殊なヘム代謝物を色素として用いる蛍光蛋白質を開発する。MhuD や IsdG の特殊な生成物に加え、独自に発見した含硫黄代謝物の蛍光検出を目指し、種々の蛋白質との複合化、および、構造改変による高輝度化や特異性向上を目指す。

以上の情報から、生体における多様なヘム代謝反応の解明を目指す。さらに新反応を発見することで、ヘム分解の新たな生理機能の提案なども目標とする。

3. 研究の方法

(1) ヘム分解酵素およびその反応解析用酵素(MhuD, IsdG, HO-1, CPR, BVR など)については、既に確立した手法で大腸菌での発現・精製を行う。ヘム分解反応は主に吸収スペクトル測定で追跡し、生成物は固相抽出後、HPLC および ESI-MS の測定により解析する。新規生成物の構造決定に向けて、大スケールでの酵素反応を検討し、大量精製法を確立する。得られた生成物の構造は、NMR や MS/MS などの情報を合わせて決定する。

(2) 水酸化ヘム中間体は既報に従って化学合成する。嫌気グローブボックス内で酵素との複合体を調製し、ゲルろ過(またはイオン交換)カラムにより精製する。グローブボックス内に設置した分光器を用い、O₂ との反応を検討する。酸素源の決定には ¹⁸O₂ を用い、そ

の取り込みを ESI-MS の測定で検証する。

(3) 蛍光検出には比較的小さい蛋白質を用いる予定であり (10-20kDa)、人工遺伝子合成により発現系を構築し、His-tag などを利用することで簡便に精製する。精製蛋白質に各色素を添加し、吸収および蛍光スペクトルの変化から結合特性や蛍光特性を検討する。有望な蛋白質については基質結合部位などに変異を導入し、各特性の改変・最適化を試みる。多数の変異体から有用なものを選別し、新規色素の選択的検出や特異な分光特性の付与を試みる。

4. 研究成果

(1) MhuD の機構解明

結核菌 MhuD の特殊なヘム分解機構の解明を進めた。まず、従来型 HO との反応分岐点と予想される“水酸化ヘム”中間体 (図 2) が酵素反応中に生成するかを検討した。嫌気条件でヘム-MhuD 複合体と過酸化水素の反応を行ったところ、主生成物は鉄 4 価錯体 (不活性中間体) であった。しかし、還元剤の存在下で過酸化水素との反応を繰り返すと水酸化ヘムの蓄積が確認された。よって、MhuD の初反応は HO と同じ自己水酸化反応 (1 原子酸素添加) であるが、水酸化ヘムの生成効率はあまり高くないと考えられる。

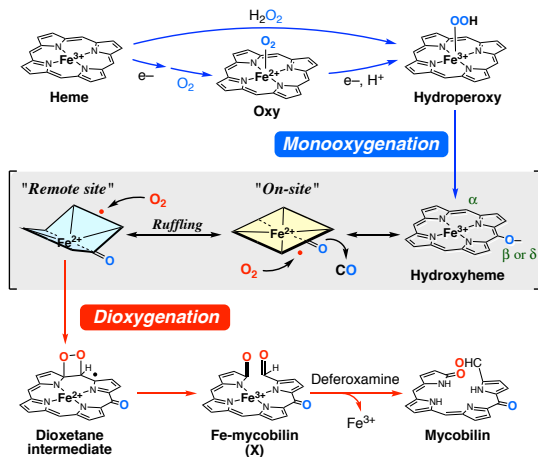


図 2 MhuD の反応機構

次いで水酸化ヘムの開環機構を検討した。通常、ポルフィリン環の開裂には O_2 と還元剤が必要であるが、MhuD 反応では O_2 のみで開環が進行した。また、 O_2 の必要量は水酸化ヘムに対して 1 モル当量であったため、2 原子酸素添加機構が示唆された (図 2)。実際、 O_2 との反応で生じる中間体について同位体ラベル実験を行ったところ、1 分子の O_2 から 2 つの酸素原子が基質に取り込まれていることが示され、2 原子添加機構が証明された。さらに反応解析を進めた結果、 O_2 は水酸化部位の近傍ではなく、隣のメソ位を直接攻撃し、ジオキセタン中間体を経由して開環すると提案された。 O_2 との反応で観測された中間体は、

各種分光測定や質量分析の結果、鉄-マイコビルン錯体と示唆された。以上の結果から、MhuD 反応は図 2 に示した機構で進行することが強く示唆された。

同一の活性中心で 1 原子 / 2 原子酸素添加反応を行う酵素は MhuD が初めてである。初段階 (1 原子添加) の効率の低さは、同じ活性中心で 2 原子酸素添加も実現するためには必要なことと推察される。MhuD は 2 種の酸素添加モードを機能的に融合させ、自身の生存に適した特殊な代謝反応を実現していると考えられる。異種機能の融合は酵素機能の可能性を広げる設計戦略として、生物的にも重要と提案される。

