

学位論文要旨

氏名: 合屋 知彦

題目: Coordination structure and heme degradation mechanisms of a higher plant
heme oxygenase-1 from *Glycine max* (soybean)
(ダイズ由来植物ヘムオキシゲナーゼ-1のヘム配位構造およびヘム分解機構)

ヘムオキシゲナーゼ (HO) は生体内のヘムを立体特異的な酸素分解により、2つの中間体(α -ヒドロキシヘム, ベルドヘム)を介して、ビリベルディン, CO, および遊離の鉄イオンへ変換する反応を触媒する。HO は多量のヘムタンパクを使用する哺乳動物において最初に発見され、その後、反応機構, 結晶構造が解析された。哺乳動物や病原バクテリア HO の結晶構造解析によって、HO は 8本の α -ヘリックスから構成されていることが明らかになっている。ヘムは近位ヘリックスと遠位ヘリックスから主に作られるヘムポケットに挿入され、基質および HO 反応に必要な酸素を活性化する補欠分子族として利用される。最近では、遺伝子解析により HO 遺伝子はほとんどすべての生物種に保存されていることがわかっている。

哺乳動物における HO の主な役割は鉄のリサイクルと不要になったヘムの分解である。それに対して、シアノバクテリアや植物では、光形態形成に必要な光合成色素や赤色光応答色素が HO 反応の最終産物であるビリベルディンから合成されるため、これら光応答色素の合成酵素の 1 つにもなっている。本研究では、報告されているアミノ酸配列に基づき作製した *Gm HO1* 合成遺伝子を導入した大腸菌発現系を用いてダイズ(*Glycine max*)由来の HO タンパク (*Gm HO1*) を調製し、その分子特性とヘム分解特性を紫外可視分光法および電子スピン共鳴法 (EPR) を用いて検証した。

Gm HO1 のアミノ酸配列を他の生物種と比較すると、高等植物同士(*A. thaliana HO1*)では 72%の高い相同性を示した。一方、哺乳動物(*Rat HO1*)やシアノバクテリア(*Synechocystis sp. PCC 6803 HO1*)との相同性はかなり低かった(それぞれ、22, 23%)。しかし、NPS@ (Network Protein Sequence Analysis)を利用した 2次構造の推測では、*Gm HO1* も 8本の α -ヘリックスから構成され、 α -ヘリックスを形成するアミノ酸の位置は結晶構造が知られている哺乳動物やシアノバクテリアの位置とほぼ同じという結果が得られた。また、ヘムの近位配位子については、*Rat HO1* や *SynHO1* で保存されている His に対応する位置には Lys が相当するので、それよりも 13 残基前の His-30 ではないかと予想された。

ヘム滴定によって、*Gm HO1* とヘムは *Rat HO1* や *Syn HO1* の場合と同じように 1対1で結合することが確認された。また再構成した heme-*Gm HO1* 複合体は中性溶液では 6配位高スピン状態であり、また、還元型、酸素化型および CO 結合型の分光学的特徴は、*Syn HO1* と *Rat HO1* のヘム複合体と類似していた。heme-*GmHO1* 複合体の吸収スペクトルは pH に依存して 6配位高スピンから低スピン状態(アルカリ型)に可逆的に変化し、この変化は EPR においても確認された。よって、ヘム鉄の第 6 配位座に水分子が配位しており、この酸解離指数は $pK_a = 8.2$ と決定された。この pK_a 値は *Rat HO1*(7.6)と *Syn HO1*(8.9)の間であるため、ヘムポケットの極性も中間的ではないかと予想された。アルカリ型の g 値は *Rat HO1* や *Syn HO1* のアルカリ型のものと同様であった。還元型 heme-*Gm HO1* 複合体に ^{15}NO を配位させたニトロシルヘム複合体の EPR スペクトルは、 g_2 成分に ^{15}NO の ^{15}N 核($I = 1/2$)と近位配位子の ^{14}N 核($I = 1$)による超微細分裂が確認された。したがって、*Gm HO1* においても近位配位子は His であることが強く示唆された。これを確認するため、近位配位子の候補と考えられる His-30 を Gly に置換した H30G 変異体を作成しそのニトロシ

ルヘム複合体の EPR を測定したところ、 ^{15}N 核のシグナルのみが確認され heme は 5 配位型であった。この結果から、Gm HO1 の近位配位は His-30 であると決定された。

