

(様式第5号)

ヘムオキシゲナーゼ酸化還元複合体の X 線小角散乱測定 Small angle X-ray scattering measurements of the redox complex of heme oxygenase

杉島 正一

Masakazu Sugishima

久留米大学医学部

Kurume University School of Medicine

- ※1 先端創生利用（長期タイプ、長期トライアルユース、長期産学連携ユース）課題は、実施課題名の末尾に期を表す（Ⅰ）、（Ⅱ）、（Ⅲ）を追記してください。
- ※2 利用情報の開示が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後二年以内に研究成果公開（論文（査読付）の発表又は研究センターの研究成果公報で公表）が必要です。（トライアルユース、及び産学連携ユースを除く）

1. 概要（注：結論を含めて下さい）

ヘムオキシゲナーゼ(HO)はヘム分解系において主要な役割を果たす酵素で、その酵素反応には NADPH-シトクロム P450 還元酵素(CPR)からの還元力を必要とする。本実験では HO と CPR の複合体および単体について X 線小角散乱実験を行い、散乱曲線とそれから得られる回転半径や dummy atom model を結晶構造と比較した。その結果、結晶構造とある程度一致する結果が得られた。

(English)

Heme oxygenase (HO) is involved in physiological heme degradation. HO reaction requires the reducing equivalents from NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR). In this experiment, we collected small-angle X-ray scattering profiles from CPR-HO complex, CPR, and HO. Radii of gyration from the profiles are consistent with those calculated from the crystal structures of them. *Ab initio* dummy atom models obtained from the scattering profiles are also roughly consistent with the crystal structures.

2. 背景と目的

ヘムオキシゲナーゼ(HO)はヘム分解系において主要な役割を果たす酵素で、酸素と NADPH-シトクロム P450 還元酵素(CPR)からの還元力を用いて、ヘムをビリベルジン、鉄、CO へと分解する。我々はこれまでにヘム-HO 複合体や様々な反応中間体と HO の複合体の立体構造を決定し、酵素反応の構造基盤決定を行ってきた(1)。例えば、酵素反応過程におけるビリベルジン生成の一段階手前のビリベルジン-鉄錯体-HO 複合体(2)やそのさらに一段階手前のベルドヘム-HO 複合体(3)について、すでに結晶構造を明らかにしている。

他の研究グループによる X 線小角散乱や NMR を用いた研究から、CPR には open, close のコンフォメーション変化があり、それがシトクロム P450 との相互作用に重要であることが分かっている(4)。我々は HO との相互作用においても CPR のコンフォメーション変化が重要ではないかと考え、実際に open コンフォメーションを安定化した CPR の変異タンパク質(Δ TGEE)はヘム-HO 複合体と安定な複合体を形成することを見出した。

本実験では Δ TGEE が野生型 CPR と同様の結合様式で、ヘム-HO 複合体と結合しているのかどうかを確認することを目的として、X 線小角散乱測定を行なった。

3. 実験内容（試料、実験方法、解析方法の説明）

本実験では X 線検出器として PILATUS を用いて、X 線エネルギー：8 keV、カメラ長：0.6 m の条件で X 線小角散乱測定を行なった。1 試料の X 線照射時間は 30 分～1 時間程度である。入射後、X 線強度が減衰していくので、それぞれの試料に総量として同じ X 線量が照射されるように X 線照射時

間を調整した。この設定で測定可能な範囲は $0.32 < q < 3.44 \text{ nm}^{-1}$ であり、測定データを円環平均した結果、 3 nm^{-1} までのデータは問題なく使用可能であったので、そこまでのデータを用いて以降の解析を行なった。測定試料は表1の通りである。これらの試料は全て膜結合タンパク質であるが、膜結合部位を切除し、可溶化型にした試料を大腸菌にて発現させ、その後、十分な純度となるまで精製した。X線小角散乱測定前にはゲルろ過カラム

(Hiprep 16/60 Sephacryl S-200 HR) を用いた精製を行い、その後、 10 mg/ml の濃度まで濃縮した。ゲルろ過カラムからの溶出には 20 mM リン酸カリウム緩衝液 ($\text{pH } 7.4$)を用いた。

