

平成30年6月14日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07018

研究課題名(和文) 環状テトラピロールの生合成メカニズムの解明：ヒドロキシメチルピランの構築と環化

研究課題名(英文) Investigation of biosynthetic mechanism of cyclic tetrapyrrole: Construction and cyclization of hydroxymethylbilane

研究代表者

佐藤 秀明 (SATO, Hideaki)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：60271996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体におけるテトラピロールの構築と環化に関わる2つの酵素について、その反応メカニズムを立体構造の面から検討した。特に、ヒドロキシメチルピランシンターゼ(HMBS)はジピロメタン補因子をもち、これに4分子のポルホビリノーゲンを連結して鎖状テトラピロールを生成する酵素である。反応途中のHMBSを基質分子の結合数に応じて分取し、基質を2分子結合した反応中間体についてX線結晶構造解析に成功した。この複合体では、基質の結合によって補因子が活性部位の奥側に移動し、その元の位置を2つの基質分子が占めていた。これは、テトラピロール構築の際にHMBSの活性部位のコンホメーションが大きく変化することを示している。

研究成果の概要(英文)：We tried to clarify the reaction mechanism of the two enzymes involved in the construction and cyclization of tetrapyrrole, based on their crystal structure. In particular, hydroxymethylbilane synthase (HMBS) has a dipyrromethane cofactor and combines four molecules of porphobilinogen as substrates sequentially to form a linear tetrapyrrole, hydroxymethylbilane. We separated enzyme-substrates complexes depending on the number of bound substrates, and succeeded in X-ray crystal structure analysis of HMBS in complex with two substrate molecules. In its crystal structure, compared to the holo form with no substrate, the cofactor moved to the far side of the active site and the two substrate molecules located in the space where originally occupied by the cofactor. These results indicate that the active site of HMBS changes its conformation greatly during the tetrapyrrole construction from substrates.

研究分野：ヘム関連酵素の生化学

キーワード：ヘム生合成 ポルフィリン生合成 テトラピロール X線結晶構造解析 酵素反応機構

1. 研究開始当初の背景

(1) 動物のヘム合成経路は 8 つの酵素が関わる代替の利かない重要な代謝経路であり(図 1), どの酵素が欠損してもヘム前駆体が体内に蓄積して難治性疾患のポルフィリン症を発症する。ヒドロキシメチルピランシンターゼ (HMBS) については, これまでに大腸菌とヒト, シロイヌナズナ由来のホロ酵素で結晶構造が決定され, それらに基づいて一応のヒドロキシメチルピラン (HMB) 合成機構が提唱されている(図 2)。従来, ジピロメタン補因子を Cys 残基に共有結合したホロ型 HMBS の立体構造だけが報告されており, 変異体の活性測定と合わせて, その活性部位が 2 つのドメインの間の溝にあると推定されている。しかし, HMBS-基質複合体などの構造は報告がなく, 補因子や基質の結合様式を含めた反応機構の詳細は不明である。