高等植物のヘム分解機構を明らかにするために、まず酸素分子の活性化に必要な電子の供与系を検討した。シアノバクテリアの HO 反応の電子供与体と報告されている NADPH/フェレドキシン還元酵素 (FNR) /フェレドキシン (Fd) を用いたヘム分解反応では、速やかにヘム分解反応が起こり、最終生成物も HPLC 分析でビリベルディン IX_a であることが確認された。速度論的解析では、ヘム分解の初速度は還元系で異なり、NADPH/FNR/Fd では Syn HO1 と同等の活性を示したが、アスコルビン酸では Syn HO1 よりも 3 倍速く、Rat HO1 より約 3 倍遅いことがわかった。したがって、高等植物の HO は NADPH/FNR/Fd を生理学的な還元系として用いていることが強く示唆された。しかしこの反応の過程では、オキシヘムの特性吸収帯(540, 579 nm)は観察されたが、ベルドヘム、CO-ベルドヘムに対応する特性吸収帯は観測されず、660nm に極大吸収を持つ吸収帯が観測された。また、H30G 変異体ではヘム分解反応は起こらなかった。このように、Gm HO1 のヘム分解の化学機構は Rat HO1 の反応とは異なるのではないかという疑問が生じたので、ヘム分解反応で CO が放出されるか、また、660nm の特性吸収帯を示す反応中間体の帰属を試みた。まず、CO との親和性の高いミオグロビンの変異体(H64L)の存在下でヘム分解反応を行ったところ、CO-H64L の特性吸収帯(426 nm)が確認され、Gm HO1 の反応でもヘムから CO が放出されることが確認された。また、気相を高濃度の CO で置換した反応ではベルドヘム以降の過程が阻害されなかった。そのため、Gm HO1 の反応ではベルドヘムが生成しないか、あるいは CO 親和性が極めて低いことが考えられた。そこで、ヘムからベルドヘムまでの反応をサポートすることが知られている過酸化水素を用いて、反応中間体(660 nm)化学種の同定を行った。嫌気条件下でヘム分解を行い、得られた生成物をアセトン溶液で抽出しその光吸収スペクトルを Rat HO1 や Syn HO1 のヘム分解反応抽出物のものと比較したところ同様であることが確認され、Gm HO1 でもベルドヘムが生成していることが確認された。しかし、Gm HO1 のヘムポケット内のベルドヘムの状態は他の HO 内とはかなり異なっており、CO 親和性が著しく低いことからベルドヘムの鉄イオンは他の HO 内より、さらに 3 価に近いと予想された。

高等植物 HO と Rat HO1 中でのベルドヘムの配位状態の違いの原因を明らかにするために、それぞれ酸素・還元系と H₂O₂ を用いたヘム分解反応を行い比較した。酸素分子による反応では、Gm HO1 の反応の EPR では 6 配位低スピン状態のヘム誘導体が確認され、同一サンプルの光吸収スペクトルを測定したところ 660 nm に特性吸収を示し、この低スピンヘム誘導体が鉄(III)-ベルドヘムであることが確定した。一方、Rat HO1 の反応では常磁性のベルドヘムは検出されなかった。これに対して、H₂O₂ の反応では両者とも 6 配位低スピン状態のベルドヘムが確認された。これらの結果から、H₂O₂ の反応では両者のベルドヘム鉄に過酸化物イオンまたは水酸化物イオンが配位し、6 配位低スピン状態のベルドヘムを安定することがわかった。Gm HO1 では、遠位側のアミノ酸残基がヘム鉄に配位した水と相互作用しやすい配置を取っており、ポルフィリン環の第 2 の酸素化の際に解離する水分子を水酸化物イオンとしてベルドヘムに配位させ Fe(III)状態を安定化していると考えられる。

以上のことから、高等植物由来 Gm HO1 は既知の HO とのアミノ酸の相同性は低いが HO 活性を持ち、ヘム分解反応にはヘム近位配位子 His-30 が必要不可欠であり、中間反応過程では CO が放出され、中間体としてベルドヘムが生成すること、しかし、ベルドヘムにはヘムポケットの遠位側のアミノ酸残基が直接または間接的に配位し、ベルドヘムの鉄(III)状態を安定化させることで CO との親和性を低下させていることが明らかになった。さらに、本研究によって、これまで意見が分かれていた異なる HO タンパク中でのベルドヘムの電子状態の違いの原因が明らかにされた。