

### (3) X線小角散乱によるNADPH・シトクロムP450還元酵素と ヘムオキシゲナーゼの複合体の構造解析

杉島正一

久留米大学医学部

#### 1. はじめに

生体高分子の詳細な立体構造を得る手法としては、X線結晶構造解析が主要な方法であるが、X線小角散乱 (SAXS) は溶液状態の試料にも適用可能で、結晶化する必要がないため、手軽に構造情報を取得することが可能な方法のひとつである。本研究では、この手法をNADPH・シトクロムP450還元酵素 (CPR) とヘムオキシゲナーゼ (HO) の複合体に適用して、立体構造情報を取得した。

HOはヘモグロビンなどに含まれる補欠分子族であるヘムの分解酵素である。基質として結合したヘムに酸素を結合し、CPRから供給された還元力を使って、酸素を活性化させ、ヘム自身を切断させる反応を触媒する (図1)。すなわち、この酵素反応においてヘムは基質であると同時に酸素を活性化させる補酵素でもある。<sup>1)</sup>

この酵素反応によって、ヘムは鉄、 $\alpha$ -ビリベルジン、一酸化炭素へと分解されるが、ここで供給される鉄は、ヒトが一日に必要な鉄の9割近くを賄っており、重要な鉄の供給源である。また、HOの基質である遊離ヘムは活性酸素を生じるプロオキシダントであり、

生成物の一つである $\alpha$ -ビリベルジンが還元されて生じる $\alpha$ -ビリルビンは $\alpha$ -トコフェロール (ビタミンE) に匹敵するアンチオキシダントである。すなわち、この系は酸化ストレスに対する防御系としても機能している。さらに、一酸化炭素は種々のシグナル伝達経路 (シスタチオンin $\beta$ シンターゼを介した血管収縮・拡張作用、NF- $\kappa$ Bを介した抗炎症作用、抗アポトーシスや体内時計に関する作用など) に関与するシグナル伝達物質としての機能が示唆されている。

我々はこれまでにX線結晶構造解析を使ったHOの反応機構に関する研究を進めてきた。CPRからHOへの還元力供給は、HOの反応段階のほぼ全てで必要であり (図1)、その供給経路の詳細について明らかにするために、大型放射光施設SPring-8の放射光を使用して、CPR・ヘム・HO複合体のX線結晶構造解析を行った。<sup>2)</sup>この解析では複合体を安定化させるために、 $\Delta$ TGEEという変異CPR<sup>3)</sup>を使用した。CPRにはopen型とclose型という大きく構造の異なる状態を行き来する揺らぎの大きい酵素と考えられており、 $\Delta$ TGEEはHOが結合すると考えられたopen型が安定化する変異CPRである。この立体構造決定はCPRからHOへの

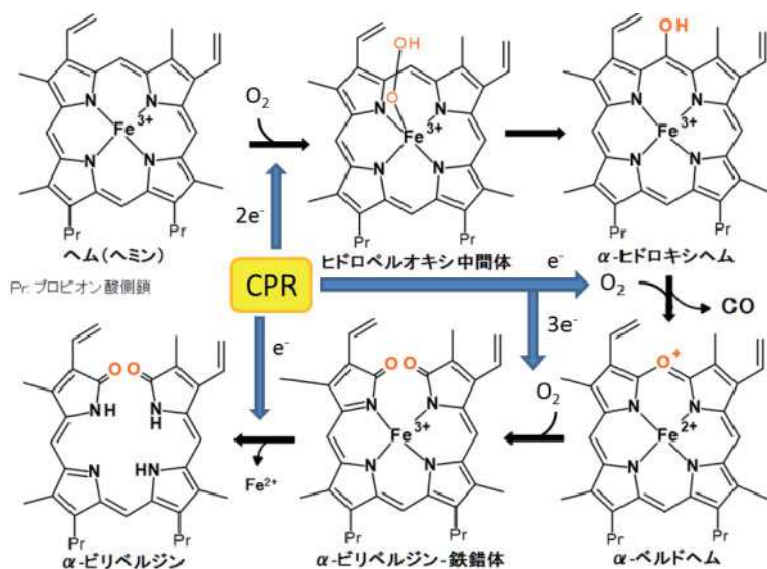


図1 HOの反応スキーム

の電子移動反応を考えるうえで、大きな進歩をもたらしたが、変異CPRを使用しているがゆえに、二つの疑問点が残った。①溶液中での複合体構造は結晶構造と一致するのだろうか? ②野生型CPRとHOの複合体でも同様か? である。