(2) IsdG の反応解明

黄色ブドウ球菌 IsdG についても、MhuD と同様の反応解析を行った。従来、IsdG の生成物はスタフィロビリルン (SB) とホルムアルデヒド (HCHO) と報告されていた (図 3)。しかし、種々の反応条件の検討の結果、HCHO 遊離は限定的な条件でのみ支配的であり、特に生体内に近い触媒条件では HCHO の遊離はほとんど見られなかった。代わりに検出される新規生成物は“ホルミル基が結合した SB” (SB-CHO) と予想され、近年、同様の生成物が他の研究グループからも報告された。しかし、HPLC 及び ESI-MS による詳細な解析の結果、この生成物には反応に用いた還元剤 (アスコルビン酸) が付加していることが確認された。アスコルビン酸は生理的な還元剤とは考えにくく、その付加体はアッセイ条件に依存するアーティファクトと考えられる。実際、還元酵素 (CPR) や低濃度アスコルビン酸によるヘム分解ではアスコルビン酸が付加していない新規生成物が得られ、IsdG 本来の生成物と考えられた。これらの生成物を大量調製し、ESI-MS および NMR によって構造を検証した結果、SB-CHO の 2 つの異性体と同定された。

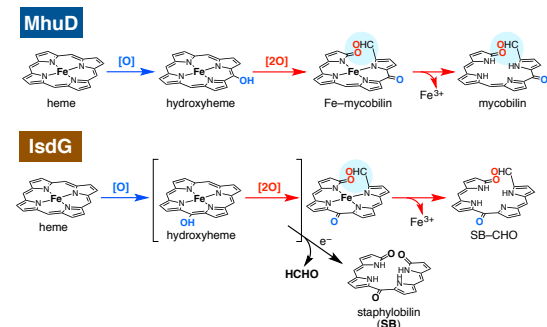


図 3 MhuD と IsdG 反応の比較

SB-CHO はマイコビルン (MhuD 生成物) の位置異性体にあたり、その生成は MhuD 型の反応機構 (図 2) で説明できる。そこで水酸化ヘム-IsdG 複合体の反応を検討したところ、やはり O_2 のみとの反応で 2 原子酸素添加が進行し、SB-CHO が選択的に生成した。SB-CHO に導入された 3 つの酸素原子は全て

O₂由来であり、IsdGにおいても1原子/2原子酸素添加の融合によって特殊な生成物が得られることを見いだした。これらの機構変化はヘムの歪みに共通する効果と考えられる。

一方、水酸化ヘム-IsdG複合体とO₂の反応に還元剤が共存すると、HCHO遊離を伴うSBの生成が観測された。HCHOの遊離量は還元速度に応じて増加したため、細菌におけるHCHO合成の調節機構とも考えられる。SBに取り込まれた3つの酸素原子は全てO₂由来であり、それぞれ異なるO₂分子に由来していた。この結果、加水分解による脱ホルミル機構は否定され、(少なくとも)3度のO₂活性化によってSBが生成することが示された。なお、水酸化ヘム自体は非常に還元されにくいいため、O₂との反応後に生じる開環中間体の還元によってHCHOが遊離すると考えられる。以上の結果から、IsdGでは1原子/2原子酸素添加による開環の後、中間体の鉄イオンが遊離する前に還元され、O₂ともう一度反応することでHCHOを脱離させると予想される。よって、鉄イオンの遊離・還元の違いを生み出す要因と考えられる。

(3) 新規ヘム代謝物の高感度検出

特殊なヘム分解産物の生体内検出を目指し、新たな蛍光タンパク質の開発も試みた。これまでの研究で、ほ乳類型ヘム分解酵素が特定の反応条件下では硫黄原子を取り込んだビリルビン(S-BR)を与えることを見いだした。そこで、ビリルビン(BR)結合型蛍光タンパク質UnaGをベースとし、S-BRを選択的に検出するシステムの構築を試みた(図4)。S-BRとUnaG複合体の蛍光強度はBR結合型より弱いものの、蛍光波長が70nm近くも長波長シフトし、選択的検出は可能と考えられた。また、(S-)BR結合部位に系統的な変異を導入した結果、SBR蛍光の増強やBR蛍光の低減にも成功し、UnaGベースの検出が有用であると考えられた。また、ビリベルジン(BV)を色素とする蛍光タンパク質(smURFP)の検討も進めた。smURFPとS-BVの結合はBVより数倍速い場合があり、比較的強い蛍光も観測された。今後、これらの蛍光タンパク質群を活用することで、種々のビリルビンを検出するプローブや、有用な蛍光特性を有するタンパク質の開発が期待される。

