

## 学位論文審査の結果の要旨

|   |  |
|---|--|
| 氏名  | 合屋知彦   |
| 審査委員  | 主査 右田 たい子 (印)<br>副査 小崎 紳一 (印)<br>副査 森 信寛 (印)<br>副査 澤 嘉弘 (印)<br>副査 山田 守 (印)   |
| 題目  | Coordination structure and heme degradation mechanisms of a higher plant heme oxygenase-1 from <i>Glycine max</i> (soybean)<br>(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) |
| 審査結果の要旨   |  |
| <p>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化分解により、2つの中間体(<math>\alpha</math>-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。哺乳動物や病原バクテリア HO の結晶構造解析により、HO は8本の<math>\alpha</math>-ヘリックスから構成されており、ヘムは2つのヘリックスから成るポケットに結合し基質となると同時に、酸素を活性化する補欠分子族ともなる。</p> <p>哺乳動物における HO の主な役割は老廃ヘムの分解による鉄のリサイクルであるが、シアノバクテリアや植物では、HO 反応の最終産物ビリベルディンが光応答色素の原料となる。本研究では、<i>Gm HO1</i> 合成遺伝子を大腸菌で発現させて得たダイズ(<i>Glycine max</i>)の HO タンパク (<i>Gm HO1</i>) について、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 (ESR) を用いて解析した。</p> <p><i>Gm HO1</i> のアミノ酸配列は他の生物種との相同性は低いが、2次構造を推測すると他の HO と同様のヘリックス構造を構成することが示された。アミノ酸配列比較では、ヘムを配位結合する近位配位子についてはラットやシアノバクテリア HO1 (以後 Rat HO1、Syn HO1 と表記) で保存されている His に対応する位置には Lys が対応する。</p> <p>ヘム滴定によって、<i>Gm HO1</i> のヘム結合比は1であることが確認された。ヘム-<i>Gm HO1</i> 複合体は中性では6配位高スピン状態でありヘムのさまざまな状態の分光学的特徴は、既報 HO の複合体と類似していた。ヘム複合体は酸解離平衡 (<math>pK_a = 8.2</math>) を示し、ヘムの第6配位子は水分子であることが確認された。この値は Rat HO1 (7.6) と Syn HO1 (8.9) の中間であるため、ヘムポケット内の極性も中間的ではないかと予想された。還元型ヘム複合体に <math>^{15}\text{N}_2\text{O}</math> を配位させたニトロシルヘム複合体の ESR から <math>^{15}\text{N}</math> 核による超微細分裂が確認されたことから、<i>Gm HO1</i> 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。近位配位子の候補となる His-30 を Gly に置換した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、<math>^{14}\text{N}</math> 核のシグナルのみが確認されヘムは5配位型であった。よって <i>Gm HO1</i> の近位配位は His-30 であると決定された。</p> |  |

Gm H01 による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。Syn H01 での電子供与体 NADPH/フェレドキシン還元酵素/フェレドキシンを用いると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<sub>α</sub>であることが確認された。速度論的解析から Syn H01 と同等の活性があることがわかり、生理学的な還元系が同じであることが強く示唆された。ヘム分解反応を分光法で追跡すると、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。ヘム分解の化学機構が既報の H0 と同じかどうかを検証するために、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 の吸収 (423 nm) が観察されヘムから CO が放出されることが確認された。また高濃度の CO 下で行っ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 H01 の反応ではベルドヘムが生成しないかあるいはベルドヘムの CO 親和性が極めて低いことが考えられた。そこで、酸素/電子に代わってヘムからベルドヘムまでの反応を起こすことができる過酸化水素を用いて嫌気条件下でヘム分解を行い、反応中間体 (660 nm 種) をアセトン溶液で抽出し、その光吸収スペクトルを Rat H01 や Syn H01 のヘム分解反応抽出物のものと比較した。この結果同じスペクトルが得られ、Gm H01 でもベルドヘムが生成していることが確認された。Gm H01 ヘムポケット内のベルドヘムの状態は他の H0 内とはかなり異なっており、また CO 親和性が著しく低いことからベルドヘム鉄は 3 価に近いと予想された。〈FEBS Journal, 273 (2006), 5384-5399〉

高等植物 H0 と Rat H01 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H01 の反応の ESR では 6 配位低スピン状態のヘム誘導体が確認され、その光吸収スペクトルが 660 nm に特性吸収を示したことから、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 H01 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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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。したがって、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の反応では両者のベルドヘムに過酸化物イオンまたは水酸化物イオンが配位し、6 配位低スピン状態を安定することがわかった。Gm H01 では、遠位側の特定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。〈Biochemical Biophysical Research Communications, 376 (2008), 293-298〉

以上のことから、高等植物由来 Gm H01 タンパクは既知の H0 とのアミノ酸の相同性は低いが H0 活性を持ち、His-30 でヘムを結合しフェレドキシンを直接の電子供与体としてヘムを  $\alpha$ -meso 特異的にビリベルディンへ分解し、中間反応過程では CO が放出しベルドヘム中間体が生成することが示された。しかし既知の H0 とは異なり、ヘムポケットの遠位側のアミノ酸残基が水分子の鉄 (III) ベルドヘムへの配位を安定化し、CO との親和性を低下させていることが明らかになった。本研究によって、これまで意見が分かれていた異なる H0 タンパク中でのベルドヘムの電子状態の違いの原因も明らかにされた。