

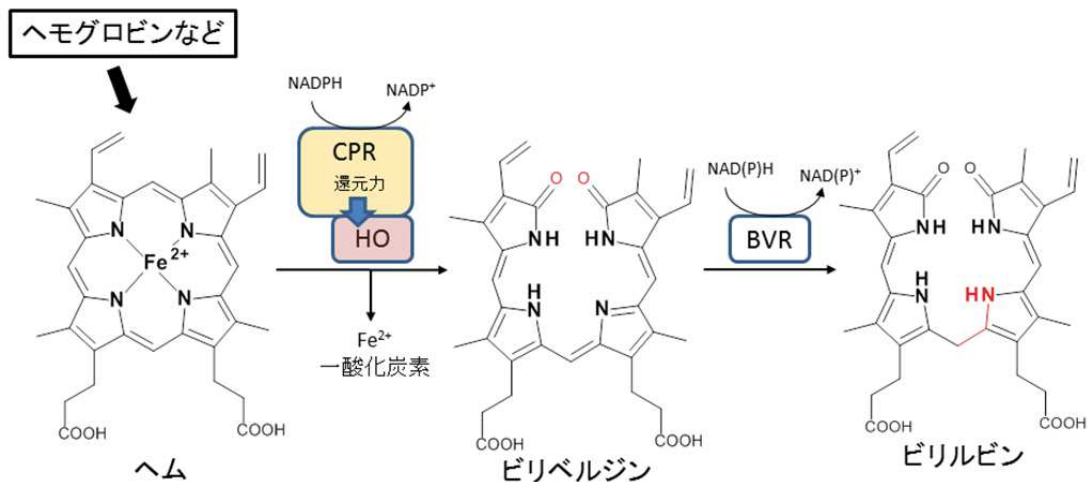
打撲後のあざの色調変化に隠されたメカニズム ～ヘム分解酵素の立体構造と反応機構～

杉島 正一

久留米大学医学部

打撲などによる内出血後、あざの色が赤→青緑→黄色と変化していく様は日常的に見られる光景である。この色の変化は、赤血球中に多く含まれる酸素運搬タンパク質ヘモグロビンに結合しているヘムという色素が、HO（ヘムオキシゲナーゼ）や BVR（ビリベルジン還元酵素）という酵素によって分解される様子を示している。これらの酵素によって、ヘムはビリベルジン（青緑色の色素）→ビリルビン（黄色い色素）へと分解される(下図)。ヘムの分解は突発的な内出血後に起きるだけでなく、日々体内で行われている赤血球の新陳代謝でも起きている反応である。この反応系は①生命活動に必須な鉄の恒常性維持、②酸化ストレスに対する防御、③抗炎症、抗アポトーシス、血管の収縮拡張などに関与する一酸化炭素の生成の3つの生理的意義を持つ。

HOは細胞内の小胞体膜に結合した分子量3万程度の酵素で、同じく小胞体膜に結合しているCPR(シトクロムP450還元酵素)という酵素から供給される還元力と酸素分子を利用して、ヘムを鉄、ビリベルジン、一酸化炭素という3つの分子へと分解する。この反応の特徴は基質であるヘムが、酸素を活性化する補酵素としても機能することである。私達の研究グループでは、SPRING-8やSAGA-LSなどの強力な放射光を利用したX線結晶構造解析を主要な研究手法として、ヘムがビリベルジンへと分解されていく途中のHOの立体構造変化(1,2)やCPR-HO複合体の立体構造(3)などを明らかにした。これらの成果をもとにHOの反応機構やCPRからHOへの還元力供給機構の概要について講演する。



参考文献

1. Sugishima M. et al., J. Biol. Chem. 278, 32352–32358 (2003).
2. Sato H., Sugishima M. et al., Biochem. J. 419, 339–345 (2009).
3. Sugishima M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111, 2524–2529 (2014).

