

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410186

研究課題名(和文)ポルフィリン症に関わる酵素の構造生物学的研究

研究課題名(英文)Studies on structural biology of the enzymes involved in porphyria

研究代表者

小俣 義明 (OMATA, Yoshiaki)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20268840

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)：ヘモグロビン等に含まれるヘムは、ほとんどの生物に必須の物質であり、ヒトの場合にその生合成経路に異常があると、ポルフィリン症とよばれる病気になる。ポルフィリン症の種類によっては、患者は日光に対する皮膚の感受性が高くなり、昼間に屋外に出ることができない。本研究では、ポルフィリン症患者の治療や創薬に貢献することを目的として、ヘム生合成に関わる酵素の詳細な反応機構を、化学的に合成した基質類似体や機能を少し改変した酵素を用いることで検討した。

研究成果の概要(英文)：Heme contained in hemoglobin and others is an essential substance for most organisms. In the case of human, defect in its biosynthetic pathway enzyme causes a disease called porphyria. The patients of porphyria can not get outdoors on daytime in some cases due the increased light sensitivity that is general symptom of porphyria. In order to contribute to the drug discovery for porphyria and the treatment of patients, a detailed reaction mechanism of enzymes involved in heme biosynthesis was studied by using chemically synthesized analogs of substrate and slightly modified enzymes of function.

研究分野：酵素反応学

キーワード：ポルフィリン生合成 ポルフィリン症 ウロポルフィリノーゲンIII合成酵素 ヒドロキシメチルピラン合成酵素

1. 研究開始当初の背景

ヘム、クロロフィル、ビタミン B₁₂ 等を構成するポルフィリンは、4つのピロール環からなるが、その側鎖の配置は分子の中心に対して対称になっていない。生物が非対称なポルフィリンしか利用しないことには理由があると考えられるが、対称性を低くする意義や機構に関しての具体的な研究はほとんどなされていない。側鎖の配置が非対称なのは、生合成過程において鎖状テトラピロールであるヒドロキシメチルピラン (HMB) を環化し、全てのポルフィリン類に共通の前駆体であるウロポルフィリノーゲン III (uro' III) を生成する際に、ウロポルフィリノーゲン III 合成酵素 (UROS) が D 環を反転させることに因り、中間体としてスピロ化合物を経る機構が提唱されているが、詳細な反応機構は明らかになっていない。

HMB は UROS が存在しなくとも非酵素的に環化するが、この際には D 環は反転せずに側鎖が順序通りに配置したウロポルフィリノーゲン I (uro' I) となり、生理的に利用されない。酵素としての UROS の役割は、基質が中間体の生成に適した配向になるようヒドロキシメチル基のメチル炭素と D 環 16 位の炭素を近づけること及び、スピロ中間体の回転の方向が uro' III の生成に向かうような立体特異性を与えることにあると考えられる。

タンパク質としての UROS の特徴は、膜タンパク質ではないにも関わらず溶解性が悪く、酵素としては熱に不安定であり、これらのことがポルフィリン生合成過程の他の酵素に比べて UROS の研究が進まない一因となっている。

ポルフィリンは全ての生物に必須な化合物であるため、生合成経路の一部の酵素でも欠損していると生存できない。ヒトの場合には、ポルフィリン及びヘム合成経路の 8 酵素の中に活性の劣る酵素があると種々のポルフィリン症の原因となる。UROS の活性が劣っていると先天性赤芽球性ポルフィリン症 (CEP) となり、CEP 患者では HMB はほとんどが uro' I となる。uro' I が利用されずに蓄積することで光に対する皮膚の感受性が著しく高くなり、日光による炎症や重度のびらんを伴う重篤な皮膚ポルフィリン症を起こすため、CEP 患者は昼間に屋外へ出ることができない。

2. 研究の目的

本研究では、CEP の治療法の開発及び創薬へ寄与することを目的として UROS によるポルフィリン環化反応機構を、X 線結晶解析による静的構造と、部位特異的変異酵素及び好熱菌由来酵素と比較した反応解析による動的構造の両面から解明する。

