

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05701

研究課題名(和文) 特殊ビリンの生体内検出とタンパク質ラベル化への応用

研究課題名(英文) in vivo detection and application to protein labeling of special bilins

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：特殊なヘム分解反応生成物(特殊ビリン)の高感度検出を目指し、新規蛍光タンパク質の開発に取り組んだ。既存の蛍光タンパク質の改変により、S置換型ビリルビンの選択的な検出に成功した。また、数種の特殊ビリンに対して、プレートアッセイによる大規模スクリーニングなどを行なった。一方で結核菌MhuDの分光測定を行い、歪んだヘムの構造と電子状態を解明した。ヘム黄色ブドウ球菌IsdGの新規生成物の構造も決定し、歪んだヘムの特殊な分解機構を明らかにした。さらに、菌体が生成するヘム代謝物を解析し、実際のin vivo反応の予備的な解明に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

S置換型ビリンの選択的な検出が可能な蛍光タンパク質の開発により、今後、生体内での挙動を解明する基盤技術が得られた。基質の立体的な歪みを利用し新たな酵素反応の機構には興味を持たれており、電子状態を含む詳細な酵素構造の解明や反応様式の確定は、今後の該当分野の研究進展に重要な知見を与えた。また、病原性細菌の増殖に重要な酵素反応における複数様式の発見は、新たな薬剤の開発が期待されるだけでなく、代謝物の直接決定の重要性も明らかにした。

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. Contrary to previous reports, reaction analysis on IsdG reveals, 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 ビリン 蛍光タンパク質 テトラピロール タンパク質ラベル化

1. 研究開始当初の背景

未知の生体内反応の発見は関連分野に新たな概念を提供し、その飛躍的な発展を促進する。近年、我々はヘム分解酵素の反応研究において、特殊なヘム開環生成物(特殊ビリン)を与える新反応群を発見した(図1 新反応①~③)。従来、ほ乳類型酵素(HO)による"BV"生成が生体内の唯一のヘム分解機構と信じられてきた(図1 通常反応)。しかし、①黄色ブドウ球菌 IsdG は"SB"に加えて"SB-CHO"を生成することが示唆されていた。また、②結核菌 MhuD は"MB"と"TP"を、さらに③従来型 HO も硫化水素(H<sub>2</sub>S)の存在下では"S-BV"を産生する。他グループからは嫌気的なヘム分解も報告され、「新規ヘム代謝反応」の研究は急激な広がりを見せている。我々は新反応①~③の特殊な機構を解明し、その生理的役割も提案してきた。しかし新反応の生体内挙動は不明であり、①, ②の主生成物すら明らかでないため、その生理機能は推測の域を出ない。新たなヘム代謝反応の生理的意義は何か? この問いに答え、ヘム代謝研究に真の革新をもたらすには、特殊ビリンの高感度検出法を開発し、生体内での主生成物や新反応の反応特性を決定する必要がある。通常型ビリン(図1 BV と BR)を含む蛍光タンパク質は良く知られているため、これらの改変による特殊ビリン選択的な蛍光タンパク質の創出が、高感度検出には有効と考えられる。また、「特殊ビリン FP」がほ乳類に存在しない特殊ビリンを選択的に結合する特性を利用すれば、生体直交性の高い新規タンパク質ラベル化技術の開発も可能と考えられた。

