

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550186

研究課題名(和文)ヘムオキシゲナーゼ研究の新展開

研究課題名(英文)Paradigm shift in enzymatic heme degradation

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) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では新たなヘム代謝反応に注目し、その探索および生体内での進行の実証を試みた。従来型ヘム分解酵素(HO)に関しては、最近我々が発見した新反応について、その新規生成物を動物細胞から直接検出することで生体内での進行を証明した。さらに、近年発見されたLsdG型酵素に関しては、黄色ブドウ球菌LsdGおよび結核菌MhuDの反応を解析し、それぞれ特殊な生成物を与えることを見いだした。特に、いずれの酵素もCOを生成しなかったことから、HOとは反応機構が全く異なり、その主因はヘムの異常な歪みであることも示した。以上の成果により、ヘム代謝反応の多様性を明らかにし、ヘム代謝研究の新たな局面を切り開いた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have examined novel type reactions of enzymatic heme degradation. A recent in vitro study has revealed that a canonical heme degrading enzyme, heme oxygenase (HO), produces a new heme catabolite under special reaction condition. The new catabolite was successfully detected from mammalian cell culture, suggesting that the novel HO reaction can proceed in living organisms. On the other hand, newly-found LsdG-type enzymes degraded heme into unique reaction products through distinct reaction mechanisms. The mechanistic difference from the well-studied HO reaction appears to be caused by unusual non-planarity of heme bound to the LsdG-type enzymes. These diversity shed new light on enzymatic heme degradation to stimulate biological research exploring new physiological functions as well as its mechanistic studies.

研究分野：生物無機化学

科研費の分科・細目：複合科学・生体関連化学

キーワード：ヘム代謝 酸素活性化 反応機構 病原性細菌 ホルムアルデヒド

### 1. 研究開始当初の背景

ヘム(鉄-ポルフィリン錯体)は血色素として知られ、その代謝反応は古くから精力的に研究されてきた。1970年頃には肝臓などのミクロゾーム画分にヘム分解活性が発見され、1978年にはヘムオキシゲナーゼ(HO)が単離・同定された。HOは唯一知られたヘム分解酵素であり、ヘムを鉄イオン・一酸化炭素(CO)・ビリベルジンに分解する。当初は高等動物のヘム代謝を担う酵素とされてきたが、最近になってCOやビリベルジンが細胞内シグナリングや抗酸化作用を持ち、血圧調整・神経細胞保護・細胞死などに深く関与する事も示された。また、植物や細菌でもHOの存在が明らかになり、特に病原性細菌(大腸菌O157、ジフテリア菌など)では宿主ヘムからの鉄イオン獲得に重要であり、感染・増殖にも重要なことが示された。これらの分解酵素は生物種や生理機能が違っててもほぼ同じ酵素であり、反応機構・生成物も共通している。

HO反応は生理的に重要なだけでなく、その極めて特異な反応機構にも興味を持たれてきた。HO反応は3段階の酸素添加反応で進行するが、各段階で必要な酸素活性化は基質であるヘム自身が行っている。全14ステップにも及び複雑なHO反応は、代表者を含む多くの研究グループによって研究され、既にほとんどの反応過程が解明された。このため、ヘム分解反応の研究は一段落したかに思われたが、下記の最新の知見はヘム代謝研究の新たな局面を予感させていた。

第一の知見は、HOにおける新規ヘム代謝反応の発見である。申請者は、特定の反応条件下、HOがビリベルジンではない生成物を与える事を見いだした。さらに新反応の誘起がHO活性を大きく変化させ、その生理機能に多大な影響を与えることも示した。しかし、その生体内での進行は明らかでなく、細胞レベルでの検証が急務であった。また、従来の反応研究に使われてきた可溶性HO(C末端欠損型)ではなく、還元酵素などとの相互作用がはるかに強い全長HOでの研究も望まれていた。

第2の知見は新型ヘム分解酵素の発見である。近年、病原性細菌の鉄獲得機構の研究から、新たなヘム分解酵素ファミリーが相次いで発見された。なかでも黄色ブドウ球菌から発見されたIsdG型酵素は、その異常な構造(酵素に結合したヘムの大きな歪み)に注目されていた。IsdG型酵素もHOとは異なる生成物(スタフィロピリン)を与え、特異なヘム分解機構を持つ可能性が指摘されていたが、その概要すら明らかでなかった。

