

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22510232

研究課題名（和文）ヘムオキシゲナーゼに見る環境変化の下での生存戦略__活性微調節機構の解明

研究課題名（英文）Heme oxygenase strategy for circumventing environmental changes_fine tuning of activity

研究代表者

右田 たい子 (MIGITA TAIKO)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：90159161

研究成果の概要（和文）：生活環境が異なる生物種が、生体内で様々な反応を進めるために必須のヘムという分子を数段階の反応で分解するヘムオキシゲナーゼ（HO）という酵素を共通に持っている。陸棲の哺乳動物ラットと海棲のトラフグ、陸棲植物のダイズと淡水棲のシアノバクテリアのHOタンパクを調製し、各酵素の反応がいくつかの反応条件を変えるときに受ける影響を比較した。その結果、特定の要因によって影響を受けるHOの反応過程がそれぞれの生物種によって異なることを発見した。

研究成果の概要（英文）：Different biological species, whose biological niches are different, commonly retain heme degradation enzyme, heme oxygenase (HO), where heme is indispensable for proceeding many in vivo reactions. We have prepared HOs from a land mammalian, rat, marine puffer fish, a land plant, soybean, and a freshwater cyanobacterium and compared their heme degradation activity under different reaction conditions. As a result, we have found that the HO from different origin is affected at different reaction stages under respective reaction conditions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学、生物分子科学

キーワード：酵素活性の微調節・酸素消費の速度論解析・酸性化環境への適応

1. 研究開始当初の背景

(1) 人間活動による化石燃料由来の二酸化炭素(CO₂)の過剰放出によって、地球環境が急激に変化し多様な生物の生命を脅かし始めている。温暖化により水棲の生物は溶存酸素量の減少にさらされ、同時に水環境に溶け込む

二酸化炭素の増加に起因する水素イオン濃度の増加による酸性化にも脅かされている。
(2) さまざまな生物種が、生育環境の変化によってどのような影響を受けるかを、分子レベルでも明らかにすることが緊急の課題になっている。

(3) 研究代表者は、ほとんどの生物種が共通に保有し、その欠如は致命的な結果を引き起こすヘムという分子をリサイクルする酵素であるヘムオキシゲナーゼ(HO)が、生物種によって独特の微調節を行っていることを見出していた。HO 反応では酸素分子と、分子内での水素イオンの移動、およびタンパク同士の相互作用による電子の供給が必要なため、酸素濃度や反応場(水溶液環境)の水素イオン濃度の影響を受けやすい。よって、HO を環境応答評価の指標酵素とすることにした。

2. 研究の目的

低酸素条件や高濃度の二酸化炭素が、生命体に普遍的でその欠損は致命的であるHOという酵素の活性にどのように影響を与えるのかを検討し、その結果をもとに、タンパク質が作る反応場を変えることでこれらの環境因子の影響をどのように回避できるかを明らかにする。これまでの研究で解明されているヘム分解の分子化学の知識をさらに発展させながら、環境変化に対する酵素の適応の具体的な方法を明らかにし、環境変化への対応策のカギを探ることが本研究の目的である。生物の環境適応は細胞以上のマクロな系で調べるのが一般的であるが、多くの化学反応が統合されて成り立っている生命系をまるごと対象にした実験の結果とその解釈は、単純で短絡的なものに帰結されやすい。これに対して、その化学反応を支える酵素での環境応答は普遍性があり、しかも分子レベルでの詳細で正確な結論を得ることが可能である。

3. 研究の方法

(1) 異なる生活環境で生きる生物種由来の酵素を遺伝子工学の方法で多量に得る。すなわち哺乳動物ラット、魚類のトラフグ、高等植物のダイズ、淡水産シアノバクテリア(藍藻)、髄膜炎菌由来のHO 酵素を対象とした。他に、HO 反応に必要な、電子伝達タンパク、シトクロムP450還元酵素、フェレドキシン、フェレドキシン還元酵素も大腸菌による組み換えたんぱくとして調製する。

(2) 遺伝子情報を基に新規に合成された魚類酵素のトラフグHO1について、ヘム複合体の構造・電子状態およびヘム分解活性についての基本的なデータを、吸収スペクトル法、電子スピン共鳴法などによって取得する。

(3) 蛍光消失時間式マイクロ酸素濃度計によって、HO 反応で消費される酸素濃度を時間依存的に測定する装置を組み立て、それぞれのHO によるヘム分解反応速度への酸素濃度の影響を、速度論解析する。