(1) UROS の結晶構造は、酵素単独と生成物との複合体について知られているが、ピロール環が連なった基質と環化した生成物で

は自由度がかなり異なるため、基質-酵素複合体の結晶構造を解明するために必要な基質アナログを化学合成する。

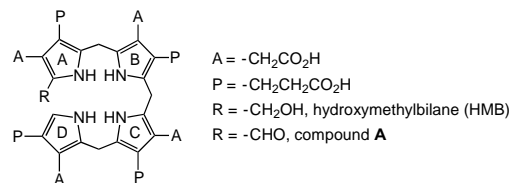
(2) UROS の基質アナログの供給方法として、一段階前の酵素であるヒドロキシメチルピラン合成酵素 (HMBS) に修飾した基質を反応させることで、UROS の修飾基質を得る。

(3) UROS の活性に Tyr168 が重要であることを既に明らかにしたが、その周辺アミノ酸残基を変異させた酵素を作製し、それらの酵素の活性を検討する。

(4) 熱に対する UROS の不安定性を考えるために、好熱菌由来の酵素をクローニング、発現、精製し、性質をヒト UROS と比較する。

3. 研究の方法

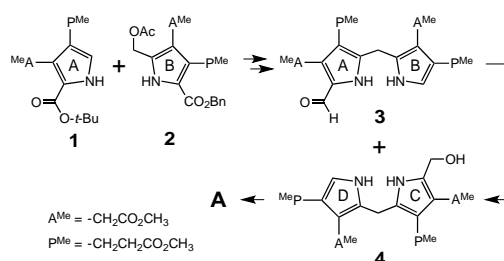
(1) UROS は、基質である HMB を取り込むと直ちに環化反応を起こし、D 環が反転した uro' III を与える。本研究の目的である基質-酵素複合体の結晶を得るために、UROS 阻害活性を持つ HMB のアナログ化合物 A の合成を計画した。化合物 A は、環化反応が起こらないよう、ヒドロキシメチル基をアルデヒド基に誘導した構造を有している。



化合物 A の合成は、以下の 2 通りの方法でアプローチした。

第一法は、生合成ルートに基づき、ポルホビリノーゲン (PBG) を出発原料とし、HMBS を用いて HMB を合成したのち、化学的修飾 (温和な条件で酸化反応) を行う半合成である。HMB は非酵素的に uro' I へと環化反応を起こすが、酵素反応中の適切なタイミングで強アルカリ性条件にできれば HMB を単離することが可能である。

第二法は、精密有機化学合成により化合物 A の全合成を行う。化合物 A は、側鎖の長さが異なった 4 つのピロール環 (A ~ D 環) を順次連結して合成できるが、保護・脱保護などの官能基変換の工程数が多い。文献既知の合成方法では、A 環部となる三置換ピロール 1 と B 環部となる四置換ピロール 2 を連結してジピロメタンとした後、得られた生成物 3 の半量を C、D 環部 4 へと導き、両者をカップリングさせることで目的の化合物 A を合成しており、この方法を参考に合成した。



(2) ヒト HMBS は大腸菌を用いて大量発現し、硫酸分画と各種のカラムクロマトグラフィーを組み合わせて精製した。さらに、monoQ カラムを用いたクロマトグラフィーにより、基質を含まないホロ型 HMBS を充分量かつ高純度で調製し、以下の実験に用いた。これまでに基質アナログの 9-フルオロポリホピリノーゲン や 6-メチルポリホピリノーゲン 等が、HMBS 反応に対する阻害剤として報告されていたことから、今回は新しい阻害剤の候補として、PBG のピロール環にヨウ素原子を導入した 2-ヨードポリホピリノーゲン (2-I-PBG) を用いて酵素反応速度論解析を行った。また、2-I-PBG を結合した酵素-基質アナログ複合体の結晶を調製し、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL44XU を用いて X 線結晶構造解析を実施した。得られた立体構造とアナログを用いた活性の変化から HMBS の基質結合部位について検討した。

(3) ヒト UROS は市販の GST 融合タンパク質発現ベクターを、GST 部分の切断後に残るアミノ酸残基が少なくなるように改良して用い、大腸菌で発現した。アミノ酸変異酵素は、テンプレートとして野生型 UROS 遺伝子を含むベクターと、変異を含むプライマーを用いた PCR により増幅した。DpnI でテンプレート DNA を切断した後大腸菌に導入し、シークエンスで変異を確認して用いた。発現したタンパク質は溶菌後、グルタチオン固定化カラムに吸着させ、カラム上でのプロテアーゼ処理により 1 段階で精製した。