以上の知見は、生体内におけるヘム代謝は様々な機構で行われていることを示唆している。新反応の発見と解明はヘム代謝研究のパラダイムシフトを起こしうると考え、本研究に着手した。

### 2. 研究の目的

本研究は、ヘム分解酵素の新たな反応に注目し、精製酵素を用いた反応機構や構造の解明、さらには細胞レベルでの反応解析により、ヘム代謝研究の新局面を切り開くことを目的とする。特に注目すべきは下記の3点である。

(1) 従来型HOの新反応について、その機構解明とともに、動物細胞からの新規生成物検出を試み、生体内での進行を証明する。

(2) HO、および、その還元酵素(CPR)の全長型タンパク質を調製し、より生体内に近い状態での反応解析を行う。

(3) IsdG型酵素の反応を詳細に検討し、ヘムの歪みによる反応機構の変化などを検証する。さらに、各種分光学的測定によってIsdG型酵素の活性中心構造を詳細に検討し、機能との相関を解明する。

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) 種々の動物細胞(RAW264.7など)にヘムなどを加え、新HO反応の生成物の検出を行う(図1-①)。培地中に放出されるヘム代謝産物を固相抽出によって回収・濃縮し、HPLCで分析する。新規生成物が得られれば、様々な反応条件を検討し、精製酵素で観測されていると同様の活性変化などが見られるかを確認する。以上の結果から、新HO反応の生体内での進行を実証し、生理機能に与える影響を明らかにする。

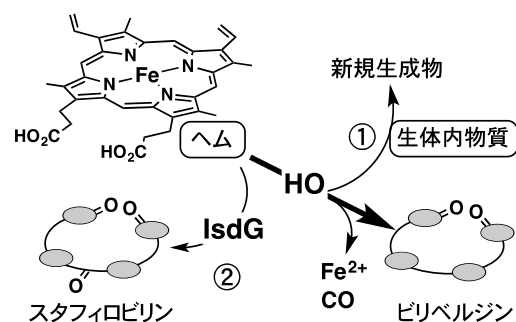


図1 従来型HO反応と新規ヘム代謝反応

(2) 全長型酵素については、まず遺伝子工学的手法でHOおよびCPRの全長型発現遺伝子を作成する。発現や可溶性条件を最適化し、高質な全長型酵素群を調製する。得られた酵素を用いて、より生体内に近い条件でのHO反応(新反応を含む)を検討し、欠損型可溶性酵素との違いを明らかにする。

(3) IsdG型酵素に関しては、黄色ブドウ球菌由来のIsdG(図1-②)、および、結核菌由来のMhuDについて詳細な反応解析を行う。新規生成物はHPLCを用いて単離し、その構造を質量分析やNMRなどを用いて決定する。また、共鳴ラマンやEPRなどの分光測定により、

IsdG 型酵素の溶液構造についても検討する。

#### 4. 研究成果

(1) RAW264.7 (マウス・マクロファージ由来) について、培養条件や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の誘導条件、反応条件などを最適化することで、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 新反応による新規生成物の検出を試みた。新規生成物はビリルビン (通常のヘム代謝産物) と同様、細胞から培地中に排出されていた。培地からヘム代謝物を固相抽出し、HPLC などで分析したところ、新規生成物 (2 種の異性体) が明瞭に検出された (図 2)。新規生成物は HeLa や HepG2 など、他の細胞株においても検出され、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 新反応は様々な細胞内で進行することが示された。新規生成物の収量は低酸素状態で増加する傾向にあり、精製酵素系での反応解析の結果と一致した。

これらの結果は新 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反応が生体内でも進行していることを示すとともに、その生体内での挙動は精製酵素系での知見に基づいて予測可能なことを示唆している。今後、その特性を詳細に検討することにより、新反応が持つ生理的意義を明らかにできると期待される。また、新規反応が誘起されるよりも穏和な条件で、通常代謝産物の生成量が大きく減少するという現象も見いだした。その詳細な機構は不明であるが、酵素研究から生理機能を議論する上で、細胞レベルでの反応解析を行う重要性を如実に示す例と考えている。