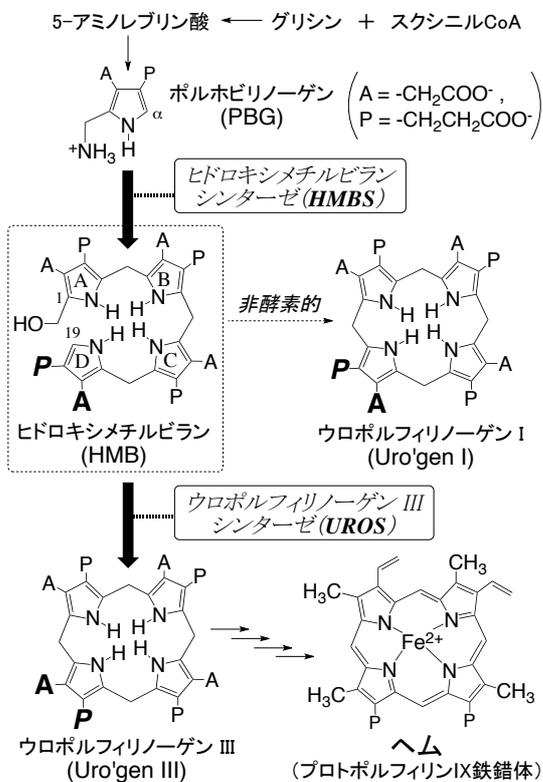


図1. ポルフィリン合成経路とヒドロキシメチルピラン (HMB) の非酵素的環化: 本研究では, HMBを合成する酵素HMBSと環化する酵素UROSを扱う。

(2) 一方, ウロポルフィリノーゲン III シンターゼ (UROS) に関しては, ヒトと高度好熱性細菌 *T. thermophilus* 由来のもので酵素単独の結晶構造が報告されており, 溶液中では 1 対の逆平行な β ストランドで結ばれた 2 つのドメインが, 比較的柔軟に動く可能性が示唆されている。また, 競合阻害剤を用いた NMR による活性部位のマッピングは, 2 つのドメイン間の溝に活性部位が存在する可能性を示唆している。さらに, 英

国のグループは基質類似体および想定される中間体の類似体を化学合成し, 阻害実験などからスピロ型中間体を経る反応機構を提案している。しかし, これまでに UROS と基質やその類似体との複合体の結晶は得られておらず, 反応機構を議論できるような詳しい構造解析は進んでいない。さらに, 非酵素的反応により自発的に環化してしまう比較的不安定な HMB を, HMBS から UROS が安定に受け取る様式についても未知である。

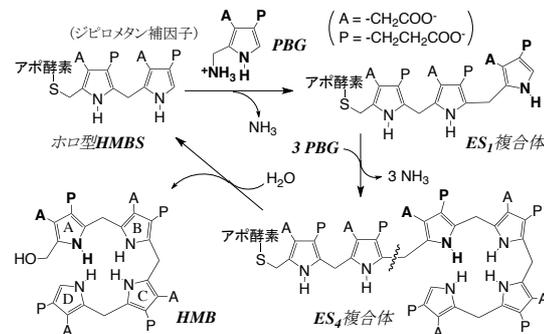


図 2. HMBS 反応: ジピロメタン補因子に PBG が 4 分子連結した後, HMB が解離すると考えられている。

2. 研究の目的

ヘムタンパク質の補欠分子族ヘムや葉緑体の色素クロロフィルでは, 側鎖配置の対称性が失われている。これは, 両者に共通のポルフィリン合成経路において, HMBS の合成する鎖状テトラピロールである HMB が, UROS によって環化されてウロポルフィリノーゲン III となるにあたり, D 環ピロールの反転を伴うためである。研究全体の目標はポルフィリン合成経路の全容解明であり, 本研究課題では HMBS による 4 分子のポルホビリノーゲン (PBG) から 1 分子の HMB への縮合過程と, UROS による D 環反転を伴う HMB の環化過程についての詳細な反応機構を, 構造生物学的, 酵素化学的および分光学的手法によって明らかにすることを目的とする。HMB の構築と環化について結晶構造と溶液中での反応の両面から検討し, ヘムやクロロフィルに特徴的である非対称な側鎖配置が生じる反応機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 補因子の結合したヒト由来 HMBS は大腸菌で発現させ, 硫酸分画と 4 段階のカラムクロマトグラフィーにより精製・単離した。得られた酵素をホロ型 HMBS の結晶化に用いた。また, この精製ホロ型 HMBS に数当量の基質 PBG を添加した後, イオン交換カラムクロマトグラフィーを行って, HMBS に PBG が 2 分子結合した複合体 (ES₂ 複合体) を調製した。ES₂ 複合体の形成は質量分析 (ESI-TOF-MS) で確認し, 濃縮して結晶化に用いた。