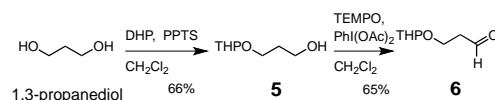
(4) 好熱菌由来の酵素は、*Thermoplasma volcanium* ゲノム DNA をテンプレートに、UROS をコードする *hemD*、HMBS をコードする *hemC* 及び PBG を生成するポリホピリノーゲン合成酵素 (PBGs) をコードする *hemB* 遺伝子を、PCR により増幅し、pGEM-T (Easy) でクローニングした。Nde I-Sal I で切断後、改良した pGEX-6P にライゲーションし、大腸菌に導入してタンパク質を発現、精製した。

4. 研究成果

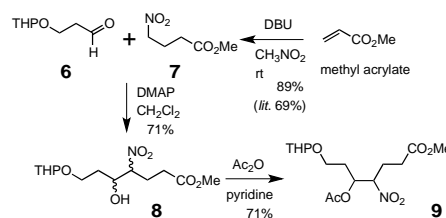
(1) 第一法 (化合物 A の半合成) として、HMBS を用いた酵素反応を NMR サンプルチューブ中で行い、反応の時間経過を詳細に解析したところ、HMB のシグナルは一切観測されず、HMB が非酵素的に環化した uro' I のシグナルが徐々に増えて行き、18 時間後に PBG と uro' I が 1:1 の混合物となり、32 時間後には、全てのシグナルが uro' I のシグナルに収束した。すなわち、HMB を半合成する第一法では、HMB が最大量となる時点で酵素反応を中断する必要があるが、HMBS の酵素反応が遅く、一方で中間体である HMB が非酵素的に環化する反応が著しく早いこと、反応を止める適切なタイミングがなく、本法によって目的化合物 A を得ることが困難であることが分かった。

そこで第二法の化合物 A の全合成の検討を以下のように行った。

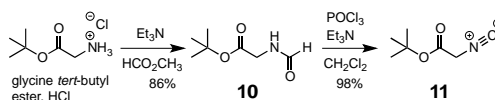
三置換ピロール 1 の合成は、3 種のビルディングブロック 6、7、11 から合成した。1,3-プロパンジオールの片側のヒドロキシ基を THP で選択的に保護した後、1 つ目のアルデヒドヒド 6 を得た。



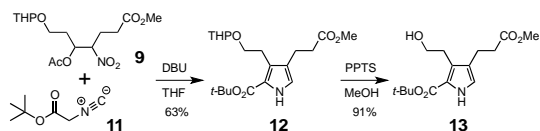
アクリル酸メチルを DBU 存在下、ニトロメタンを溶媒兼試薬として作用させ、収率良くニトロ化合物 7 を得た。ただし、本反応は文献通りの方法では 7 が再度アクリル酸メチルと反応した生成物を与えたため、反応条件の検討を行い最適化した。得られた 2 つ目のビルディングブロック 7 は前述のアルデヒド 6 とニトロアルドール反応を行い、化合物 8 とし、次いでアセチル化を行い、アセテート 9 へと導いた。



3 つ目のビルディングブロック 11 は、グリシン *tert*-ブチルエステル塩酸塩から出発し、ギ酸メチルを用いてホルミル体 10 とし、塩化ホスホリルを用いてイソシアニド 11 を得た。ここで合成した 11 は、不安定な化合物であったため、速やかに次の反応に用いた。



ニトロ化合物 9 とイソシアニド 11 を THF 中、DBU を用いて Barton-Zard ピロール合成反応を行ったところ三置換ピロール 12 を得た。次いで 3 位の側鎖の THP 基を脱保護し、ピロール 13 を得た。

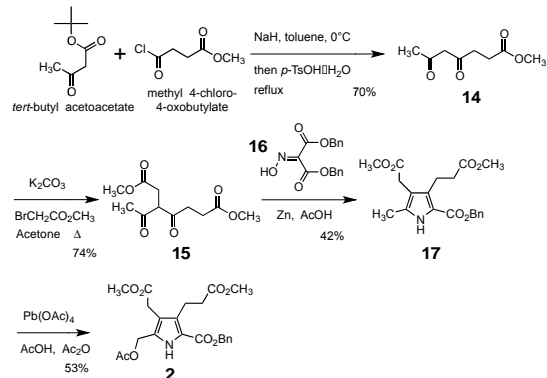


ピロール 13 の ¹H-NMR、¹³C-NMR スペクトルは文献値と一致しており、一級アルコールをカルボン酸まで酸化後、メチルエステルとすることで A 環部に相当する三置換ピロール 1 を得ることができる。