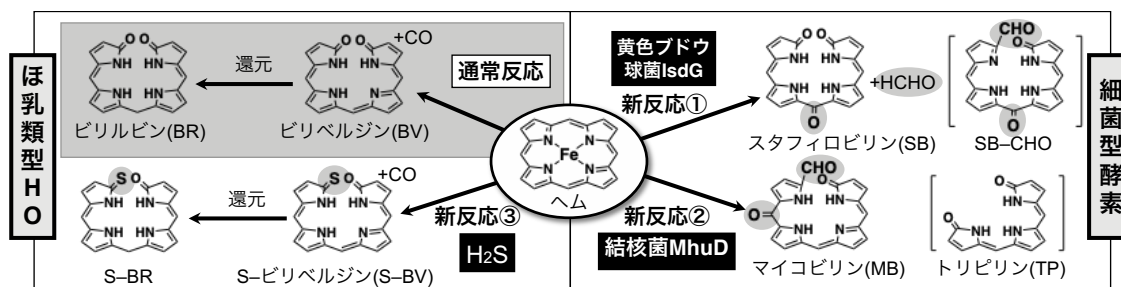


図1 新たなヘム分解反応と特殊ビリン

2. 研究の目的

前項の2つの観点から、特殊ビリン FP の開発をベースとし、生化学的な反応解析とケミカルバイオロジー的な応用を目的とする下記の研究を遂行する。

- A) 特殊ビリン FP の開発： 通常型ビリン (BV および BR) を結合する既知の蛍光タンパク質に対して部位特異的およびランダム変異による構造改変とスクリーニングを施し、特殊ビリンを選択的かつ速やかに結合し、強い蛍光を示すタンパク質の創出を目指す。
- B) 生体内反応の解析： 新反応①, ②については、生成する特殊ビリンの構造やその生成機構を決定する(図1 各2種の生成物)。さらに、特殊ビリン FP などを用いて菌体や動物細胞が産生する生成物の決定を目指す。これらの結果により、新反応の生体内での基礎的な反応特性を解明し、生体内挙動の解明も試みる。
- C) タンパク質ラベル化技術の開発： 非ほ乳類型特殊ビリンの投与によって動物細胞内の特殊ビリン FP の蛍光標識を試み、ラベル化技術を検証する。必要であれば、FP の反応特性や分光特性をさらに改良し、真に有用な技術を確認する。また、特殊ビリン産生酵素を共発現させることで、色素投与を必要としない“遺伝子コード型 FP”の開発も試みる。
- D) 金属の生体内動態を理解するために新規亜鉛プローブを開発し、オルガネラレベルでの定量を行う。

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。S 置換型ビリンと BV

異性体は化学合成によって調製する。他のビリンは大スケールでの酵素反応により調製し、HPLCなどで精製する。IsdGの新規生成物については、反応条件の最適化の後、構造決定に向けて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。反応機構の解明には上記の手法に加え、グローブボックス内での不安定中間体の反応解析も行う。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、 $O_2$ との反応を検討する。酸素源の決定には $^{18}O_2$ を用い、その取り込みをESI-MSの測定で検証する。

(2) 蛍光タンパク質としてはビリン類を蛍光団とするUnaGとsmURFPを主に用いる。両タンパク質の合成遺伝子を購入して発現系を構築し、His-tagなどを利用して簡便に精製する。精製タンパク質にビリン類を添加し、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。有望なタンパク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) S置換型ビリンの検出

まず、S置換型ビリベルジン (SBV) およびS置換型ビリルビン (SBR) の検出プローブの開発を試みた。SBR用の鋳型としては、ビリルビン (BR) を蛍光団とすることが知られている唯一の蛍光タンパク質UnaGを選定した。野生型UnaGはSBRを強く結合し、BR結合型に比べて最大蛍光波長は約70nmも長波長シフトしていた。しかし、SBR型の蛍光強度はBR型の約1/360に低下しており、SBRの選択的検出は困難であった。そこで、UnaGに35種の変異導入し、BR結合部位の周辺構造を改変したところ、N57E変異体ではSBR結合型UnaGの蛍光強度は変わらないものの、BR結合型の蛍光強度は約1/30に低下することを見出した。この結果、長波長領域でのSBR選択的な検出は可能となった(図2)。しかし、SBR-UnaGの蛍光強度を向上させる変異体は得られておらず、現時点ではSBRの高感度検出は難しいと考えられた。

そこでビリベルジン結合蛍光タンパク質smURFPを用い、S置換型ビリベルジン (SBV) の検出を試みた。SBV結合型の蛍光強度はsmURFPにおいても弱まったが、BVの1/3程度のシグナル強度が観測された。現時点ではBVに対する選択性に難が残るが、大規模な変異導入によるスクリーニングによってsmURFPのBV親和性の低下やSBV蛍光の長波長シフトなどを実現すれば、実用的なSBV選択的検出プローブの開発が期待される。

smURFPにおける大規模スクリーニング法を確立するため、天然型BV $\alpha$ の位置異性体であるBV $\beta$ および $\delta$ の蛍光検出を試みた。BV $\beta$ および $\delta$ はsmURFPに速やかに取り込まれるものの、共有結合の形成は見られず、蛍光もほとんど見られない。そこでPCR法によるランダム変異を導入したsmURFP遺伝子を、BV $\beta$ (または $\delta$ )を選択的に生じる特殊なヘム分解酵素とともに大腸菌で共発現させ、培養プレート上でのスクリーニングを行う手法を開発した。現時点では強い蛍光を発するクローンは得られていないものの、数万のコロニーの評価には成功している。また、大腸菌の膜外へのタンパク質発現にも一部成功しており、今後、スクリーニング系の拡大によって速やかな機能変換が期待される。

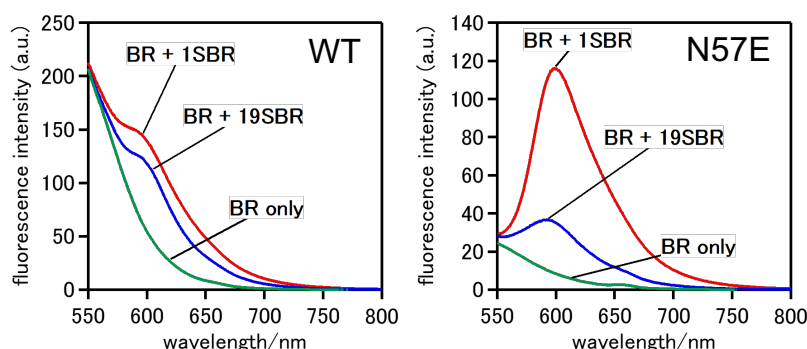


図2 ビリ結合型UnaGの蛍光スペクトル ( $\lambda_{ex} = 540nm$ )

