特集:タンパク質の化学構造から生物機能に迫る

反応中間体の構造から見たヘムオキシゲナーゼの反応機構

海野昌喜,齋藤正男

ヘムオキシゲナーゼ (HO) は3段階酸素添加反応によりヘムを分解し,一酸化炭素・ 鉄・ビリベルジンを生成する酵素である.HOの生理機能は多岐にわたり,様々な生物に おいて重要な役割を担っている.基質であるヘムの結合はその結合部位に構造変化を誘起 し,ヘム遠位側空間には水分子クラスターが形成される.ヘム鉄に結合する酸素は,その 水分子クラスターと遠位ヘリックスとの水素結合で安定化され,ヘムのα-メソ-炭素方向 に向け Fe-O-Oの角度が110°となるように配向する.HO はヘムを活性中心として酸素 を活性化するが,多くの酸素添加酵素の活性種である Compound I を生成せず,ヒドロペ ルオキソ活性種がヘム自身を水酸化するという特異な反応を行う.ヒドロペルオキソ種の 生成・活性化,ヘムの水酸化,ポルフィリン開環反応なども,HO 独特の Gly に富んだ柔 軟な遠位ヘリックスとヘム遠位側の水分子クラスターにより,高度に制御されている.

1. はじめに

ヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase; HO) は,3段階 の酸素添加反応によりヘムを分解し,鉄イオン・一酸化炭 素 (CO)・ビリベルジンを生成する酵素である¹¹(図1). この酵素反応は,内出血時に変色として直接見ることがで き,我々にとってなじみ深いものであるうえに,ヘムの代 謝や鉄の恒常性維持という役割の一端を担う必要不可欠な ものである². また,ビリベルジンとそれが還元されたビ リルビンの抗酸化作用や,COによるシグナル伝達など, 呼吸・血圧調整・神経細胞保護・細胞死にも HO が深く関 与することが報告されている^{1.3}.

この酵素は酸素添加酵素であるにも関わらず,酸素活性 化のための補欠分子族を含んでいない.しかし,一旦基質 であるヘムを取り込んだ後は,P450やペルオキシダーゼ などの多くのヘム酵素と同様に,ヘムを活性中心として酸

素を活性化する. 基質を補欠分子族として用いその補欠分 子族を分解する、他に類を見ないこの酵素独特の酸素活性 化機構・ヘム分解機構を解明することは、「化学」という 観点からも非常に興味深い.ヘムを活性中心とするオキシ ゲナーゼが多数ある中で, HO がヘム分解という特異な反 応を行うのは、HO タンパク質と基質であるヘムで構成さ れる活性中心の構造に秘密があるに違いない. ゆえに, HOの機能や反応機構を理解するには、HO タンパク質、 HO タンパク質-基質複合体,HO 反応中間体,HO タンパ ク質-生成物複合体などの構造とそれらの間の構造変化を 原子レベルで解明することが重要である. そのための有効 な手段の一つとして, X線結晶構造解析が挙げられる.し かし、タンパク質のX線結晶構造解析では、水素原子が 同定できない、電子状態がわからないなど、反応機構を論 じる上で不利な点もある. そのため我々は, 遺伝子工学的 手法、各種分光法、反応解析など多元的な手法を駆使する ことにより、反応機構の解明に取り組んできた.

本総説では,我々の研究成果で論文未発表の結果をでき るだけ盛り込み,特に HO 酵素反応中間体の結晶構造を中 心に,それらから考えられる HO のヘム分解反応機構につ いて概説する.

東北大学多元物質科学研究所(〒980-8577 仙台市青葉 区片平 2-1-1)

The crystal structures of heme oxygenase catalytic intermediates unravel the enzyme mechanism

Masaki Unno and Masao Ikeda-Saito (Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, 2–1–1 Katahira, Aoba, Sendai 980–8577, Japan)



ヒドロキシヘム

図2 P450 とヘムオキシゲナーゼの反応の分岐 それぞれの触媒反応において、両者とも共通の反応中間体ヒドロペルオキ ソ型ヘムを経由するが、P450 では、続くプロトン化により Compound Iを 生成し活性種となるのに対し、ヘムオキシゲナーゼでは Fe³⁺-OOH が活性 種であり、末端の OH がヘムのメソ位を水酸化し、ヒドロキシヘムを生成 する.