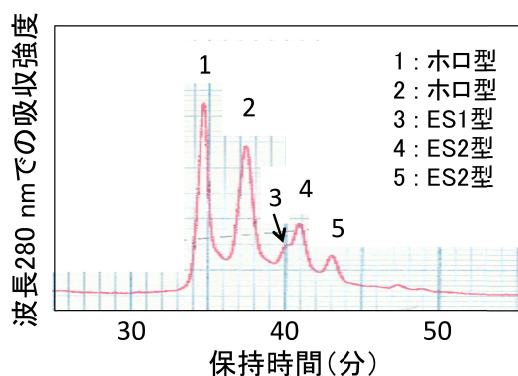
四置換ピロール 2 は、以下のように合成した。

アセト酢酸 *tert*-ブチルと 4-クロロ-4-オキソブタン酸メチルを、NaH を用いて Claisen 縮合した後、*p*-トルエンスルホン酸で酸性条件下、*tert*-ブチルエステルの脱保護と脱炭酸を行い、一工程で 2 反応進んだジケトンエス

テル 14 を収率良く得た。なお、本反応は文献記載の $Mg(OEt)_2$ を用いた場合、望まない副生成物を与えることが分かり、また酸塩化物が不安定で無水コハク酸とコハク酸ジメチルエステルになってしまうことから、条件の検討により、反応の最適化を行った。

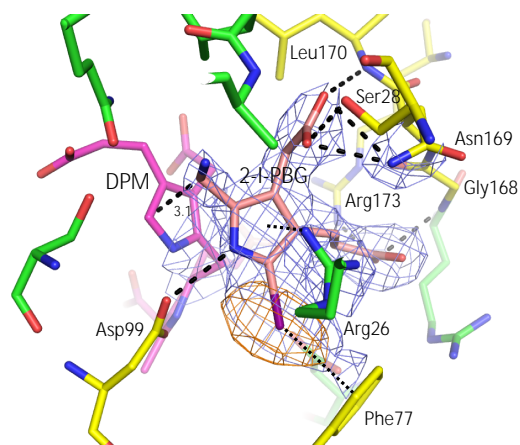


次に化合物 14 のエノラートにプロモ酢酸メチルを作用させてアルキル化を行い、ジケトンジエステル 15 を得た。次いで、化合物 15 とマロン酸ジベンジルから誘導したオキシム 16 を酢酸中、亜鉛と共に Knorr-Kleinspehn 縮合反応を行ったところピロール 17 が得られた。次いで四酢酸鉛を用いて 2 位のメチル基を酸化してアセトキシ基を導入することで四置換ピロール 2 の合成を行うことができた。しかし、三置換ピロール 1 と四置換ピロール 2 からジピロール 3 と 4 を経て、目的の化合物 A を得るまでには至らなかった。(2) ヒト HMBS を、大腸菌で大量発現させ、3 段階のカラムクロマトグラフィーにより精製した。精製酵素をさらに陰イオン交換 (monoQ) カラムで分離し、複数の分画として分取した。それぞれを質量分析したところ、各ピーク画分はホ口型もしくは基質が 1~3 個結合した ES1~ES3 型の HMBS に対応することが分かった。このクロマトグラフィーにより、PBG の結合数に応じた HMBS の分取が可能になった



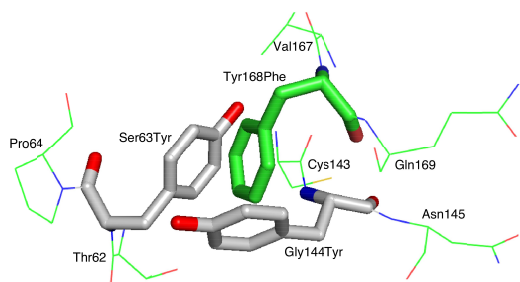
得られたホ口型 HMBS を用いて、基質アナログ 2-I-PBG による阻害実験を行った。反応速度論解析の結果、2-I-PBG は HMBS 反応に対して非競合阻害を示し、阻害定数 K_i は $5 \mu M$ であった。また、ホ口型 HMBS を 20 で結晶化し、得られた単結晶に 2-I-PBG をソーキングすることで酵素-阻害剤複合体の結晶