(2) 補因子の先に反応を進行させない PBG 類似体を 1 つだけ結合させた、ヒト由来 HMBS の ES₁ 型複合体の結晶については、基質を結合していないホロ型 HMBS の結晶を作成したのち、PBG 類似体を溶解した抗凍結剤に浸すことで調製した。

(3) ビリルビンやビリベルジン、HMB のような鎖状テトラピロールを結合させた HMBS の ES₄ 型複合体の結晶調製は、共結晶化またはホロ型 HMBS 結晶の鎖状テトラピロールを含有した抗凍結剤に対するソーキングで行った。

(4) (1)~(3)で調製した、HMBS の補因子の先に基質 PBG や PBG 類似体を順次結合させた反応中間体の ES₁ 型、ES₂、ES₄ 型複合体の結晶について、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL44XU で X 線結晶構造解析を実施した。また、縮合反応における活性部位周辺のアミノ酸残基の役割を探るため、変異酵素の発現系構築も行った。

(5) ヒト由来 UROS の基質結合様式を解明するため、X 線結晶構造解析に向けて、反応の進行しない基質類似体として鎖状テトラピロールのビリルビン等と UROS との複合体の共結晶化を試みた。

(6) 溶液中における HMBS と UROS の相互作用について、ネイティブ PAGE (電気泳動) 法で検討した。両酵素だけの条件の他、PBG または PBG 類似体をそれぞれ添加した条件で検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト由来 HMBS では、その補因子の先に反応を進行させない PBG 類似体を 1 つだけ結合させた反応中間体の ES₁ 型複合体について、SPring-8 のビームライン BL44XU を用いて分解能 2.4 Å で X 線結晶構造解析に成功した。PBG 類似体が補因子の近傍に非共有結合して HMBS 反応を阻害することが明らかとなった。これは HMBS の活性部位に最初の基質が結合する状況に相当するものと考えられる。

(2) HMBS の反応途中で生じる酵素-基質複合体の結晶構造解析を行った。補因子をもつホロ型 HMBS に数当量の PBG を加えてイオン交換カラムクロマトグラフィーを行うと、PBG 添加前より保持時間の長いピークが複数現れた (図 3A)。その 1 つを分取して質量分析 (ESI-TOF-MS) し、多価イオンピークのデコンボリューションから、HMBS に 2 分子の PBG が結合した ES₂ 複合体の形成を明らかにした (図 3B)。これを結晶化し、SPring-8 の放射光を用いて分解能 2.5 Å までの X 線回折データを収集した。構造解析の結果、ES₂ 複合体では補因子の先に 2 分子の PBG が連結

し、基質フリーの場合よりも補因子が活性部位の奥側へ移動して、その元の位置を 2 つの PBG 分子が占めていることが判明した (図 4)。また、補因子と基質の側鎖のカルボキシ基は、周辺の塩基性または極性のアミノ酸残基と多数の非共有結合を形成していた。