## (2) smURFP を用いたマイコピリンの検出

smURFP は BV 類に対して良好な反応性を示したため、次にマイコピリン（結核菌の特殊ビリリン）との反応を検討した。その結果、smURFP と速やかに反応し、比較的強い蛍光が 470nm 付近に観測された。強い酸性条件（pH ~2）でも両者の複合体に相当するシグナルが ESI-MS で観測され、共有結合の形成が示された。一方、吸収スペクトルの変化様式から、マイコピリンと smURFP の結合様式はビリベルジンのものとは異なることも示唆されており、蛍光タンパク質の成熟過程を理解する上でも興味深いターゲットと考えられる。また、共有結合を利用したタンパク質ラベル化への応用も期待される。

smURFP はマイコピリン検出に適した蛍光タンパク質と考えられるため、ランダム変異導入による機能向上も試みた。smURFP 遺伝子を大腸菌に発現させ、マイコピリンを塗布した培養プレート上でスクリーニングを行うことで、約 30,000 コロニーを評価に成功している。今後、より大規模な探索や対象残基を絞り込んだ変異導入により、結核菌の簡易検査などに使用できる実用的なプローブ開発の可能性は高いと考えている。

## (3) 特殊なヘム分解酵素の構造と反応機構の解析

特殊ビリリンを生成する IsdG と MhuD は同族の酵素であり、ヘム（および、その分解中間体）を異常に歪めて結合することで、特殊な反応を誘起している。これらの反応の理解には、詳細な反応解析に加え、その立体構造の決定や電子状態の理解が重要となる。

そこで、EPR および共鳴ラマン散乱の測定により、結核菌 MhuD の特殊な構造の解析を試みた。これらの分光測定により、歪みの影響はヘム鉄の配位子には小さく、ポルフィリン面内の振動を大きく変化させることが示された。これらの結果は、従来の NMR 測定による提案と一致し、歪みによるメソ位の反応性向上がヘム分解の初段階において重要と考えられる。また、歪んだ金属錯体の特性については物理化学的な興味が持たれていたが、複雑化が予想される振動分光については報告例がなかった。今回、その測定と基本的な解釈を初めて報告したことで、関連分野の研究発展に大きな寄与があると期待される。

さらに、黄色ブドウ球菌 IsdG の反応を詳細に検討する中で、SB-CHO (図 1、ホルミル化 SB) と思われる生成物の大量調製に成功した。HPLC での単離後、ESI-MS, NMR などの測定によって構造を決定したところ、予想通り、開環部にホルミル基が保持された SB と同定された。SB-CHO はマイコピリンの位置異性体に相当し、構造の類似性から予想される通り、マイコピリンと同様の 1 原子 / 2 原子酸素添加反応が融合した特殊な機構で進行することが明らかとなった。また、脱ホルミル反応は速い還元条件で顕著になり、酸素活性化によって進行することも示された。以上の結果により、歪んだヘムを持つ 2 種の酵素の統一的な理解が進むとともに、生体内での生成物が SB と SB-CHO のどちらか、実際に検証が必要なことが示された。

現時点では両生成物を検出するための蛍光プローブは完成していないため、HPLC 分析による菌体由来のヘム代謝物の直接解析を試みた。ヘムを唯一の鉄源として黄色ブドウ球菌を培養し、培地由来成分を HPLC で分析したところ、SB と思われる生成物が検出されている。今後、培養スケールを上げ、LCMS や同位体ラベル化実験も組み合わせることで、その同定は可能と考えられる。また、ホルミル基の有無を見分ける蛍光プローブの開発にも期待される。