を調製して、分解能 2.4 \AA までの X 線回折データを収集した。構造解析の結果、酵素-阻害剤複合体の全体構造はホ口型のものと同様であった。また、2-I-PBG がジピロメタン補因子の遠位側ピロールの近傍に結合することが分かった。



これらの結果は、基質アナログの 2-I-PBG が HMBS の補因子周辺に結合し、活性部位において少なくとも補因子と 1 つ目の基質 PBG との間での縮合反応を妨げうことを示唆している。さらに、活性部位での 2-I-PBG の保持に関与している Arg26 や Asp99、Arg173 等は、急性間欠性ポルフィリン症の患者に見られる HMBS 変異体の変異残基に対応することから、これらのアミノ酸残基の酵素活性、特に基質結合に対する重要性が示唆される。

(3) これまでに UROS のアミノ酸変異酵素を用いた研究で、Tyr168 を Phe に変異させると活性が全くなることから Tyr168 の OH-基が反応に重要であることを明らかにしてきた。既報の酵素単独の結晶構造を参考にして、Tyr168 を Phe に変異させたうえで近辺のアミノ酸残基を Tyr に変異させた酵素を作製し、精製酵素の活性を測定したが、期待したような活性の回復は見られず、Tyr の OH-基の役割を明確にすることはできなかった。



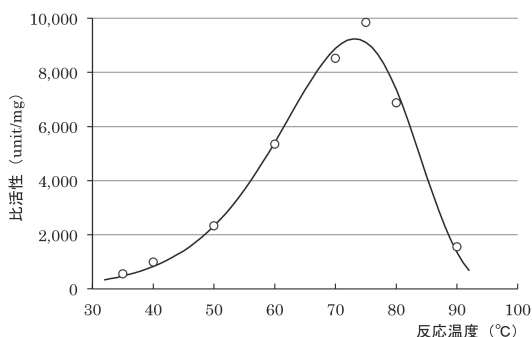
(4) ヒト UROS の性質を好熱菌 UROS と比較するために、好熱菌酵素遺伝子のクローニングを行った。UROS の基質である HMBS は水溶液中では寿命が短く非酵素的に環化して uro'1 になるため、UROS の活性を測定するには前段階の酵素である HMBS とその基質の PBG を共存させた混合反応系で行う。さらに PBG の供給源としての PBGS を含む 3 酵素を *T. volcanium* ゲノムからクローニングした。

好熱菌由来酵素の活性測定法を確立するために、これらが大腸菌で発現させ、精製酵素の性質を検討した。

UROS は比活性が高く、活性測定には微量の酵素しか用いない。反応溶液には酵素の希釈による失活を防ぐためにウシ血清アルブミン (BSA) を添加するが、好熱菌酵素の活性は高温で測定することになり、その温度で BSA の添加が測定に影響しないか調べた。BSA は 55 付近から変性して反応溶液が白濁したが、反応後に適切に除去することで活性の測定には影響しないことが分かった。

混合反応系による UROS の活性測定に先立って、HMB の供給源となる好熱菌由来の精製 HMBS の活性を測定した。好熱菌酵素の活性測定はヒト酵素より高温で行うことが理由なのか明らかでないが、同じ方法では測定値が安定しなかった。そのために、緩衝液を Tris から温度による pH 変化の少ない HEPES に変え、基質として加える PBG は、使用の直前に改良エールリッヒ試薬により定量し、反応後に生じポルホピリノーゲンを安定なポルフィリンに変化させる際には、ヒト酵素で用いている光酸化ではなく、ヨードによる酸化へ変えたところ、安定した活性測定を行えるようになった。

ここで確立した活性測定法を用いて各温度での好熱菌 HMBS 活性を測定した結果、温度の上昇に伴って 75 まで活性が上昇し、それより高温では急速に活性が低下した。



二相性を示す曲線は、酵素反応の温度依存性と高温でのタンパク質の変性を的確に表していると思われ、好熱菌酵素の性質は今後のヒト酵素の性質を解析するうえでのモデルとなりうる。

反応の至適温度は、*T. volcanium* の至適生育温度である 65 より若干高温であった。73 での K_m は $84 \mu\text{M}$ 、 k_{cat} は 6.9min^{-1} と見積もられた。