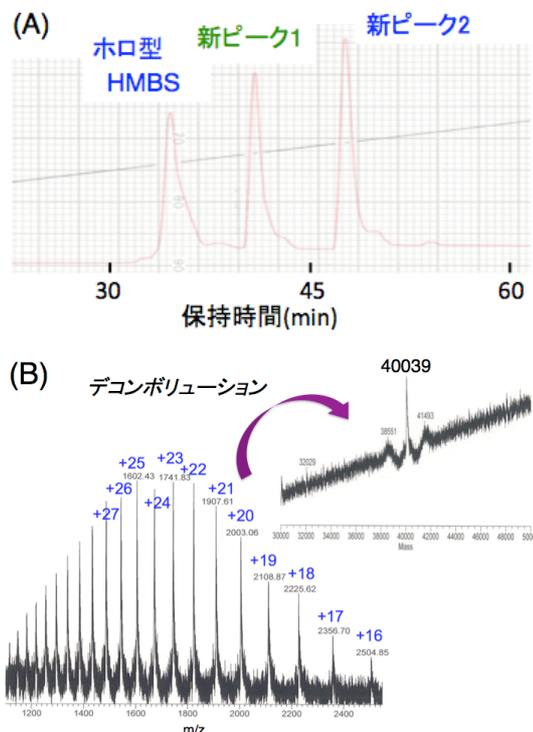


図 3. PBG 添加後の HMBS のクロマトグラム (A) と新ピーク 1 の質量分析 (B) : 新ピーク 1 が HMBS の ES₂ 複合体 (分子量の理論値 = 40036) に対応。

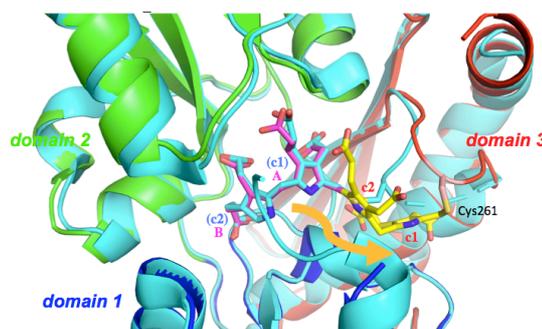


図 4. HMBS のホロ型 (水色) と ES₂ 複合体の活性部位構造の重ね合わせ : ES₂ 複合体では補因子 (c1, c2) が奥側に移動し、元の位置に 2 分子の PBG (A, B) が結合。

(3) ヒト由来 HMBS について、ビリルビンやビリベルジン、HMB のような鎖状テトラピロールを結合させた ES₄ 型複合体の結晶調製と構造解析を試みたが、良質な単結晶を得ることはできず、立体構造の解明には至らなかった。ホロ型 HMBS の結晶をビリルビンやビリベルジンを含んだ抗凍結剤に浸した際にあまり着色しなかったことから、結晶中の複合体形成が十分ではなかったと考え

られる。さらに、溶液中で HMBS に対してビリルビンまたはビリベルジンを添加して紫外-可視吸収スペクトルの変化を調べたが、いずれも明確な吸収極大のシフト等は観測されず、文献で報告されているほど親和性は高くないことが推測された。

(4) HMBS-基質(類似体)複合体の X 線結晶構造解析でこれまでに得られた結果は、HMBS が単一の活性部位で多段階のピロール連結反応を進めることを示唆している。反応途中の HMBS については、以下のような反応機構が考えられる。まず基質 PBG がジピロメタン補因子の近傍に非共有結合で結合したのち、基質と補因子のピロール環の間で脱アミノ反応に伴ってメチレン架橋が構築される。この際にピロール環を単位として活性部位内にオリゴピロール鎖が引き込まれる。次の PBG がピロール鎖末端の近傍に結合すると、同様の反応が繰り返されてピロール鎖が伸長する。補因子が 4 分子の PBG と反応した後の HMB の解離段階については、今後 ES₄ 型複合体の立体構造を解明して明らかにしたい。

(5) UROS については、反応の進行しない基質類似体として鎖状テトラピロールのビリルビン等とヒト由来 UROS との複合体の共結晶化を試みたが、これまでのところ構造解析に用いることのできる良質な単結晶を得ることはできていない。今後さらなる結晶化条件の検討が必要である。

(6) HMBS と UROS の間の相互作用について、ネイティブ PAGE(電気泳動)法で検討した。両酵素だけの条件の他、PBG または PBG 類似体をそれぞれ添加した条件で調べたが、複合体に対応するような新しいバンドの検出には至らなかった。両酵素間の相互作用が明確に観測されるためには、基質 1 つ分(モノピロール)の結合では不十分で、HMB に対応する鎖状テトラピロールの結合が必要と推察された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 36 件)