このような精製試料をビームライン備え付けの液体試料測定ホルダーに注入し、測定を行なった。Rat CPR + heme-rat HO-1複合体はRat CPRとheme-rat HO-1複合体をモル比で1:1で混合した溶液である。それに対して、 $\Delta \text{ TGEE-heme rat HO-1}$ 複合体はゲルろ過カラムによって複合体を形成していると思われる画分を精製したものである。カメラ長の校正は標準試料であるベヘン酸銀を用いて行い、校正後の値は 0.606 m である。

得られた散乱曲線から、Guinier plotにより、各試料の回転半径を求め、結晶構造から予想される回転半径と比較した。また、プログラムDAMMIN(5)を用いて、散乱曲線からdummy atom modelを作製し、結晶構造と比較した。

4. 実験結果と考察

Guinier plot から得られた各試料の R_g を表2に示した。

表2 各試料の回転半径	R_g (nm)	結晶構造から予測される R_g (nm)
Heme-rat HO-1複合体	2.09	1.68
$\Delta \text{ TGEE-heme rat HO-1}$ 複合体	3.03	2.92
$\Delta \text{ TGEE}$	2.90	2.78
Rat CPR	2.70	2.60
Rat CPR + heme-rat HO-1複合体	2.81	-

この結果から、散乱曲線から得られた R_g と結晶構造から予測される R_g は heme-rat HO-1 複合体以外は良い一致を示した。heme-rat HO-1 複合体は全長 267 アミノ酸残基の内、N 末端側 9 残基、C 末端側 44 残基が結晶構造中でディスオーダーしているため、結晶構造には含まれていない。その結果、X線小角散乱では大きめに R_g が算出されたと推測される。

Human CPR について、酸化型では $R_g = 2.64 \text{ nm}$ 、還元型では $R_g = 2.76 - 2.93 \text{ nm}$ という X線小角散乱による実験結果が報告されており(6)、酸化型では CPR は closed conformation、還元型では $\Delta \text{ TGEE}$ と同様に open conformation を取ると推察されていることから、今回の結果は報告されている論文値とよく一致する結果である。また、 $\Delta \text{ TGEE-heme rat HO-1}$ 複合体と $\Delta \text{ TGEE}$ の R_g を比較すると、結晶構造から予測される通りの heme-rat HO-1 の結合による R_g の増加が見られ、溶液中の構造と結晶構造がよく一致することが示唆される。実際に $\Delta \text{ TGEE}$ の散乱曲線から dummy atom model を作製し、結晶構造と比較した結果、かなり良い一致が見られた (図 1)。また $\Delta \text{ TGEE-heme rat HO-1}$ 複合体についても、別に得られた結晶構造 (未発表) とよく一致する結果が得られた。

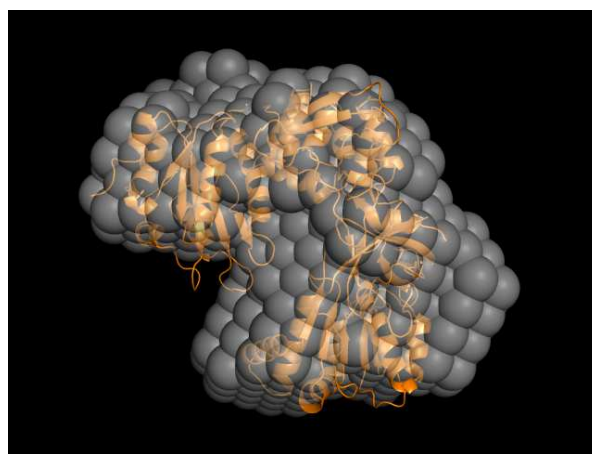


図 1 $\Delta \text{ TGEE}$ の結晶構造と dummy atom model

一方、野生型 rat CPR に heme-rat HO-1 複合体を混合した溶液に関しては、CPR 単体に比べて回転半径の増加が見られたことから、ある程度の割合の CPR が HO に結合していることが示唆される。しかし、 $\Delta \text{ TGEE-heme-rat HO-1}$ 、rat CPR 単体、heme-rat HO-1 単体の散乱曲線から、プログラム OLIGOMER(7)を用いて、野生型 rat CPR に heme-rat HO-1 複合体を混合した溶液に含まれるそれぞれの存在比を計算したところ、CPR-HO 複合体の存在比は 10%程度で、ほとんどは rat CPR 単体および heme-rat HO-1 単体からの散乱であった。