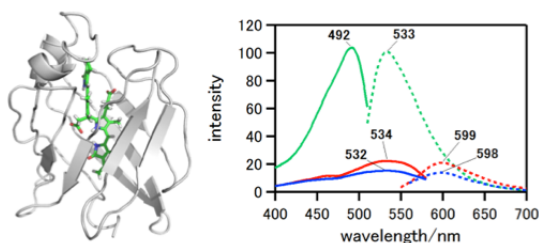


図4 (S)BR-UnaG複合体の蛍光スペクトル

(4) 総括

以上の研究により、ヘムの歪みを利用した特殊なヘム分解反応の機構を明らかにし、そのエッセンスの抽出・理解に成功した。また、各酵素での違いから、生理的意義に関する知見も得られた。また、新たな色素分子の発見にも成功し、これらの検出プローブや新規研究ツールの開発の可能性も見いだした。今後、特殊なヘム代謝生成物と蛍光蛋白質を融合した研究が進展すると期待される。

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 4件)

- ① T. Uchida, S. Sekine, N. Dojun, A. Lewis-Ballester, I. Ishigami, T. Matsui, S. Yeh, K. Ishimori, Reaction intermediates in the heme degradation reaction by HutZ from *Vibrio cholera*. *Dalton Trans.*, 46 (25), 8104-8109 (2017), DOI: 10.1039/C7DT01562C, 査読有。
- ② T. Suenaga, M. Watanabe-Matsui, H. Shima, T. Matsui, M. Ikeda-Saito, K. Igarashi, K. Murayama, Charge-state-distribution analysis of Bach2 intrinsically disordered heme binding, *J. Biochem.* 160 (5), 291-298 (2016), DOI: 10.1093/jb/mvw035, 査読有。
- ③ M. Bacchi, E. Veinberg, M. J. Field, J. Niklas, T. Matsui, D. M. Tiede, O. G. Poluektov, M. Ikeda-Saito, M. Fontecave V. Artero, Artificial Hydrogenases based on Cobaloximes and Heme Oxygenase. *ChemPlusChem*, 81 (10), 1083-1089 (2016), DOI: 10.1002/cplu.201600218, 査読有。
- ④ T. Matsui, S. Nambu, C. W. Goulding, S. Takahashi, H. Fujii, M. Ikeda-Saito, Unique coupling of mono- and dioxygenase chemistries in a single active site promotes heme degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 113 (14), 3779-3784 (2016), DOI: 10.1073/pnas.1523333113, 査読有。

[学会発表] (計 12件)

- ① 篠崎玲香, 松井敏高, 黄色ブドウ球菌 IsdG におけるヘム代謝生成物の制御機構, 第44回 生体分子科学討論会 (2017年)
- ② Toshitaka Matsui, Unusual Degradation of Highly Distorted Heme: Its Mechanism and Precise Control, The 2nd International Symposium on Stimuli-responsive Chemical Species for the Creation of Functional Molecules (2017年)
- ③ Toshitaka Matsui, Functional coupling of mono- and dioxygenase chemistries in a single active site promotes unique heme degradation, Japan-Korea-Taiwan Bioinorganic Chemistry Symposium (2016年)

- ④ 松井 敏高, 齋藤正男, 2種の酸素添加反応の融合による特異なへム分解, 第89回 日本生化学大会 (2016年)
- ⑤ Toshitaka Matsui, Shusuke Nambu, Masao Ikeda-Saito, Unusual heme degradation achieved by unprecedented coupling of two distinct oxygenation modes, ICPP-9 (Ninth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines) (2016年)
- ⑥ 松井敏高, 高橋聡, 齋藤正男, 藤井浩, 2種の酸素添加反応の融合による特殊なへム分解, 第26回 金属の関与する生体関連反応シンポジウム (2016年)
- ⑦ Toshitaka Matsui, Shusuke Nambu, Masao Ikeda-Saito, Unusual oxygenation mechanism of MhuD, a heme degrading enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*, Pacificchem 2015 (The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies) USA Honolulu (2015年)
- ⑧ Toshitaka Matsui, Shusuke Nambu, Yukari Ono, Kohei Tsumoto, Masao Ikeda-Saito, Unique reaction products of IsdG-type heme-degrading enzymes, Pacificchem 2015 (The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies) (2015年)
- ⑨ 松井敏高, 齋藤正男, 異種機能の融合による特殊なへム分解機構, 第9回バイオ関連化学シンポジウム (2015年)
- ⑩ 松井 敏高, へムの色んな壊し方, 北大・構造化学セミナー “New Frontier of Biostructural Chemistry in Hokkaido University” (2015年)
- ⑪ Toshitaka Matsui, Shusuke Nambu, Masao Ikeda-Saito, Unusual oxygenation mechanism of MhuD, a heme degrading enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*, "Metals in Biology" in Wako (2015年)
- ⑫ 松井 敏高, 南部 周介, 齋藤 正男, 結核菌 MhuD による特殊な酸素添加反応, 第42回生体分子科学討論会 (2015年)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

()