2. HO の多様な生理機能

哺乳類には、熱ショック・酸化ストレス・ヘムそのもの など様々な要因が発現の誘導因子となる「誘導型」HO-1 と、強力な誘導因子がない「非誘導型」HO-2という2種 類のHOのアイソザイムが存在する.HO-1,HO-2両者と も細胞防御に重要であるが⁴⁾,HO-1は主に脾臓や肝臓に高 発現し、不要になったヘムを分解する役目を担い,HO-2 は主に脳や精巣に高発現し、神経伝達や酸素センシングを 行うと考えられている^{3.5)}.

HOは、動物にだけでなく、植物や細菌など様々な生物 に存在する.植物の光受容体タンパク質のクロモフォア部 分を構成するフィコエリトロビリンやフィコシアノビリ ン、フィトクロモビリンなどは、HO反応生成物であるビ リベルジンから作られる^{6~8)}.また,病原性細菌では,生存・増殖に不可欠な鉄を得るために,宿主から奪ったへムを HO が分解し,毒性の発現とも密接に関連している⁹⁾.

3. HO の 反 応

HOによるヘム分解反応は酸素 3 分子と 7 電子を使って 多段階の反応中間体を経て進行する¹⁰⁰(図 1).まず HO は 酸化型(Fe³⁺) ヘムと複合体を形成し,外部から与えられ る電子により還元型(Fe²⁺)に変換する.酸素はその還元 型ヘムに結合し,酸素化型(Fe²⁺-O-O)を形成する.そ の後さらなる一電子還元とプロトン化により,HO は P450 などと同様に中間体としてヒドロペルオキソ型(Fe³⁺-O-OH)を生成する.P450 などではその後のプロトン化によ り酸素の O-O 結合が不均一分解され,Fe(IV)=O ポル フィリンラジカル種 (*Compound I*) が生成し,これが活 性種となるのに対し,HOではヒドロペルオキソ型中間体 が活性種であり,さらなるプロトン化の結果,へムの位置 選択的水酸化反応でα-メソ-ヒドロキシへムを生成する (図 2).

α-メソ-ヒドロキシヘムに酸素が添加すると, α炭素が COとして放出され,ベルドヘムが生成する. HO 自身に より生成される CO が HO 反応を致命的に阻害しないこと もこの酵素の興味深い特徴の一つである.

最後の酸素添加反応では、まずベルドヘムのα-位が酸素により開環し Fe³⁺-ビリベルジン錯体となり、続いて鉄の還元と放出によりビリベルジンが生成する.

最後に、生成物ビリベルジンが酵素から放出され、HO は再び基質(ヘム)の結合に備える.

4. ジフテリア菌由来の HO, HmuO の結晶構造解析

HmuOは、哺乳類以外の生物から初めてタンパク質とし て精製された、ジフテリア菌 Corynebacterium diphtheriae 由来の HO である.哺乳類の HO が C 末端に 20 残基程か ら成る疎水性領域を持ちミクロソーム膜に結合しているの に対し、HmuO は可溶性タンパク質である.215 アミノ酸 残基から成る HmuO とヒト HO-1 の 221 残基の可溶性部分 とは一次配列が 33% 同一(identity)であり、同定されて いる4種の病原性細菌 HO の中で、哺乳類のものと最も似 ている¹¹⁾.また、HmuO は哺乳類の HO と同様の反応機構 でヘムを分解する¹²⁾.

ヘム結合型 HmuO の結晶は、物理的に強く、回折能も 高い.高分解能で解析された HmuO の構造は、哺乳類由 来の HO-1 の構造と類似している^{13~15)}.また、非対称単位 には3分子の HmuO が含まれており、周辺環境が異なる それらの構造を比較することで、細部の構造や構造変化の 重要性を考察できる.このような経緯から、我々は、 HmuO を用いて HO 反応中間体構造の研究を進めてきた.

5. 酸化型ヘム-HmuO 複合体の構造

5.1 全体構造

HmuOは,結晶構造が報告されている他の生物由来の HOと同様に,αヘリックスとそれらをつなぐループ構造 のみからなる球状のタンパク質である(図3A).ヘムは, 近位ヘリックスと遠位ヘリックスと呼ばれる2本のヘリッ クスによって挟み込まれている.ヘムに結合する軸配位子 は近位ヘリックスにある His20(哺乳類 HO-1 の His25 に 相当)である.