5. 今後の課題

今回の測定では、 $0.34 < q < 3.0 \text{ nm}^{-1}$ までの散乱強度を用いて解析を行なった。野生型 rat CPR と

heme-rat HO-1 の複合体については、複合体を安定化するために HO-1 の競合阻害剤である Zn-プロトポルフィリン IX と HO-1 の複合体を用いて、NADPH 存在下で測定するといった工夫が必要かもしれない。

6. 参考文献

1. 杉島正一 "ヘムの代謝にかかわる酵素の構造生物学" (2007) **日本結晶学会誌** 49(2):99-106.
2. Sugishima M., Sakamoto H., Higashimoto Y., Noguchi M., Fukuyama K. "Crystal structure of rat heme oxygenase-1 in complex with biliverdin-iron chelate: Conformational change of the distal helix during the heme cleavage reaction." (2003) **J. Biol. Chem.** 278(34):32352-32358.
3. Sato H., Sugishima M., Sakamoto H., Higashimoto Y., Shimokawa C., Fukuyama K., Palmer G., Noguchi M. "Crystal structure of rat haem oxygenase-1 in complex with ferrous verdohaem: presence of a hydrogen-bond network on the distal side." (2009) **Biochem. J.** 419(2):339-345.
4. Iyanagi T., Xia C., Kim J.P. "NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase: Prototypic member of the diflavin reductase family." (2012) **Arc. Biochem. Biophys.** 528(1):72-89.
5. Svergun D. I. "Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing." (1999) **Biophys. J.** 76:2879-2886.
6. Huang W.C., Ellis J., Moody P.C., Raven E.L., Roberts G.C. "Redox-linked domain movements in the catalytic cycle of cytochrome P450 reductase." (2013) **Structure** 21:1581-1589.
7. Konarev P. V., Volkov V. V., Sokolova A. V., Koch M. H. J., Svergun D. I. "PRIMUS: a windows PC-based system for small-angle scattering data analysis." (2003) **J. Appl. Cryst.** 36:1277-1282.

7. 論文発表・特許 (注: 本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

1. Higashimoto Y, Sugishima M., Sato H, Sakamoto H, Fukuyama K, Palmer G, Noguchi M. "Mass spectrometric identification of lysine residues of heme oxygenase-1 that are involved in its interaction with NADPH-cytochrome P450 reductase." (2008) **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 367(4):852-858.
2. Higashimoto Y, Sakamoto H, Hayashi S, Sugishima M., Fukuyama K, Palmer G, Noguchi M. "Involvement of NADPH in the interaction between heme oxygenase-1 and cytochrome P450 reductase." (2005) **J. Biol. Chem.** 280(1):729-37.

8. キーワード (注: 試料及び実験方法を特定する用語を2~3)

X 線小角散乱: 散乱 X 線のうち、散乱角が小さいものを測定することにより、物質の構造情報を得る手法である。タンパク質の構造解析分野では従来、Guiner plot や Krathy plot による回転半径の測定、形状の推測が行われてきたが、Svergun らによる *ab initio* dummy model の解析手法が発展し、X 線結晶構造解析を相補する有力な手法となりつつある。

ヘムオキシゲナーゼ: 小胞体膜上で発現するヘム分解酵素である、様々なストレスによって発現が誘導される誘導型 (HO-1)、常に一定量発現している構造型 (HO-2) が知られている。その酵素反応には O_2 と還元力を必要とし、ヘムを鉄、ビリベルジン、一酸化炭素へと分解する。これらの生成物は鉄の恒常性維持、酸化ストレスに対する防御、種々の細胞内シグナル伝達に重要である。

NADPH-シトクロム P450 還元酵素: 小胞体膜上で発現する還元酵素で FAD、FMN を補酵素として結合している。生理的な還元相手としてシトクロム P450, シトクロム b_5 、ヘムオキシゲナーゼが知られている。基質は NADPH であり、その還元力を FAD、FMN を介して、還元相手の持つヘム鉄へと伝える。

9. 研究成果公開について (注: ※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。また、論文(査読付)発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください(2013年度実施課題は2015年度末が期限となります。))

長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。

① 論文(査読付)発表の報告

(報告時期: 2016年 3月)