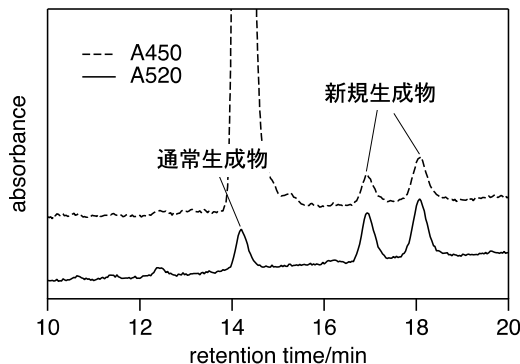


図 2 新規ヘム代謝産物の直接検出

(2) ヒト由来の誘導型および構成型全長ヘムオキシゲナーゼ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-1 および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-2) に関して、種々の発現系を構築した。両酵素とも大腸菌中で十分量が発現し、これらの可溶性にも成功した。全長 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-1 については精製条件も検討し、比較的高純度の全長酵素を得ることも成功した。界面活性剤で可溶化した全長 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-1 はヘムを強く結合し、その分光学的性質は可溶性 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-1-ヘム複合体のものとはほぼ同等であった。さらに全長 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-1 は可溶性 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-1 とほぼ同等のヘム分解活性を示した。これらの結果は、全長および可溶性酵素の活性中心構造に大きな違いがないことを示している。また、ヒト由来の全長 CPR (還元酵素) および、全長 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と全長 CPR をそれぞれの膜結合部位で連結させた融合タンパク質の発

現系を構築した。

さらなる反応解析および構造解析 (特に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-CPR 複合体の調製・結晶化) については東日本大震災の影響、並びに、次項の IsdG 型酵素研究の重要性が増したため、中断せざるを得なかった。しかし、上記の研究成果により、今後の全長酵素に関する研究に必要な、基礎的な準備を終えることができた。

(3) IsdG 型酵素については、まず、結核菌由来 MhuD の構造を検討した。MhuD は活性中心に 2 分子のヘムを結合できる特徴を持つが、この di-heme-MhuD 複合体にヘム分解活性は見られなかった。活性型は monoheme-MhuD 複合体であるが、その結晶構造は報告されていない。そこで、共鳴ラマンおよび EPR スペクトルによって溶液構造を検討したところ、monoheme-MhuD は His 配位のヘムに特徴的なシグナルを与え、変異実験の結果と合わせ His75 が軸配位子と同定された。黄色ブドウ球菌 IsdG でも相当する His77 が軸配位子であるため、両者の基本的な構造は似ていると考えられる。また、共鳴ラマンスペクトルの特徴も IsdG と類似していることから、monoheme-MhuD でも同様にヘムが大きく歪んでいると予想された。

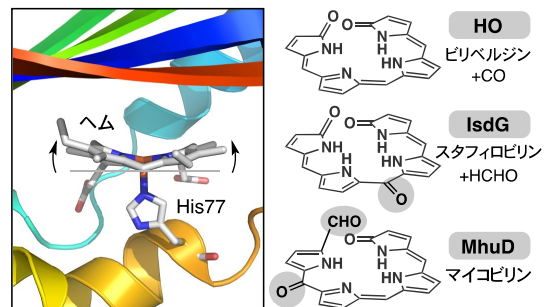


図 3 黄色ブドウ球菌 IsdG のヘム近傍構造 (左) と各ヘム分解酵素の生成物 (右)

次に、MhuD によるヘム分解反応を検討したところ、ビリルジン (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成物) やスタフィロピリン (IsdG 生成物) とは異なる新規生成物 (マイコピリン) が得られた。単離したマイコピリンの構造を質量分析および NMR によって決定したところ、開裂部の炭素がアルデヒド基として保持されているという驚くべき構造であった (図 3)。この構造から予測される通り、MhuD によるヘム分解反応では CO がほとんど検出されず、CO を遊離しないヘム分解の初めての例となった。以上の結果から、MhuD の反応機構は従来型 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> のものとは大きく異なっており、ベルドヘムなどの鍵中間体を経由していないことが明示された。劇的な機構変化の要因はヘムの異常な歪みと考えられ、他の IsdG 型酵素も特殊な機構でヘムを分解すると予想された。