(4) 二酸化炭素濃度の溶解による影響を測定するために、水素イオン濃度が異なる条件の下でのHO 反応を、分光法を用いて測定する。

(5) 電子伝達タンパクとHO との相互作用が、周りの水素イオン濃度によってどのような影響を受けるかを、分光法による速度論解析で測定する。

(6) 酸素濃度や二酸化炭素濃度の顕著な影響

が見られたタンパクを中心に、数段階で起こるヘム分解反応(逐次反応)のどの段階がどのように影響を受けるのかを精査し反応制御に強くかかわる酵素の残基の推定および電子伝達タンパクとの相互作用への影響を調べる。

(7) HO 反応の最初の活性種であるオキシヘムの自動酸化速度を各HO について比較し、酸素利用環境が異なる生物種によるHO の酸素親和性の違いを比較する。

(8) それぞれのHO 反応の進行を、質量分光法で、基質ヘム、中間体(ヘム誘導体)、生成物ビリベルディンの質量/電荷を時間依存的に検出し、速度論解析を行い、HO による逐次反応の各段階の速度論的相違を明らかにし、(5)の結果との比較を行う。

以上の結果を総合し、それぞれの生物種由来のHO が示す環境要因変化への応答の違いを、酵素活性部位の構造や、タンパクの表面電荷部位と比較し、その理由を明らかにする。

4. 研究成果

(1) HO 反応の水素イオン濃度依存性

HO によるヘム分解反応速度は、pH 6~9.5の範囲で大きく変化した。図1にはフグ(TfrHO1)とラット(ratHO1)の酵素について、人為的還元剤(アスコルビン酸)と天然の還元系(NADPH-FNR-Fd)を用いた場合の結果を示した。比較的還元力が弱いアスコルビン酸の下での反応では、フグとラット酵素では、酸性側で速く、塩基性側で遅いという共通の傾向がみられたが、ダイズ酵素では、酸性側で遅く、水素イオン濃度の減少と比例して直線的に反応速度が上昇した。HO 反応の開始は鉄(III)-ヘムが還元され酸素分子が結合することによるので、この傾向は、ヘム-HO 複合体中の鉄(III)イオンの酸化還元電位が、反応速度を決定することを示唆する。アスコルビン酸の還元力は塩基性側でより増大するので、ダイズ酵素で観測された傾向はこれと一致する。一方、ヘム-HO 複合体ではヘム鉄(III)上に水分子が緩く配位して高スピン状態をとっているが、塩基性側で水酸化物イオンとなり低スピン型ヘムを形成する。この状態は

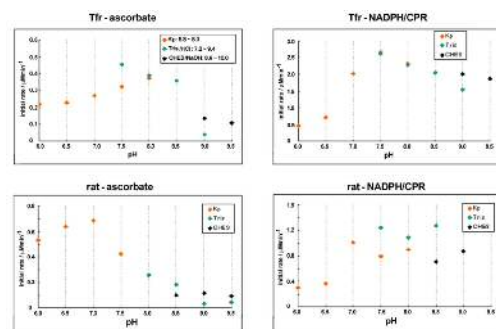


図1. ヘム分解初速度のpH依存性。

安定で、ヘム鉄(III)の還元を抵抗し、よって酸素分子の配位を妨げる。フグやラットでみられた塩基性側での反応速度の低下はこれが主要因であると考えられる。一方、ダイズ酵素-ヘム複合体では、後述するようにヘム鉄の還元が相対的に速く、よってヘム鉄(III)の酸化還元電位が高いと推測され、そのためにアスコルビン酸の還元力に比例して反応速度が上昇すると理解できる。一方で、電子伝達タンパクによるNADPHからの電子輸送と共役したHO反応では、フグとラットHOでは酸性側で遅く塩基性側で速い、またダイズHOでは酸性~塩基性への変化で直線的に反応速度が減少する、といういずれもアスコルビン酸還元系による反応と正反対の結果を得た。NADPH-電子伝達タンパク(CPRまたはFNR-Fd)の還元力はヘム鉄の還元には十分であるので、この違いは電子伝達タンパク-HOタンパク間の相互作用が水素イオン濃度によって影響を受けるためと考えるのが自然である。ラットとフグHOはヘム結合部位の近くに塩基性アミノ酸が集合しており、ここが、電子供与体CPR表面の酸性アミノ酸の集合部位と相互作用することで、電子を伝達する。酸性側ではHOのCPR結合部位の正電荷が増大し、CPRとの結合が強くなるが、これが逆に電子伝達の代謝回転を低下させていると理解できる。ダイズHOはフグやラットHOとはアミノ酸配列が大きく異なっており、塩基性側で正電荷を失うことで大きく電子伝達効率を下げるものと考えられる。よって、細胞内の環境がより酸性に傾くような変化では、ラットやフグのHO活性は大きく下がるが、ダイズのHO活性にはむしろプラスであることが明らかになった。