近位へリックスと遠位へリックスには、αヘリックスの 理想的なジオメトリーから大きく外れている個所があり、 それぞれを折れ曲がった1本のヘリックスと称するか短い ヘリックスの連続構造と称するかは意見の分かれるところ かもしれない(図3A).近位へリックスは,Thr16 側鎖の 水酸基とLeu12の主鎖カルボニルとの水素結合により, 弓状に曲がっている.一方,遠位へリックスには保存性の 高いGlyに富んだモチーフ(-YLGDLSGGQ-)があり,遠 位へリックスを大きく折り曲げる要因となっている.

ペルオキシダーゼやグロビンとは異なり,HOには,結 合したヘムの遠位側すぐ近辺にHisやArgなど極性残基が 存在しない.しかし,遠位ヘリックスのGly135(哺乳類 HO-1のGly139)の主鎖のカルボニル基やGly139(哺乳類 HO-1のGly143)の主鎖のアミド基がヘムの近くに存在し, 酸素の結合を安定化する(後述).

5.2 ヘム遠位側の水素結合ネットワーク

HOでは、結合したヘムの遠位側に水分子のクラスター があり、水素結合ネットワークを形成する(図 3B).この 水素結合ネットワークは、HmuOでは、遠位ヘリックス上 にある Asp136(哺乳類 HO-1の Asp140に相当)を経由し て、活性中心から分子表面まで続いている¹⁵⁾.

HmuOでは、Asp136 を疎水性の残基に変異すると、四 価のフェリル種が生成されるようになり、ヘム分解活性が 低下する。例えば、D136A 変異体を過酸化水素で反応さ せた場合、約 50% が四価のフェリル種になり、D136F 変 異体ではそれが 80% 以上になる¹⁶. Asp136 変異体では、 ヒドロキシヘムが生成されにくくなっていると考えられ る.

D136A 変異体の結晶構造解析では,野生型 HmuO で配 位水の一番近くに存在していた水分子(最近隣水分子,図 3B)に相当する電子密度が明瞭に見られなかった.つま り D136A 変異体では,その水分子の存在確率が低いか可 動性が高く不安定であるということを示している.また, 共鳴ラマン分光法では,D136F 変異体の最近隣水分子が ほぼ完全に消失していることが示唆されている.一方で活 性がほとんど低下しない D136E 変異体 HmuO の結晶構造 では水分子の消失は見られなかった¹⁶.

これらから, HO が α-メソ-ヒドロキシヘム中間体を適 切に経てビリベルジンを生成するには、ヘム遠位側の水素 結合ネットワーク,特に最近隣水分子の存在とその安定性 が重要なことが示された¹⁶.

5.3 ヘムの結合様式とヘム分解の位置特異性

HOでは、軸配位子の His を Ala に変異してもへムは結 合する¹⁷⁾.これは、ヘムの片方のプロピオン酸が Arg177 や Tyr130 (哺乳類 HO-1 では Arg183 と Tyr134) と水素結 合を形成して、強く結合するためだと考えられる(図 3C). ヘム結合部位周辺のいくつかの Lys 残基(Lys13 や Lys173) が、基質であるヘムをポケットに近づけるために誘引的な 役割を果たしていそうだが、ヘムのもう一方のプロピオン

表1 ヘム非結合型 HO 構造の分解能と結晶学的 R 値^{22~24)}

	ラット HO-1	ヒト HO-1	Cys 削除型ヒト HO-2	HmuO
分解能 (Å)	2.55	2.16	2.30	1.80
R/free-R	0.202/0.307	0.217/0.262	0.201/0.253	0.175/0.215

酸やそれら Lys が非対称単位中3分子で異なるコンフォ メーションをとっていることから、一方のプロピオン酸と HO タンパク質とのヘム結合後の相互作用はあまり強くな いと言える.また、ヘムα-メソ-炭素の周辺には、疎水性 残基が集中している(図 3C)¹⁵.

非対称構造を持つへムは裏表の二つの結合様式をとり得 るため、 β 位や δ 位の位置は入れ替わることができる^{18,19}. しかし、HOにとってそれは大きな問題ではない.切断す るべきは α -メソ位であり、ヘムの一方のプロピオン酸が Arg177 と Tyr130 と結合し、His20 がヘム鉄に配位するの で、裏表には関係なく α 位と γ 位の位置は一義的に決ま るからである(図 3C).