これらの疑問について検証する方法の一つとして、SAXSによる解析を九州シンクロトロン光研究センター県有ビームラインBL11において行った。

## 2. 実験方法

今回の実験で測定した試料を表 1 に示した。これらの試料は、それぞれ膜結合部位 (CPR は N 末端側、HO は C 末端側) を除いたラット由来の可溶性酵素を、大腸菌を用いて発現させた組み換え酵素である。 $\Delta$ TGEE は CPR のヒンジ領域と呼ばれる部位を 4 アミノ酸残基短縮している。蛋白質濃度は 10 mg/ml、溶液系は 20 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 7.4 である。

これらの試料を種類ずつ、BL11 でビームラインサイエンティストをされていた菊地博士より提供いただいた溶液セルに封入した。それぞれの試料に、8 keV ( $\lambda = 1.55 \text{ \AA}$ ) の X 線を 30–60 分間、総照射ビーム量が一定となるように照射し、高速二次元 X 線検出器 (Rigaku PILATUS) を用いて、 $s = 0.034 - 0.3 \text{ \AA}^{-1}$  の範囲の散乱強度を測定した。また、1–6 とは別に溶媒のみの散乱強度も測定し、差し引きすることで、溶質の散乱強度を得た。散乱角の補正は標準試料であるベヘン酸銀の回折を利用して行った。

表 1 測定試料

1	CPR
2	$\Delta$ TGEE
3	ヘム・HO 複合体
4	$\Delta$ TGEE・ヘム・HO 複合体
5	CPR とヘム・HO 複体の混合溶液 (1:1)
6	CPR とヘム・HO 複体の混合溶液 (2:1)

## 3. 結果と考察

ギニエプロット解析から得られた粒子径と結晶構造から予測される粒子径を表 2 に示した。また、実際のプロットの例として、CPR (試料 1) の解析結果を図 2 に示した。全体的に 0.1~0.2 nm 程度、

表 2 粒子径 (nm)

	実験値	結晶構造からの予測値
1	2.738	2.58
2	2.967	2.78
3	2.234	1.68
4	3.128	2.92
5	2.785	-
6	2.911	-

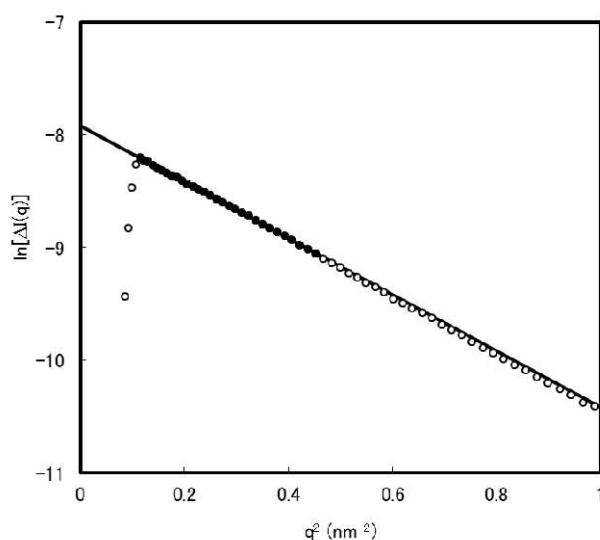


図 2 CPR のギニエプロット解析。○と●は実験値を示した。直線は●の値を使用して解析し、その勾配から粒子径を算出した。

実験値のほうが大きい値であるが、これは、結晶構造には含まれていない蛋白質と水素結合などで弱く相互作用している水分子の影響と推察している。ヘム・HO 複合体 (試料 3) については、全体のアミノ酸配列の 20%程度が、結晶構造解析では構造決定できない一定の立体構造を持たない領域にあたるので、その部分の不一致が現れたものと考えている。試料