打撲後のあざの色調変化に隠されたメカニズム ～ ヘム分解酵素の立体構造と反応機構 ～

杉島正一

久留米大学医学部医化学講座

2015/8/28 サンメッセ鳥栖

ー 物質化学が導く材料創生とシンクロtron放射光が解く構造・機能のコラボレーション ー
九州大学先端物質化学研究所・九州シンクロtron光研究センター合同シンポジウム

科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞受賞記念講演



Outline

■ Introduction

- ヘムについて
- ヘムの代謝について
- X線結晶構造解析について(創薬との関わり)

■ ヘムオキシゲナーゼ(HO)の立体構造解析

- ヘム鉄への酸素の結合と活性化
- 結晶内酵素反応を利用した生成物解離のための分子メカニズム

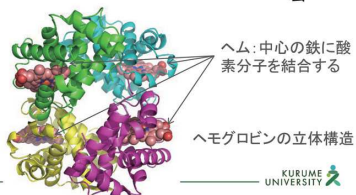
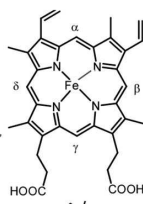
■ シクロクロムP450還元酵素(CPR)-HO複合体の立体構造解析

- CPRの大きな構造変化を伴うHOへの電子伝達反応



ヘム

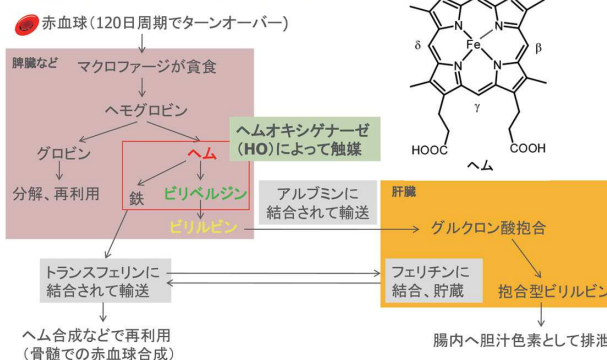
- ポルフィリンに鉄が配位した錯体
- 中心の鉄は2価と3価を行き来できる
- タンパク質に結合する補欠分子族で、酸素の運搬(ヘモグロビン)、電子伝達(シクロクロム類)、酵素の活性中心(シクロクロムP450など)などに用いられる。生命維持に不可欠の分子



ヘム: 中心の鉄に酸素分子を結合する
ヘモグロビンの立体構造

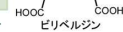
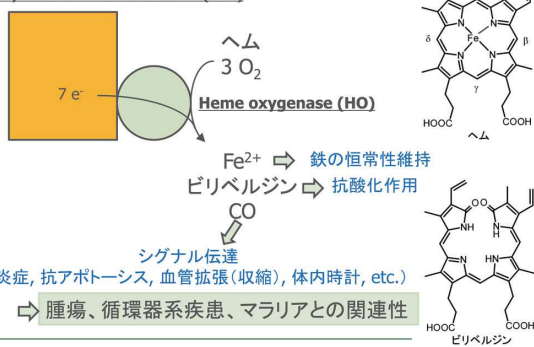


ヒトでのヘム・ビリルビン代謝

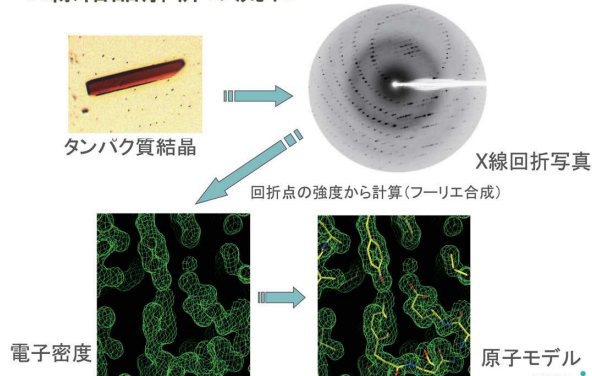


哺乳類におけるヘム分解の生理的役割

NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR)



X線結晶解析の流れ



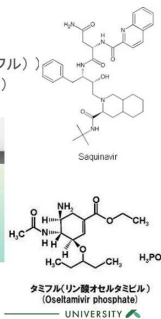
タンパク質の立体構造と医療

■ 創薬

- 標的タンパク質と薬剤候補の化合物の複合体の立体構造から、より標的タンパク質に強く結合する分子を設計する。

■ 実例

- 抗AIDS剤 (HIV プロテアーゼ阻害剤)
- 抗インフルエンザ剤 (ノイラミニダーゼ阻害剤 (タミフル))
- 抗白血病剤 (プリンヌクレオシドホスホリラーゼ阻害剤)
- 抗ガン剤 (チミジル酸合成酵素阻害剤)



Outline

■ Introduction

- ヘムについて
- ヘム代謝について
- X線結晶構造解析について (創薬との関わり)