緑膿菌 Pseudomonas aeruginosa 由来の HO である PigA は、例外的にヘムの δ -メソ位を開環する²⁰⁾. PigA では、 HmuO の Arg177 や Tyr130 に相当する部位に疎水性アミノ 酸の Trp158 と Phe117 が存在する.また、HmuO で疎水性 アミノ酸が集中して壁を形成している領域に、PigA では Lys132 が存在し、一方のプロピオン酸と水素結合を形成 する.その結果、PigA に結合したヘムは、他の HO に結 合したヘムに対し、約 100° 回転している²¹⁾.

へムの位置特異的分解には、ヘムが正しい位置に正しい 配向で結合することが重要であり、そのために、ヘム結合 ポケットの形状や特徴的なアミノ酸の配置などが大きく寄 与している¹⁰.

以上に述べてきた HO の構造的な特徴は,反応中間体構 造と機能を論じる上で重要なので,最初に記した.

6. 基質結合機構

我々は、基質非結合型 HmuO の 1.8Å分解能構造解析を 既に終えている(投稿準備中).その構造で最も目立つ特 徴は、近位へリックスのアミノ酸 21~23 がもはやへリッ クス構造をとらず、近位へリックスがへム結合型に比べ一 巻き半短くなっていることである.短くなったへリックス は湾曲がなく、そのため、His20 はへムが結合する部位か ら大きく離れている.また、遠位へリックスの Gly に富ん だ領域から後半が、へム結合ポケットを開く方向に移動し ている.しかし、Tyr130 や Arg177 の位置はへム結合型の それらとほとんど同じである.へムの結合前後でのポケッ トの大きな構造変化は、Arg177 や Tyr130 とは反対側に集 中している(図 4).よって基質非結合型 HmuO は、漏斗 のように一方に大きな入口を作る形になっている.また、 基質非結合型 HmuO のヘム結合ポケットにはいくつかの 水分子の存在が認められた.その配置は前述したヘム結合 型の水分子クラスターの配置とは異なっており,ポケット を形成するアミノ酸との水素結合で保たれている.

以上の構造から,HmuOは次のような機構でへムを結合 すると考えられる.最初にヘムのプロピオン酸置換基が Tyr130やArg177に捕えられ,その後His20がヘム鉄に配 位するように動き,近位ヘリックスはやや不規則な湾曲し たヘリックス構造に変わる.ループ状の構造がヘリックス 構造を形成することで,第二ヘリックスやそれと相互作用 する遠位ヘリックスもヘム側に引き寄せられ,ポケットを 閉じるようになる(図4).ポケットを形成するアミノ酸 残基との水素結合で保持されていた水分子も動き,クラス ター構造を形成する.基質の結合により,活性に必要な構 造が完成すると考えられる.

ヘム非結合型 HO のヘム結合ポケットがやや開いている ということは,既に哺乳類 HO の構造で報告されてい る^{22~24)}.しかし,それらの構造では,HmuO に見られたよ うな近位ヘリックスの脱湾曲や水分子の再配置などは観測 されていない.報告されている基質非結合型の哺乳類 HO の構造は,分解能が高くなく,結晶学的 R 値が高い (表 1).分子置換法での構造決定では,初期モデルのバイアス がかかり,電子密度図が初期モデルに寄ったものになりや すい.特に実験データが "弱い"(観測された反射数が精 密化パラメータ数に対して不十分=分解能が低い)場合は 位相が改良されにくく local minimum から逃れられない場 合もある.基質非結合型哺乳類 HO の場合,ヘム結合型 HO-1 構造からヘムを取り除いたものを初期モデルとして いるので,その構造の影響を受けている可能性もあること を念頭に置いておくべきだろう.

7. ヘム鉄の還元

我々が解析した1.5Å分解能の還元型ヘム-HmuO 複合 体の構造では、ヘム鉄が5配位高スピンになるためヘム平 面から軸配位子の His20 方向に約0.2Å外れた構造をして いた.5配位の還元型では、酸化型で鉄に配位していた水 分子が無くなり、遠位ヘリックスがその空いた空間を埋め るようにヘムに近づき、結果としてヘム遠位側の空間は狭 くなる^{10,15)}.



図3 ヘムオキシゲナーゼ HmuO の構造的特徴

(A)全体構造.(B)ヘム遠位側の水分子クラスターとAsp136.シアンの球が水分子を 表している.(C)ヘム結合部位と相互作用に寄与しているアミノ酸残基.ヘムが αγ-メソ-炭素軸の周りに180 度回転しても α-メソ位の位置は変化しない.