(2) 酸素化型ヘム-HO複合体の自動酸化速度

HOによるヘム分解はヘム鉄(III)イオンが還元され、周囲にある酸素分子が鉄(II)上で結合することで開始する。よってこのオキシヘムの安定度がヘム分解活性にどのように影響するかを調べた(図2)。図から明らかのように、生物種によってオキシヘム-HO複合体の安定度は大きく異なる。自動酸化速度はGmHO1(5.5) > SynHO1 > TfHO1 > ratHO1(1)

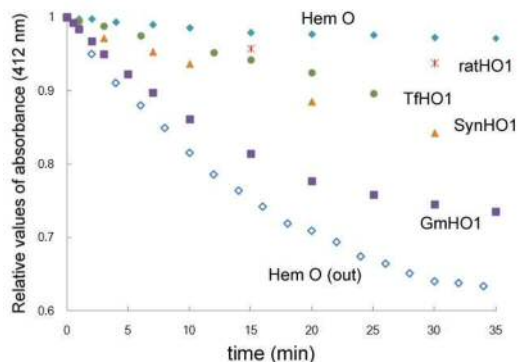


図2 oxyheme-HO複合体の自動酸化。

の順番であり、オキシヘムの安定度が、HOの遠位タンパク残基との相互作用に依存することを、分子構造を基に説明することができた。

(3) UV-VIS分光法によるHO逐次反応解析

ヘムおよびそのHO反応過程で生成する誘導体の特性吸収に注目して、各HOによる中間過程の進行を比較した。その結果以下のような知見が得られた。

- ① ラットとフグ酵素の比較では、フグHOの方がNADPHの酸化、オキシヘム分解速度、ベルドヘム分解速度、ビリベルディン生成速度のいずれも速い。
- ② シアノバクテリアとダイズ酵素の比較では、NADPHの酸化とオキシヘム分解速度はダイズHOが速いが、ベルドヘム分解速度とビリベルディン生成速度はシアノバクテリアHOの方が速い。

これらの知見をより定量的に確認するため、さらに以下の実験を行った。

(4) ストップフロー(迅速混合)法によるヘム-HO複合体の酸素化反応解析

反応開始から0.1秒間隔で8秒間測定した吸収スペクトルを重ね合わせたもの、および鉄(III)ヘムと鉄(II)ヘムのソーレーバンドおよび鉄(II)ヘムの可視吸収バンドの時間変化をシアノバクテリアおよびダイズHO反応について示した(図3)。また、同様の解析をオキシヘム生成についても行った。またラットおよびフグ酵素についても同様に行った。その結果、いずれのHOについても鉄(III)ヘムの消失速度と鉄(II)ヘムの生成速度について良い対応がみられ、ラットに対してフグが3倍速く、ダイズに対してシアノバクテリアが1.2倍速いことがわかった。さらにオキシヘムの生成速度はラットに対してフグが1.5倍速く、ダイズに対してシアノバクテリアが1.1倍速いことが示された。興味深い点は、フグで、ヘム鉄の還元速度の割にオキシヘムの生成速度が速くないことで、これはフグHOでヘムへの酸素分子の接近についてラット

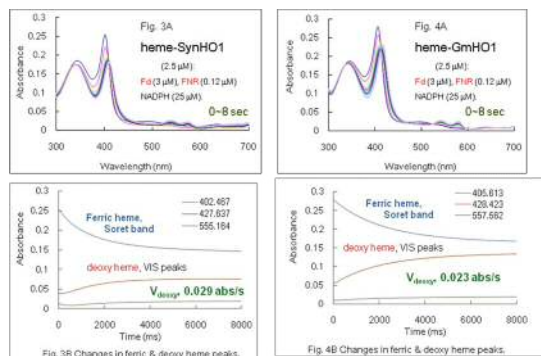


図3 シアノバクテリア(SynHO1)とダイズ(GmHO1)HOの高速反応過程の解析。

は異なる立体障害的要素があることを示唆する。ヘムポケット部位のアミノ酸配列がほぼ同一のフグとラットの酵素でこのような明確な違いがあることは、オキシヘムの安定性の違いと合わせて、特筆すべき点である。(5)エレクトロスプレーイオン化-質量分析法(ESI-MS)による速度論解析