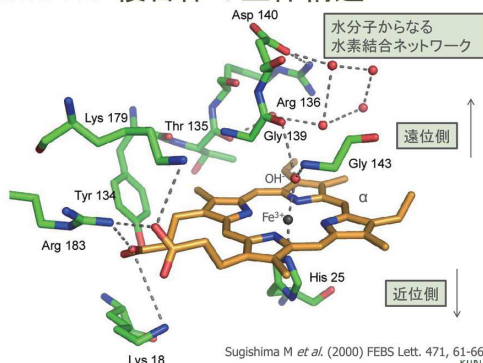
■ ヘムオキシゲナーゼ (HO) の立体構造解析

- ヘム鉄への酸素の結合と活性化
- 結晶内酵素反応を利用した生成物解離のための分子メカニズム

■ シトクロムP450還元酵素 (CPR) -HO複合体の立体構造解析

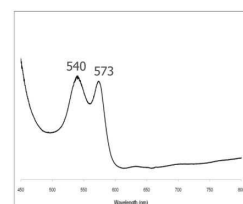
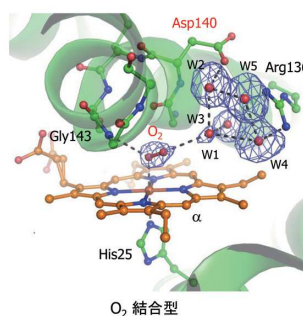
- CPRの大きな構造変化を伴うHOへの電子伝達反応

Heme-HO 複合体の立体構造



Sugishima M *et al.* (2000) FEBS Lett. 471, 61-66

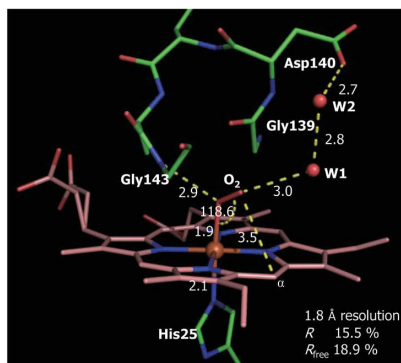
O₂ 結合型の立体構造



X線照射後のO₂結合型の可視吸収スペクトル (溶液の吸収極大; O₂ 結合型; 540 & 574 nm; OOH 結合型; 530 & 557 nm)

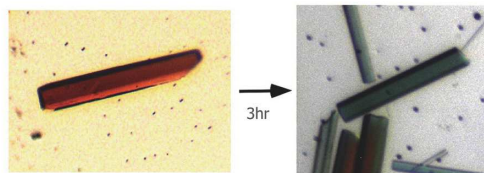
O₂ 結合型

O₂ 結合型の立体構造



Sugishima M *et al.* (2012) Biochemistry, 51, 8554-62.

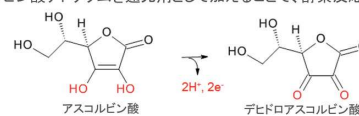
結晶中での酵素反応



反応前
(ヘム-HO 複合体)

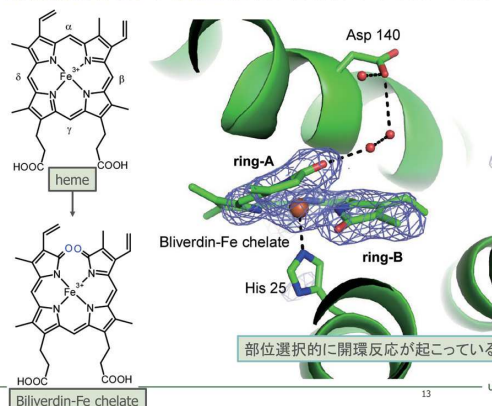
反応後
(ビリベルジン-Fe-HO 複合体)

アスコルビン酸ナトリウムを還元剤として加えることで、酵素反応開始



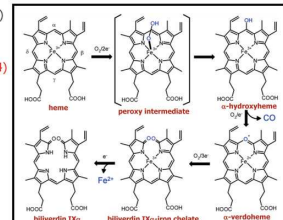
Sugishima M *et al.* (2003) J. Biol. Chem. 278, 32352-8.