図4 ヘム結合時の HmuO の構造変化 ヘム非結合型 HmuO (シアン)と酸化型ヘム結 合 HmuO (赤)構造の重ね合わせ.オレンジは 酸化型のヘムを表す.ヘムが結合すると近位側 にあるゆるんだループ構造がヘリックス構造を 形成し,長い湾曲したヘリックスとなる.この 構造変化により第二ヘリックスが引き寄せら れ,それと相互作用する遠位ヘリックスも引き 寄せられる.全体的にポケットを閉じる構造変 化となる.水分子などは明瞭化のため図から省 略した.



図5 酸素化型中間体, CO 結合型ヘム-HmuO 複合体の構造

(A)酸素分子は遠位ヘリックスの Gly135 と Gly139 により覆われ、ヘムのα-メソ位方 向に向けられている.ピンクは酸素分子を表し、Gly135 と Gly139 と共に CPK モデ ルで描かれている.(B)酸素は 110°の傾きを持ってヘム鉄に結合し Gly139 の主鎖ア ミド及び最近隣の水分子と水素結合を形成する.(C) CO 結合型ヘム周辺の 1.5Å分 解能電子密度図.緑色で描いた籠状の図は、CO と水分子をモデルに入れずに計算し た F₀-F₀ 差フーリエ図.(D) CO 結合型のヘム周辺の構造.CO は周辺のアミノ酸や水 分子と水素結合を形成し得ない.また、遠位ヘリックスは酸素化型や還元型に比べて 開いた構造をとる.この遠位ヘリックスの構造は酸化型のものと類似している.



図6 ヒドロキシヘム周辺の構造と推定される生成機構

(A) 左回りのルートは Shaik らによって提案されている, ・OH ラジカルが水分子に制御され速やかに α-メソ-炭素と反応する機 構³⁴⁾. 右側のルートは結晶構造から可能であると考えられる,低温で固定されている遠位へリックスとヒドロペルオキソ型ヘムが, 温度上昇により離れることで,水分子がヘム鉄結合 O 原子にプロトンを供与することが可能になる機構.(B) ヒドロキシヘムの鉄に は水分子が配位し,その水分子は,遠位側の水分子クラスター中の最近隣水分子と水素結合を形成している.赤球が水分子を表す.







-e3

С

図7 Fe³⁺-ヒドロキシヘムの共鳴構造 Aの中性ラジカル種が酸素と反応する と考えられている.共鳴ラマン散乱と 結晶解析はBのオキソフロリン構造 が優先種であることを示す.



図8 ビリベルジン周辺構造と鉄の解離機構

(A)ビリベルジンの結合様式.水色の球が水分子.ビリベルジンはヘムと同じように一方のプロピオン酸が Arg177 や Tyr130 と相互 作用している.また、ラクタム酸素の一方が、遠位側水分子と水素結合し、ピロール環の二つのN原子が水分子を介して His20 と 水素結合でつながっている.(B)Fe³⁺-ビリベルジンが還元されると His20 が離れ、鉄が解離し、その空間を埋めるように水分子が入 り込む.

8. 酸素結合

ヘムタンパク質に高い輝度の放射光を照射すると、低温 でも金属の還元反応や予期せぬ副反応が起こってしまうこ とがある.この現象は1980年代から提唱されてきたが²⁵⁾, 結晶構造解析においては最近までそれほど注意が払われて こなかった.2002年のHajduらによる西洋わさびペルオ キシダーゼ(HRP)の中間体の結晶構造解析においては, 回折強度データ収集中の単結晶のスペクトル変化と,X線 照射量に応じての活性中心の構造変化が示された.例え ば,酸素結合型HRPへのX線照射量が増えると,へム鉄 に結合した酸素分子のO-O結合が切れることが明らかに なり,へム酵素中間体構造解析におけるX照射還元反応 の影響の重大さが提言された²⁶⁾.

そこで、酸素化型の回折強度収集実験では、X 照射還元 反応をできるだけ抑えるため、入射光路中にアルミニウム の減衰板を挿入して輝度を落とすこと、検出器として読み 取り速度の遅いイメージングプレートを使用し、放射光の 非照射時間を長くして結晶の温度上昇を防ぐことなどの工 夫をした.また、回折実験前後で結晶の吸収スペクトルを 測定し、酸素化型以外の種の混合がほとんど無いことの確 認を行い、1.85Å分解能の酸素化型中間体の構造解析に 至った²⁷⁾.この経験を生かし、現在では1.65Å分解能での 構造解析も完遂している(論文未発表).