H0 複合体中のヘムおよびその反応中間体の質量/電荷ピークを反応時間依存的に直接測定することで、基質ヘムの分解速度、中間体の生成・分解速度、及び生成物ビリベルディンの生成速度を求めた(図4上)。その後、H0 反応をベルドヘムの生成まで(前半)と、

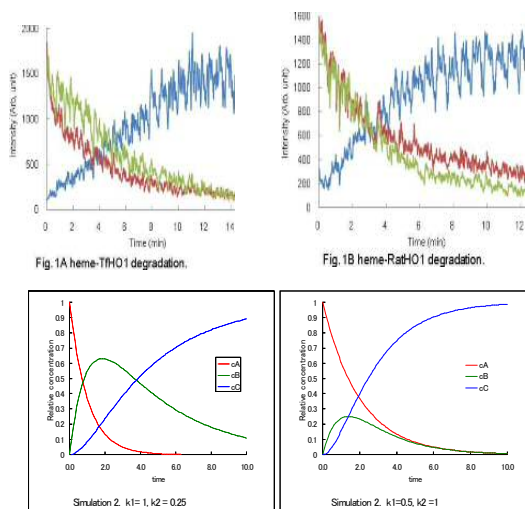


図4 フグ H01(左)およびラット H01(右)によるヘム分解(茶)、ベルドヘム生成(緑)、およびビリベルディン生成(青)と逐次反応モデルによる計算結果。

その後の最終生成物ビリベルディンまで(後半)の2段階の逐次反応とみなして計算した結果(図4下)と合わせると、フグとラットの反応では、前半・後半の相対的な速さが異なり、フグ H0 では前半が、ラットでは後半が速いことが示唆される。シアノバクテリアとダイズ H0 についての同様の実験・解析からは、シアノバクテリアではフグと同様前半が速く、ダイズでは後半が著しく遅いという結果が得られた。これは、ストップフロー法で得られた、フグやシアノバクテリア H0 反応ではヘムの還元とオキシヘムの生成が、対応するラットやダイズ H0 の反応より速い、という結果と一致する。

(6)酸素消費速度

蛍光消光型微小酸素電極を用いて、H0 によるヘム分解の進行を溶液中の酸素濃度の減少速度で評価した。図5のように、反応溶液中の溶存酸素量は時間とともに減少し、反応の進行をよく反映する結果が得られた。H0 反応を酸素濃度の減少速度で評価したという報告はこれが最初である。図5に、シアノバ

クテリアとダイズ H0 によるヘム分解反応での酸素消費曲線を、空気飽和溶液中と低酸素溶液中での反応について示した。

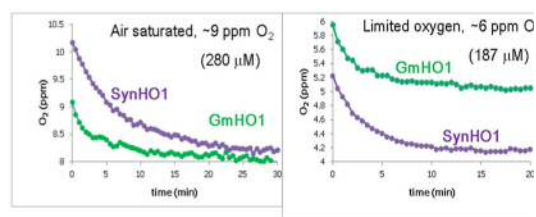


図5 シアノバクテリアおよびダイズ H01 反応における酸素消費曲線。

ダイズでは反応初期に酸素消費が一気に進み、シアノバクテリアではより緩やかに進行し、この傾向は低酸素溶液中でも同様であることがわかる。H0 によるヘム分解では、ベルドヘム中間体までに2分子の酸素が、後半で1分子の酸素が消費されるので、2段階逐次反応近似による解析で、ダイズ H0 反応は前半が相対的に速いという結果と一致する。フグとラット H0 の比較でも、同様の結果が得られた。低酸素条件下では、シアノバクテリアとダイズ H0 に比較して、フグとラット H0 の反応の違いがより大きくなる傾向が認められた。