< 引用文献 >

Leeper, F.J., The evidence for a spirocyclic intermediate in the formation of uroporphyrin-nogen III by cosynthase., *Ciba Found. Symp.*, 180 巻、1994、111-130
Mathews, M.A.A., Schubert, H.L., Whitby, F.G., Alexander, K.J., Schadick, K., Bergonia, H.A., Phillips, J.D., Hill, C.P., Crystal structure of human

uroporphyrin-nogen III synthase., *EMBO J.*, 20 巻、2001、5832-5839

Schubert, H.L., Phillips, J.D., Heroux, A., Hill, C.P., Structure and mechanistic implications of a uroporphyrinogen III synthase-product complex., *Biochemistry*, 47 巻、2008、8648-8666

Pichon, C., Atshaves, B.P., Danso-Danquah, R., Stolowich, N.J., Scott, A.I., Studies On uro'gen III synthase with modified bilanes., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 4 巻、1994、1105-1110

Battersby, A.R., Fooks, C.J., Gustafson-Potter, K.E., McDonald, E., Matcham, G.W.J., Biosynthesis of porphyrins and related macrocycles., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1982、2413-2444

Leeper, F.J., Rock, M., Interaction of analogues of porphobilinogen with porphobilinogen deaminase., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1996、2643-2649

Ahmed, R., Leeper, F.J., A new synthesis of porphobilinogen analogues, inhibitors of hydroxymethylbilane synthase., *Org. Biomol. Chem.*, 1 巻、2003、21-23

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 37 件)

杉島正二、へム代謝系関連酵素の構造生物学的研究、生化学、査読有、88 巻、2016、171-181

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880171

Harada, E., Sugishima, M., Harada, J., Fukuyama, K., Sugase K., Distal regulation of heme binding of heme oxygenase-1 mediated by conformational fluctuations., *Biochemistry*, 査読有、54 巻、2015、340-348
DOI: 10.1021/bi5009694

Harada, E., Sugishima, M., Harada, J., Noguchi, M., Fukuyama, K., Sugase K., Backbone assignments of the apo and Zn(II) protoporphyrin IX-bound states of the soluble form of rat heme oxygenase-1., *Biomol. NMR Assign.*, 査読有、9 巻、2015、197-200

DOI: 10.1007/s12104-014-9573-z

Sugishima, M., Sato, H., Higashimoto, Y., Harada, J., Wada, K., Fukuyama, K., Noguchi, M., Structural basis for the electron transfer from an open form of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase to heme oxygenase., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 査読有、111 巻、2014、2524-2529
DOI: 10.1073/pnas.1322034111

Minoshima, H., Ikeda, Y., Fujii, M., Satoh, M., Ishikawa, T., Itoh, Y., Kawashima-Ohya, Y., Tomobe, K., Omata, Y., Kawashima, T., Specificity of Fur binding to the oxidative stress response gene promoter in the

facultative anaerobic archaeon *Thermoplasma volcanium*., *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有、37 巻, 2014、481-485
DOI: 10.1248/bpb.b13-00613

研究者番号：60271996

杉島 正一 (SUGISHIMA, Masakazu)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号：30379292

[学会発表](計63件)

佐藤秀明、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6月7-9日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

杉島正一、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、日本結晶学会平成27年度年会、2015年10月17-18日、大阪府立大学(大阪府堺市)

佐藤秀明、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9月10-12日、熊本大学工学部(熊本県熊本市)

Sato, H., Inhibitory effect of a novel porphobilinogen analog on the synthesis of a heme precursor by hydroxymethylbilane synthase., 19th International Conference on Cytochrome P450, 2015年6月12-15日、国立オリンピック記念青少年総合センター(東京都渋谷区)

杉島正一、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に関する構造基盤、第14回日本蛋白質科学会年会、2014年6月25-27日、横浜産貿ホール(神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小俣 義明 (OMATA, Yoshiaki)
横浜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：20268840

(2)研究分担者

梶原 康宏 (KAJIWARA, Yasuhiro)
横浜薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：50460283

川嶋 剛 (KAWASHIMA, Tsuyoshi)
横浜薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：60460284

新谷 彰教 (SHINTANI, Akinori)
横浜薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：20588157

(3)連携研究者

東元 佑一郎 (HIGASHIMOTO, Yuichiro)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：40352124

佐藤 秀明 (SATO, Hideaki)
久留米大学・医学部・准教授