- ① Jiro Harada, Yutaka Shibata, Misato Teramura, Tadashi Mizoguchi, Yusuke Kinoshita, Ken Yamamoto, Hitoshi Tamiaki; In Vivo Energy Transfer from Bacteriochlorophyll *c*, *d*, *e*, or *f* to Bacteriochlorophyll *a* in Wild-Type and Mutant Cells of the Green Sulfur Bacterium *Chlorobaculum limnaeum*, *ChemPhotoChem*, 2, 190-195 (2018), 査読有, DOI:10.1002/cptc.201700164
- ② Haruna Takao, Kei Hirabayashi, Yuki Nishigaya, Haruna Kouriki, Tetsuko Nakaniwa, Yoshinori Hagiwara, Jiro Harada, Hideaki Sato, Toshimasa Yamazaki, Yoichi Sakakibara, Masahito Suiko, Yujiro Asada, Yasuhiro Takahashi, Ken Yamamoto, Keiichi Fukuyama, Masakazu Sugishima, Kei Wada; A substrate-bound structure of cyanobacterial biliverdin reductase identifies stacked substrates as critical for activity, *Nature Communications*, 8, 14397 (2017), 査読有, DOI:10.1038/ncomms14397
- ③ Yoshinori Hagiwara, Kei Wada, Teppei Irikawa, Hideaki Sato, Masaki Unno, Ken Yamamoto, Keiichi Fukuyama, Masakazu Sugishima; Atomic-resolution structure of the phycocyanobilin: ferredoxin oxidoreductase I86D mutant in complex with fully protonated biliverdin, *FEBS Letters*, 590(19), 3425-3434 (2016), 査読有, DOI:10.1002/1873-3468.12387
- ④ Masaki Unno, Kumiko Ishikawa-Suto, Katsuhiko Kusaka, Taro Tamada, Yoshinori Hagiwara, Masakazu Sugishima, Kei Wada, Taro Yamada, Katsuaki Tomoyori, Takaaki Hosoya, Ichiro Tanaka, Nobuo Niimura, Ryota Kuroki, Koji Inaka, Makiko Ishihara, Keiichi Fukuyama; Insights into the Proton Transfer Mechanism of a Bilin Reductase PcyA Following Neutron Crystallography, *Journal of the American Chemical Society*, 137(16), 5452-5460 (2015), 査読有, DOI:10.1021/jacs.5b00645
- ⑤ Erisa Harada, Masakazu Sugishima, Jiro Harada, Masato Noguchi, Keiichi Fukuyama, Kenji Sugase; Backbone assignments of the apo and Zn(II) protoporphyrin IX-bound states of the soluble form of rat heme oxygenase-1, *Biomolecular NMR Assignments*, 9(1), 197-200 (2015), 査読有, DOI:10.1007/s12104-014-9573-z
- ⑥ Junichi Taira, Yukinori Nakashima, Shun Yoshihara, Shinya Koga, Shinji Sueda, Hideyuki Komatsu, Yuichiro Higashimoto, Toru Takahashi, Nohito Tanioka, Hiroko Shimizu, Hiroshi Morimatsu, Hiroshi Sakamoto; Improvement of heme oxygenase-1-based heme sensor for quantifying free heme in biological samples, *Analytical Biochemistry*, 489, 50-52 (2015), 査読有, DOI:10.1016/j.ab.2015.08.004

[学会発表] (計 105 件)