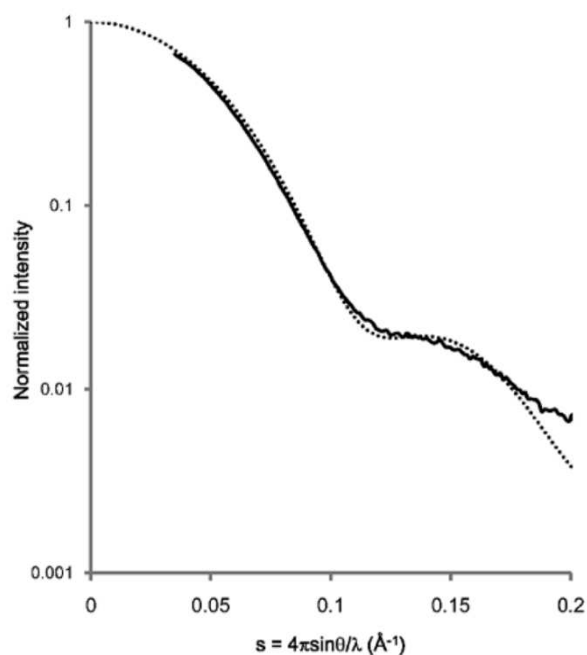


図 3  $\Delta$ TGEE—ヘム・HO 複体の散乱曲線 (実験値:太線) と結晶構造から推定される散乱曲線 (点線)。文献 2 より転載。

1と2では、粒子径が異なるが、これは野生型CPRは、この条件ではほぼclose型を形成し、 $\Delta$ TGEEはopen型を形成しているためと考えられる。この結果はすでに報告されているCPRのSAXS測定の結果と一致する<sup>3)</sup>。

$\Delta$ TGEE・ヘム・HO複合体の結晶構造からプログラムCRY SOL<sup>4)</sup>を用いて推定された散乱曲線は、 $s = 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ までの範囲で実測値(試料4)とよく一致し(図3)、また、プログラムDAMMIN<sup>5)</sup>を用いて、散乱曲線からビーズモデルを作製したところ、散乱曲線から得られたビーズモデルと結晶構造が比較的よく一致することが分かった(図4)。このことは、 $\Delta$ TGEE・ヘム・HO複合体の結晶構造が溶液中でも同様であることを示している。

試料5と6についてはCPRとヘム・HO複合体のすべての分子が複合体を形成しているわけではないので、多成分系の解析が必要である。現在までのところ、多成分系での解釈はうまく進行していないが、試料5と試料6の平均粒子径を比べると、試料6の粒子径のほうが大きく、その値が試料1で得られた粒子径を超えていることから、試料6の条件のほうがCPRとヘム・HOの複合体の形成量が増加していることが示唆される。今後、CPRとヘム・HO複合

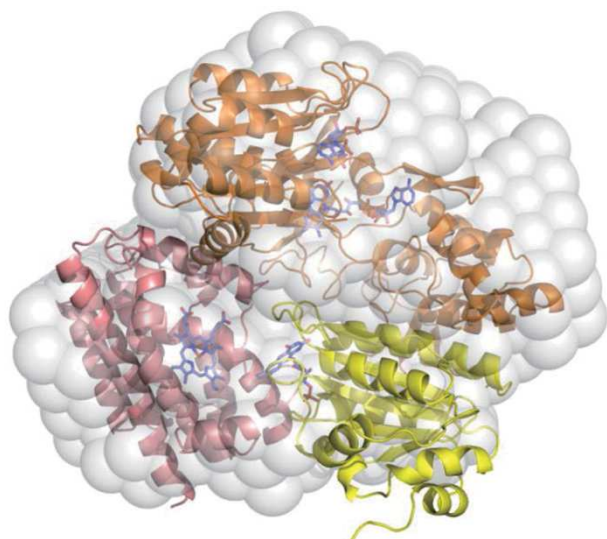


図4  $\Delta$ TGEE - ヘム - HO 複合体の結晶構造と SAXS から得られたビーズモデル。結晶構造の蛋白質部分はリボン図、ヘムと $\Delta$ TGEEに含まれる補酵素はスティックモデルで示した。オレンジと黄色は $\Delta$ TGEE、赤はHOを示す。文献2より転載。

体について、条件検討を重ねることで、より複合体の形成量を増加させ、解析を進めていきたいと考えている。

#### 参考文献

- [1] G. Kikuchi, T. Yoshida, M. Noguchi, "Heme oxygenase and heme degradation", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 558-567 (2005).
- [2] M. Sugishima, H. Sato, Y. Higashimoto, J. Harada, K. Wada, K. Fukuyama, M. Noguchi, "Structural basis for the electron transfer from an open form of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase to heme oxygenase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 2524-2529 (2014).
- [3] D. Hamdane, C. Xia, S. C. Im, H. Zhang, J. J. Kim, L. Waskell, "Structure and function of an NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in an open conformation capable of reducing cytochrome P450", *J. Biol. Chem.* **284**, 11374-11384 (2009).
- [4] D. Svergun, C. Barberato, M. H. J. Koch, "CRY SOL - a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates", *J. Appl. Crystallogr.* **28**, 768-773 (1995).
- [5] D. I. Svergun, "Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing", *Biophys. J.* **76**, 2879-2886 (1999).