(7)結論

本研究を通して、異なる生物種由来の酵素、ヘムオキシゲナーゼによるヘム分解反応は速度論的に明確な違いを示し、それはアミノ酸配列の類似性/相違、あるいはヘム結合部位の結晶構造のわずかな違いから予想されるよりはるかに大きいものであることが確認された。これらの違いの原因となる因子は、H0 の表面電荷分布の相違による電子供与体タンパクとの相互作用の違いが引き起こす電子伝達速度と、オキシヘムの安定性、およびヘムポケット遠位のアミノ酸残基による中間体ベルドヘムの安定化、などであることが示された。水棲の生物の H0 は陸棲の生物の H0 と比較して、電子伝達速度を速め、限られた酸素分子を有効に利用できるように発達していることを実証できた。

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)

[学会発表] (計12件)

- ① 右田たい子・高田さゆり・松井敏高・斎藤正男、”Heme oxygenase reaction under restricted oxygen concentration”, Gordon Research Conference, Metals in Biology: 2013年1月23日、ヴェンチュラ(米国)。
- ② 右田たい子・高田さゆり、「酵素反応の環

- 境応答一ヘムオキシゲナーゼ活性の酸素濃度依存性」、電子スピンスイエンズ学会第51回年会、2012年11月20日、札幌コンベンションセンター（札幌市）
- ③ 高田さゆり・右田たい子、” Strategy of a variety of organisms for the fine-tuning of heme oxygenase: stabilization of the oxy-heme intermediate”, 第50回日本生物物理学会年会、2012年9月24日、名古屋大学東山キャンパス（名古屋市）。
- ④ 右田たい子・高田さゆり・松井敏高・斎藤正男、「異種生物種由来ヘムオキシゲナーゼの活性を支配する因子」、第39回生体分子科学討論会、2012年6月8日、東北大学片平さくらホール（仙台市）
- ⑤ 右田たい子・高田さゆり・植高梢・酒井竜治、” Electron transfer via protein-protein interaction correlates with the auto-oxidation rates in heme oxygenase reactions”, Gordon Research Conference, Metals in Biology: 2012年1月24日、ヴェンチュラ(米国)。
- ⑥ 高田さゆり・佐藤道比古・張旭紅・右田たい子、「反応環境に応答したヘムオキシゲナーゼによるヘム分解の微調整」、日本生物物理学会第49回年会、2011年9月18日、兵庫県立大学姫路書写キャンパス（姫路市）。
- ⑦ 右田たい子、” Fine tuning of enzymatic activity of heme oxygenase from an aquatic animal, Takifugu rubripes”, International Conference on Bio-inorganic Chemistry, ICBIC15, 2011年8月10日、バンクーバー（カナダ）。
- ⑧ 右田たい子、「ESRでみる酵素への変異導入の影響と活性変化」、第15回ESRフォーラム研究会、2011年7月17日、大学コンソーシアム大阪（大阪市）
- ⑨ 高田さゆり・張旭紅・佐藤道比古・右田たい子、「ヘムオキシゲナーゼ反応のプロトン・酸素濃度依存性」、第38回生体分子科学討論会、2011年6月23日、筑波大学学生会館（つくば市）。
- ⑩ 高田さゆり・植高梢・右田たい子、「フグヘムオキシゲナーゼ活性の塩基性環境への順応」、日本生物物理学会第3回中国四国支部大会、2011年5月8日、広島大学学士会館（東広島市）。
- ⑪ 右田たい子、” Protein control of the heme degradation by heme oxygenase: Effects of environmental factors “, Gordon Research Conference, Metals in Biology: 2011年1月30-2月4日、ヴェンチュラ（米国）。

- ⑫ 右田たい子・徳田真人・原口明子、「異種生物種由来酵素の反応場の相違からみたヘムオキシゲナーゼ反応におけるヘム分解の微調整」、日本生物物理学会第2回中国四国支部大会、2010年5月8日、松山大学薬学部（松山市）。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

右田 たい子 (MIGITA TAIKO)
山口大学・農学部・教授
研究者番号：90159161

(2) 研究分担者

小崎 紳一 (OZAKI SHINICHI)
山口大学・農学部・教授
研究者番号：40280581
右田 耕人 (MIGITA KOUTO)
山口大学・農学部・准教授
研究者番号：90116757
(H22→23)

(3) 連携研究者

佐藤 道比古 (SATO MICHHIKO)
山形大学・医学部・准教授
研究者番号：00135344

張 旭紅 (ZHANG XUHONG)
山形大学・医学系研究院・助教
研究者番号：10292442

様式C-19



科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書