## (4) オルガネラ選択的な亜鉛イオンの蛍光プローブ

本研究では金属イオンの蛍光検出にも取り組んでおり、オルガネラ選択的な亜鉛イオンの蛍光プローブの開発にも成功した。従来の亜鉛プローブは細胞内で分解されやすかったり、pH 変化の影響が大きく、信頼性の高い結果が得られなかった。そこで pH 依存性が低く、化学的な安定性が高い低分子プローブを合成し、シグナル配列を含む HaloTag タンパク質に結合させることで、ミトコンドリアや小胞体、細胞質などのオルガネラにおける遊離亜鉛イオン濃度の決定に成功した。その結果、各オルガネラでの濃度の違いがタンパク質の品質管理機構とも関連していることが示され、細胞生物学的にも有用な情報が得られた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 R. Liu, T. Kowada, Y. Du, Y. Amagai, T. Matsui, K. Inaba, and S. Mizukami	4. 巻 7
2. 論文標題 Organelle-Level Labile Zn <sup>2+</sup> Mapping Based on Targetable Fluorescent Sensors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Sensors	6. 最初と最後の頁 748-757
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssensors.1c02153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Satoshi, Nambu Shusuke, Matsui Toshitaka, Fujii Hiroshi, Ishikawa Haruto, Mizutani Yasuhisa, Tsumoto Kouhei, Ikeda-Saito Masao	4. 巻 59
2. 論文標題 Unique Electronic Structures of the Highly Ruffled Hemes in Heme-Degrading Enzymes of <i>Staphylococcus aureus</i> , IsdG and IsdI, by Resonance Raman and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 3918 ~ 3928
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.0c00731	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kowada Toshiyuki, Watanabe Tomomi, Amagai Yuta, Liu Rong, Yamada Momo, Takahashi Hiroto, Matsui Toshitaka, Inaba Kenji, Mizukami Shin	4. 巻 27
2. 論文標題 Quantitative Imaging of Labile Zn <sup>2+</sup> in the Golgi Apparatus Using a Localizable Small-Molecule Fluorescent Probe	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1521 ~ 1531.e8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chembiol.2020.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kowada Toshiyuki, Arai Keisuke, Yoshimura Akimasa, Matsui Toshitaka, Kikuchi Kazuya, Mizukami Shin	4. 巻 60
2. 論文標題 Optical Manipulation of Subcellular Protein Translocation Using a Photoactivatable Covalent Labeling System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.202016684	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsui Toshitaka	4. 巻 299
2. 論文標題 Regulatory mechanism of formaldehyde release in heme degradation catalyzed by Staphylococcus aureus IsdG	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 104648 ~ 104648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.104648	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 松井 敏高	4. 巻 59
2. 論文標題 ヘム代謝の多様な分子機構	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 196 ~ 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.59.3_196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 松井 敏高
2. 発表標題 合成中間体を用いたヘム分解酵素の機能解明
3. 学会等名 令和三年度 新学術領域研究「高速分子動画」シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小和田俊行, 劉 熔, 杜 雨音, 松井敏高, 水上 進
2. 発表標題 細胞小器官内遊離Zn <sup>2+</sup> の濃度定量と動態観察を可能とする小分子蛍光プローブの開発
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小和田俊行, 荒井啓介, 吉村彰真, 松井敏高, 菊地和也, 水上進
2. 発表標題 共有結合型蛋白質ラベル化技術を利用した細胞内蛋白質二量体の光制御
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rong Liu, Toshiyuki Kowada, Toshitaka Matsui, Shin Mizukami
2. 発表標題 Quantitative imaging of labile Zn <sup>2+</sup> using organelle-localizable fluorescent probes
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuyin Du, Rong Liu, 小和田 俊行, 松井 敏高, 門倉 広, 稲葉 謙次, 水上 進
2. 発表標題 Visualization and quantification of labile Zn <sup>2+</sup> in the acidic subcellular compartments using a small-molecule fluorescent probe
3. 学会等名 第32回万有仙台シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小和田俊行, 渡邊朝美, 天貝佑太, 劉 熔, 山田 桃, 高橋泰人, 松井敏高, 稲葉謙次, 水上 進
2. 発表標題 細胞小器官局在化蛍光プローブの開発と細胞内遊離亜鉛の定量イメージング
3. 学会等名 第29回日本バイオイメージング学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松井敏高
2. 発表標題 ケージド中間体を利用した2種のヘム分解酵素の機構解明
3. 学会等名 令和二年度 新学術領域研究「高速分子動画」シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 間下 貴斗, 小和田 俊行, SARKAR S. Himadri, 高橋 泰人, 松井 敏高, 水上 進
2. 発表標題 光可逆的な蛋白質ラベル化を可能とするリガンドの開発
3. 学会等名 第31回万有仙台シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 間下 貴斗, 小和田 俊行, Himadri S. SARKAR, 高橋 泰人, 松井 敏高, 水上 進
2. 発表標題 標的タンパク質への親和性を光制御可能なフォトクロミックリガンドの開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 劉 熔, 小和田 俊行, 松井 敏高, 水上 進
2. 発表標題 Quantitative Mapping of Organellar Labile Zn <sup>2+</sup> via the Development of Hybrid Fluorescent Probes
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Matsui Toshitaka
2. 発表標題 Mechanism of formaldehyde release in the heme degradation by lsdG from Staphylococcus aureus
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC10) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松井敏高、齋藤正男	4. 発行年 2022年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 9
3. 書名 ヘムタンパク質の科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------