酵素反応後の構造 (Biliverdin-Fe-HO complex)

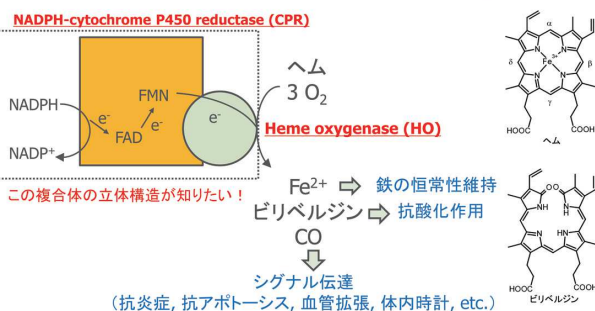


反応中間状態の立体構造

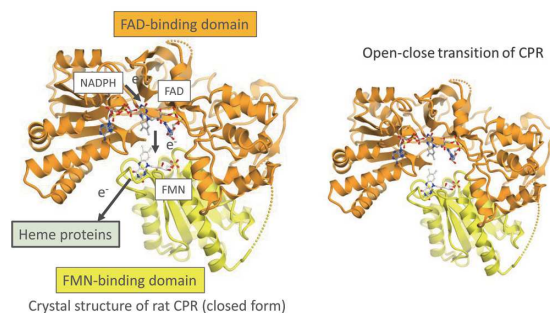
- ヘム非結合型
 - Sugishima M. et al., Biochemistry (2002)
 - Lad L. et al., J. Biol. Chem. (2003)
 - Unno M. et al., J. Biol. Chem. (2013)
- ヘム結合型
 - Schuller D.J. et al., Nat. Struct. Biol. (1999)
 - Sugishima M. et al., FEBS letters (2000)
 - Friedman J. et al., J. Biol. Chem. (2003)
 - Sugishima M. et al., Eur. J. Biochem. (2004)
 - Hirotsu S. et al., J. Biol. Chem. (2004)
 - Friedman J. et al., Biochemistry (2004)
 - Sugishima M. et al., Biochemistry (2005)
- O₂結合型
 - Unno M. et al., J. Biol. Chem. (2005)
 - Sugishima M. et al., Biochemistry (2012)
- ベルドヘム複合体
 - Lad L. et al., J. Inorg. Biochem. (2004)
 - Sato H. et al., Biochem. J. (2010)
 - Unno M. et al., J. Inorg. Biochem. (2012)
- ビリベルジン-鉄錯体複合体
 - Sugishima M. et al., J. Biol. Chem. (2003)



哺乳類におけるヘム分解の生理的役割



NADPH-シトクロムP450還元酵素 (CPR)



HOとの安定な複合体を得るために、open型が安定化された変異CPR(Δ TGEE)を用いた

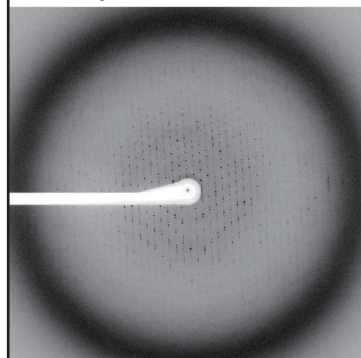
Δ TGEE -heme-HO-1複合体の結晶化



結晶を水に溶解後
SDS-PAGE、
Oriole (Biorad) で染色

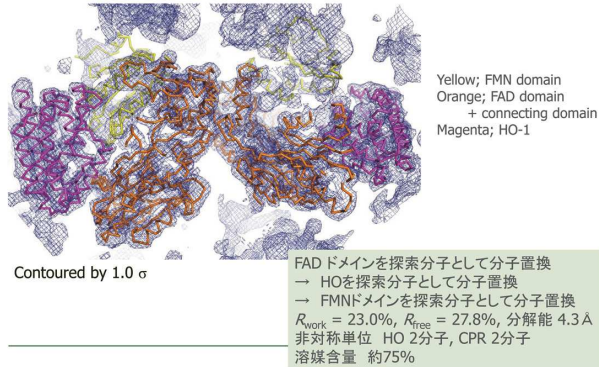


X-ray diffraction@SPRING-8, BL44XU

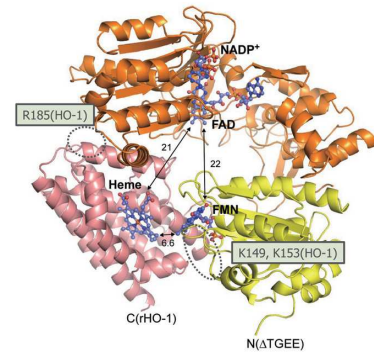


$P6_3$, $a = b = 290.3 \text{ \AA}$, $c = 83.6 \text{ \AA}$
 分解能 50-4.3 $\text{\AA}$ (4.37-4.3 $\text{\AA}$),
 $R_{\text{merge}} = 10.7\%$ (88.8 %)
 Completeness = 94.6 % (87.7 %)
 Redundancy = 12.0 (10.3)
 $I_{\sigma}/\sigma(I) = 6.2$ (2.8)