- ① 佐藤 秀明, 杉島 正一, 塚口 舞, 増子隆博, 小俣 義明, 和田 啓, 久枝 良雄, 山本 健; 基質 2 分子を結合したヒドロキシメチルピランシンターゼの結晶構造解析, 日本化学会第 98 春季年会, 2018 年
- ② 杉島 正一, 佐藤 秀明, 和田 啓, 山本健; NADPH-シトクロム P450 還元酵素-ヘム-ヘムオキシゲナーゼ複合体の結晶構造分解能向上への取り組み, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017 年
- ③ Masakazu Sugishima, Haruna Takao, Yoshinori Hagiwara, Ken Yamamoto, Keiichi Fukuyama, Kei Wada; Crystal Structure of Cyanobacterial Biliverdin Reductase Reveals Two Biliverdin Molecules Bind to the One Catalytic Cleft, 13th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors of Photosynthetic Organisms (ICTPPO), 2017 年
- ④ Keiichi Fukuyama, Kei Wada, Masakazu Sugishima, Masaki Unno; Protonation States of PcyA-Biliverdin and Its I86D Mutant Protein-Biliverdin Complexes Revealed by Neutron and X-ray Crystallographic Analyses, 13th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors of Photosynthetic Organisms (ICTPPO), 2017 年
- ⑤ 萩原 義徳, 和田 啓, 入川 鉄平, 佐藤 秀明, 海野 昌喜, 山本 健, 福山 恵一, 杉島 正一; I86D 変異フィコシアノビルリン:フェレドキシン還元酵素(PcyA)の精密構造解析から見えてきた活性部位周辺酸性残基の水素化状態, 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年
- ⑥ Masakazu Sugishima, Haruna Takao, Kei Hirabayashi, Haruna Kouriki, Tetsuko Nakaniwa, Yoshinori Hagiwara, Jiro Harada, Ken Yamamoto, Keiichi Fukuyama, Kei Wada; Crystal Structure of Biliverdin and NADP⁺ bound Biliverdin IX α Reductase, 9th International Conference on Heme Oxygenase Prague 2016, 2016 年
- ⑦ 萩原 義徳, 和田 啓, 入川 鉄平, 佐藤 秀明, 海野 昌喜, 山本 健, 福山 恵一, 杉島 正一; I86D 変異 PcyA の精密構造解析および機能解析, 第 40 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2016 年
- ⑧ 佐藤 秀明, 杉島 正一, 塚口 舞, 増子隆博, 小俣 義明, 和田 啓, 久枝 良雄, 山本 健, 野口 正人; ヒドロキシメチルピラン合成酵素-阻害剤複合体の結晶構造解析, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016 年
- ⑨ 杉島 正一, 平 順一, 佐藤 秀明, 野口 正人, 山本 健, 坂本 寛; NADPH-シトクロム P450 還元酵素からヘムオキシゲナーゼへの電子移動反応の生化学的検討, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016 年
- ⑩ 高尾 春奈, 平林 佳, 渡邊 彩, 萩原 義徳, 原田 二郎, 榊原 陽一, 水光 正仁, 福山 恵一, 杉島 正一, 和田 啓; シアノバクテリア由来ビリベルジン還元酵素-基質複合体の結晶構造解析, BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会), 2015 年
- ⑪ 佐藤 秀明, 杉島 正一, 塚口 舞, 増子隆博, 小俣 義明, 和田 啓, 久枝 良雄, 山本 健, 野口 正人; ヒドロキシメチルピランシンターゼ-阻害剤複合体の結晶構造解析, BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会), 2015 年
- ⑫ 杉島 正一, 平 順一, 佐藤 秀明, 野口 正人, 山本 健, 坂本 寛; 大きな構造変化を伴うシトクロム P450 還元酵素からヘムオキシゲナーゼへの電子伝達機構, 平成 27 年度日本結晶学会年会, 2015 年
- ⑬ 佐藤 秀明, 杉島 正一, 塚口 舞, 増子隆博, 小俣 義明, 和田 啓, 久枝 良雄, 山本 健, 野口 正人; 基質類似体を結合したヒドロキシメチルピラン合成酵素の結晶構造解析, 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム, 2015 年
- ⑭ 杉島 正一, 平 順一, 佐藤 秀明, 野口 正人, 山本 健, 坂本 寛; 変異 NADPH-シトクロム P450 還元酵素(CPR)を用いた CPR からヘムオキシゲナーゼへの電子伝達機構の検討, 第 39 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2015 年
- ⑮ 高尾 春奈, 平林 佳, 渡邊 彩, 萩原 義徳, 原田 二郎, 榊原 陽一, 水光 正仁, 福山 恵一, 杉島 正一, 和田 啓; NADP⁺ 結合型シアノバクテリア由来ビリベルジン還元酵素の結晶構造, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015 年