しかし上記の提案は、黄色ブドウ球菌 IsdG の生成物がスタフィロピリンであることと矛盾すると思われた。スタフィロピリンからは開裂部の炭素が脱離しており、CO の生成が

仮定されていた。しかし、IsdG における C1 生成物を定量した結果、CO は微量しか生成しておらず、主生成物はホルムアルデヒド (HCHO) であることが分かった (表 1)。MhuD と同じ“アルデヒド”の生成は、IsdG と MhuD の機構の類似性を示唆しており、共通する“ヘムの歪み”で誘起されていることを強く支持する。今後、IsdG 型酵素の反応機構について、特に歪みによる反応変換メカニズムの解明が望まれる。

表 1 各ヘム分解酵素による C1 生成物 (%)

	CO	HCHO	HCOOH
rHO-1	106 ± 4	4 ± 2	1 ± 1
MhuD	1 ± 1	4 ± 1	5 ± 1
IsdG	14 ± 2	82 ± 1	16 ± 1

化学的な重要性に加え、IsdG 型酵素の特殊な反応生成物 (マイコピリンやスタフィロピリン、HCHO) が、特別な生理機能を持つ可能性も指摘される。さらに、CO を発生しないこと自体も、病原性細菌には重要かもしれない。結核菌では、CO を外部シグナルとして捉え、自己の休眠状態への変化を誘起することが知られている。今後、生物学的な研究を進めることで、病原性細菌におけるヘム代謝の新たな役割解明に繋がるとともに、新たな薬剤の開発などにも期待される。

以上の研究により、ヘム代謝には多様な反応が存在し、生体内でも進行することが強く示唆された。これらの発見によりヘム代謝研究は新たなステージに入り、新反応の機構解明や生理機能への影響の検証、さらなる新反応の探索といった多くの研究が、今後盛んに行われるものと期待される。

## 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 8 件)

松井敏高, 歪みで誘起される新たなヘム分解反応. *生物物理* (2014), 54, 104-105、査読有り

T. Matsui, S. Nambu, Y. Ono, C. W. Goulding, K. Tsumoto, M. Ikeda-Saito, Heme degradation by *Staphylococcus aureus* IsdG and IsdI liberates formaldehyde rather than carbon monoxide. *Biochemistry* (2013), 52, 3025-3027、査読有り

S. Nambu, T. Matsui, M., C. W. Goulding, S. Takahashi, M. Ikeda-Saito, A new way to degrade heme: The *Mycobacterium tuberculosis* enzyme MhuD catalyzes heme degradation without generating CO. *J. Biol. Chem.* (2013), 288, 10101-10109、

査読有り

M. Unno, T. Matsui, M. Ikeda-Saito, Crystallographic studies of heme oxygenase complexed with an unstable reaction intermediate, verdoheme. *J. Inorg. Biochem.* (2012), 113, 102-109、査読有り

T. Uchida, Y. Sekine, T. Matsui, M. Ikeda-Saito, K. Ishimori, A heme degradation enzyme, HutZ, from *Vibrio cholerae*. *Chem. Commun.* (2012), 48, 6741-6743、査読有り

M. Watanabe-Matsui, A. Muto, T. Matsui, A. Itoh-Nakadai, O. Nakajima, K. Murayama, M. Yamamoto, M. Ikeda-Saito, K. Igarashi, Heme regulates B-cell differentiation, antibody class switch, and heme oxygenase-1 expression in B cell as a ligand of Bach2. *Blood* (2011), 117, 5438-5448、査読有り

海野昌喜, 松井敏高, 齋藤正男, 金属タンパク質の X 線結晶構造解析: ヘム分解酵素の反応中間体. *日本結晶学会誌* (2011), 53, 213-218、査読有り

松井敏高, ヘム分解における酸素活性化: 活性酸素の有効利用. *生物物理* (2011), 51, 132-133、査読有り

〔学会発表〕(計 20 件)

T. Matsui, *Unique reaction mechanisms of IsdG-type heme degrading enzymes from pathogenic bacteria*, Sixth Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations, Japan, Okazaki (2013.11.27)

T. Matsui, S. Nambu, Y. Ono, S. Takahashi, M. Ikeda-Saito, C. W. Goulding, K. Tsumoto, *Heme Degradation without Releasing CO: Unique Reaction Mechanism of IsdG-type Heme Degrading Enzymes*, International Conference on Bioinorganic Chemistry (ICBIC16), France, Grenoble (2013.7.24)