ΔTGEE-heme-HO-1複合体の低分解能結晶構造



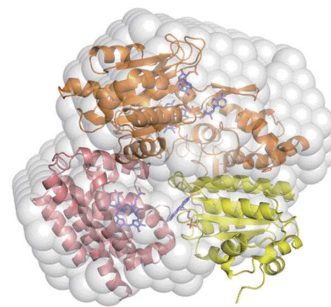
ΔTGEE-heme-HO-1複合体の結晶構造



タンパク質の立体構造研究手法

- X線結晶解析
 - 最も汎用的に用いられ、精度(分解能)も高い手法
 - 結晶化する必要がある
- 核磁気共鳴(NMR)
 - 溶液や固体で測定可能
 - 決定可能な分子量に制限がある
- X線小角散乱
 - 溶液中で測定可能
 - 精度(分解能)が低い
- 電子顕微鏡(単粒子解析)
 - 溶液中で測定可能
 - 精度(分解能)が低いことが多い

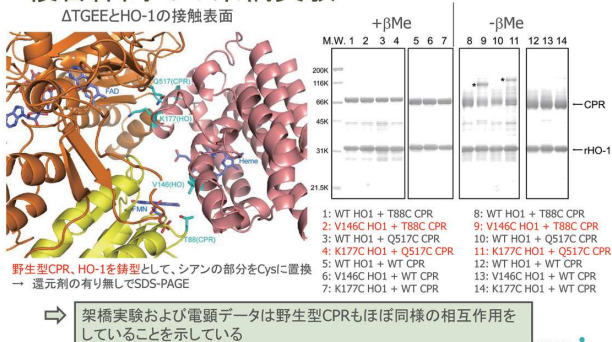
X線小角散乱@SAGA-LS, BL11



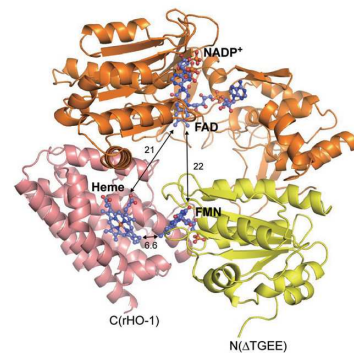
ΔTGEE-heme-HO-1複合体の溶液散乱プロファイルから作製した粗視化モデルと結晶構造はほぼ一致

⇒ 溶液中でもほぼ同様の複合体を形成している

Cysの導入による野生型CPRとheme-HO-1複合体間での架橋実験



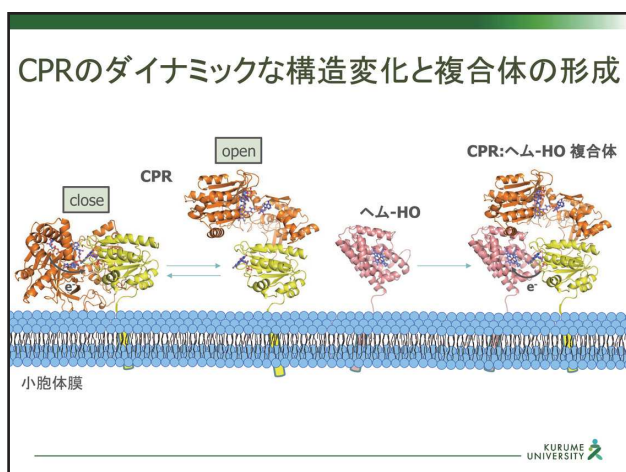
補欠分子族の位置関係



FMNとHemeは近接
→ 直接、電子伝達が可能

FADとFMN, FADとHemeは遠い
→ この間の電子伝達は難しい。

ΔTGEEではHO反応に必要な電子の供給が遅い(野生型の1/360)
→ open=closeの構造変化が必要なることを示唆



謝辞

- 大阪大学
 - 福山恵一
- 帝京大学
 - 野口正人
- 久留米大学
 - 東元祐一郎
 - 山本 健
 - 佐藤秀明
 - 原田二郎
- 九州工業大学
 - 坂本 寛
 - 安永卓生
- 宮崎大学
 - 和田 啓
- 横浜薬科大学
 - 小俣義明
- シカゴ大学
 - Keith Moffat
 - Vukica Srajer
- 利用放射光施設
 - SPring-8 BL44XU, BL38B1, BL41XU
 - SAGA-LS BL11
 - Advanced Photon Source, BioCARS
- 研究費
 - 文科省科研費(若手(B)、基盤(C))
 - 石橋振興基金助成金