- ⑩ Hideaki Sato, Masakazu Sugishima, Mai Tsukaguchi, Takahiro Masuko, Yoshiaki Omata, Kei Wada, Yoshio Hisaeda, Ken Yamamoto, Masato Noguchi; An Inhibitory Effect of a Porphobilinogen Derivative on Hydroxymethylbilane Synthase and the Crystal Structure of the Enzyme-Inhibitor Complex, RIKEN Symposium series: "Metals in Biology" in Wako, 2015 年
- ⑪ Chizu Shimokawa, Saori Shirota-Harada, Hideaki Sato, Masakazu Sugishima, Jiro Harada, Yuichiro Higashimoto, L. Mario Amzel, Masato Noguchi; Inhibition of Human Peptidylglycine α -Amidating Monooxygenase, RIKEN Symposium series: "Metals in Biology" in Wako, 2015 年
- ⑫ Masakazu Sugishima, Hideaki Sato, Junichi Taira, Hiroshi Sakamoto, Yuichiro Higashimoto, Jiro Harada, Ken Yamamoto, Masato Noguchi; Mechanism for the electron transfer from P450 reductase to heme oxygenase, RIKEN Symposium series: "Metals in Biology" in Wako, 2015 年
- ⑬ Hideaki Sato, Masakazu Sugishima, Mai Tsukaguchi, Takahiro Masuko, Yoshiaki Omata, Kei Wada, Yoshio Hisaeda, Masato Noguchi, Ken Yamamoto; Inhibitory Effect of a Novel Porphobilinogen Analog on the Synthesis of a Heme Precursor by Hydroxymethylbilane Synthase, 19th International Conference on Cytochrome P450 (ICCP450 Tokyo 2015), 2015 年
- ⑭ 平 順一, 中島 幸徳, 義原 俊, 古賀 真也, 末田 慎二, 小松 英幸, 東元 祐一郎, 坂本 寛; ヘムオキシゲナーゼ-1 を基盤としたヘムセンサーによる生体試料中の遊離ヘムの定量, 平成 27 年度日本生化学会九州支部例会, 2015 年
- ⑮ 佐藤 秀明, 塚口 舞, 杉島 正一, 増子 隆博, 小俣 義明, 和田 啓, 久枝 良雄, 山本 健, 野口 正人; ヒドロキシメチルピランシンターゼに対する 2-ヨードボルホビリノーゲンの阻害効果と複合体の立体構造の解析, 平成 27 年度日本生化学会九州支部例会, 2015 年

[産業財産権]
○取得状況 (計 1 件)

名称: RAGE アプタマーおよびその用途
発明者: 山岸 昌一, 深水 圭, 東元 祐一郎, 松井 孝憲, 田口 顕正
権利者: 学校法人 久留米大学
種類: 特許
番号: 特開 2016-79184
取得年月日: 平成 28 年 5 月 16 日
国内外の別: 国内

[その他]
ホームページ
「久留米大学研究者紹介: 佐藤秀明」
<http://research.kurume-u.ac.jp/data.php?scode=70155632885110>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 秀明 (SATO, Hideaki)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号: 6 0 2 7 1 9 9 6

(2) 研究分担者

東元 祐一郎 (HIGASHIMOTO, Yuichiro)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号: 4 0 3 5 2 1 2 4

杉島 正一 (SUGISHIMA, Masakazu)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号: 3 0 3 7 9 2 9 2

原田 二郎 (HARADA, Jiro)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号: 1 0 3 7 3 0 9 4

塚口 舞 (TSUKAGUCHI, Mai)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号: 4 0 6 2 4 0 9 4