松井敏高, 歪みで誘起される新たなヘム代謝反応, 第 13 回 日本蛋白質科学会年会, 鳥取 (2013.6.14)

松井敏高, 南部周介, 小野由香莉, C. W. Goulding, 高橋聡, 秋山公男, 齋藤正男, *新規 IsdG 型ヘム分解酵素の構造と反応機構*, 第 13 回 日本蛋白質科学会年会, 鳥取 (2013.6.13)

松井敏高, ヘム代謝の多様な戦略, 分子研シンポジウム, 岡崎 (2013.6.1)

松井敏高, ヘム分解の多様な分子機構, 生物無機化学の新潮流と展望, 名古屋 (2013.5.25)

T. Matsui, S. Nambu, Y. Ono, C. W. Goulding, S. Takahashi, K. Tsumoto, M. Ikeda-Saito, *Heme Degradation without*

*Releasing CO: Unique Reaction Mechanism of IsdG-type Heme Degrading Enzymes*, NIH-Tohoku University-JSPS International Symposium on Cutting Edge Biomedical Research, Japan, Sendai (2013.5.10)

南部周介, 小野由香莉, 松井敏高, C. W. Goulding, 秋山公男, 高橋聡, 津本浩平, 齋藤正男, 結核菌由来ヘム分解酵素 *MhuD* の活性中心構造と酵素活性, 日本化学会第93春季年会, 草津 (2013.3.22)

小野由香莉, 南部周介, 松井敏高, C. W. Goulding, 高橋聡, 津本浩平, 齋藤正男, 黄色ブドウ球菌由来 *IsdG* における特殊なヘム分解生成物, 日本化学会第93春季年会, 草津 (2013.3.22)

松井敏高, ヘムタンパク質におけるユニークな酸素活性化, 分子研研究会「生体配位化学の最前線と展望」, 岡崎 (2013.2.5)

松井敏高, 草間周介, C. W. Goulding, 高橋聡, 秋山公男, 齋藤正男, 新規 *IsdG* 型ヘム分解酵素の構造と反応機構, 第85回日本生化学会大会, 福岡 (2012.12.16)

草間周介, 松井敏高, C. W. Goulding, 高橋聡, 秋山公男, 齋藤正男, *IsdG* 型酵素による新規ヘム分解機構, 第45回酸化反応討論会, 名古屋 (2012.11.16)

草間周介, 松井敏高, C. W. Goulding, 高橋聡, 秋山公男, 齋藤正男, *IsdG* 型酵素による新規ヘム分解機構, 第6回バイオ関連化学シンポジウム, 札幌 (2012.9.7)

松井敏高, ヘム分解の新たな戦略, 第11回化学系薬学若手セミナー, 仙台 (2012.9.1)

草間周介, 松井敏高, C. W. Goulding, 高橋聡, 秋山公男, 齋藤正男, 結核菌由来ヘム分解酵素 *MhuD* の活性中心構造と反応機構, 第39回生体分子科学討論会, 仙台 (2012.6.9)

草間周介, 松井敏高, C. W. Goulding, 秋山公男, 高橋聡, 齋藤正男, 結核菌由来ヘム分解酵素 *MhuD* の活性中心構造と反応機構, 第44回酸化反応討論会, 吹田 (2011.11.5)

T. Matsui, M. Ikeda-Saito, *Ring-opening mechanism of verdoheme by heme oxygenase*, ICBIC 15, Canada, Vancouver (2011.8.7-2011.8.12)

M. Ikeda-Saito, M. Unno, T. Matsui, Heme oxygenase catalytic mechanism, 15th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Canada, Vancouver (2011.8.7-2011.8.12)

M. Ikeda-Saito, T. Matsui, M. Unno, *Heme oxygenase catalytic mechanism*, International Symposium on Activation of Dioxygen and Homogeneous Catalyst, Japan, Nago (2011.7.3-2011.7.8)

草間周介, 松井敏高, C. W. Goulding, 秋

山公男, 高橋聡, 齋藤正男, 結核菌由来ヘム分解酵素 *MhuD* の活性中心構造と酵素活性, 第38回生体分子科学討論会, つくば (2011.6.23)

## 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