酸素は、ヘム鉄の還元によりヘムに近づいた遠位ヘリッ クスの Gly135 と Gly139 によりすっぽりと挟み込まれ、 O-O の結合軸のヘム平面への投影がヘムの α-γ-メソ-炭素 軸とほぼ一致するように方向を限定されている(図 5A). 末端側の O 原子が Gly135 の主鎖カルボニル基とのファン デルワールス相互作用により抑えつけられ、Fe-O-O 結合 角が約 110°と、今までに高分解能で決定された酸素結合 型ヘム関連タンパク質のジオメトリー(120°~145°)より 有意に小さな値となっている.この特徴的な酸素結合ジオ メトリーは、結晶構造だけでなく溶液の共鳴ラマン分光法 でも見られている^{27,28)}.結合した酸素分子の末端 O 原子と ヘム α-メソ-炭素との原子間距離は約 3.5Åと相互作用が 可能な距離に近づく(図 5A, B).

結合した酸素分子は、Gly139の主鎖アミドとの水素結 合と最近隣水分子との水素結合により安定化されている (図5B).この二つの水素結合により、酸素の解離速度は ミオグロビンのそれと比較して非常に遅く、酸素の高い親 和性を実現している²⁷⁾.対照的に、我々が解析した1.5Å 分解能 CO 結合型ヘム-HmuO 複合体の構造では、Gly135 が CO との衝突を避けるように動くため、遠位ヘリックス が大きく構造変化しており、CO は周辺のアミノ酸や最近 隣水分子と水素結合を形成していない(論文未発表、図5 C,D).ラット HO-1 の解析でも類似の傾向が見られてい る²⁹⁾. CO の解離・会合速度や親和性は、ミオグロビンの それらと同等である. 結合した酸素は水素結合により安定 化されるが、CO は安定化されない. よって、HO は自身 で生成する CO によりその反応を致命的に阻害されない.

9. ヒドロペルオキソ型ヘム・ヒドロキシヘム中間体

ヒドロペルオキソ型中間体は非常に反応性が高く,液体 窒素温度下において酸素化型中間体 HO 凍結溶液に²²P や⁶⁰Co からのβ線やγ線を照射することで捕捉・同定され た中間体である^{30,31)}.この中間体は,HO 反応の活性種で あり,P450 など他のヘム酵素の反応との分岐点になって いる(図2).そのため,HO 反応が起こる謎を明らかにす るには,この構造を明らかにすることこそが最も重要であ る.

Schlichiting, Petsko, Sligar らによる P450cam の反応中 間体の結晶構造解析は、方法論として非常に興味深い. 凍 結溶液の場合と同じように、結晶の中で酸素化型中間体を 低温で捕捉しておき、X線による還元反応で次の反応中間 体を捉えるというものである³²⁰. この方法を有効に活用 し、目的中間体を捕捉・構造解析するには、その生成と純 度(結晶内占有率)をモニターする方法が必要であり、結 晶用顕微分光光度計の利用が不可欠である. ただし、一般 にヘムタンパク質の場合には 400nm 付近のソーレー帯は 吸光係数が~100mM⁻¹cm⁻¹と非常に大きく、吸収スペク トルの測定は結晶では不可能であるので、ヒドロペルオキ ソ型中間体の生成は 450~750nm のスペクトルで判断せざ るを得ない.

我々は、吸収スペクトルを観測しながら、HmuO酸素化 型結晶にシンクロトロン放射光を100Kで照射し、結晶内 でヒドロペルオキソ型中間体の生成を行った.紙面の都合 上詳細は省くが、過度の放射光照射では副反応が起こるた め、一つの結晶から構造解析に必要な回折強度データを収 集することが不可能であり、同系の結晶 20 個それぞれの データの一部を統合して1セットの回折強度データとし、 ヒドロペルオキソ型中間体の構造解析に成功した(論文未 発表).

得られた構造は、Fe-OやO-Oの距離がやや伸び、Fe-O-Oの角度がわずかに小さくなるが、基本的に酸素化型 と変わらない。His20はイミダゾール面をヘムのβ-δメソ 軸とほぼ平行にした"staggered"コンフォメーションを保っ ており、ヒドロペルオキソとイミダゾールのπ軌道が鉄 の*d*_{xc}, *d*_{yc}軌道と垂直になっている^{15,27)}。そのため、His20 イミダゾールからの"push effect"が減少し、O-O 結合を 安定化することでフェリル種の生成を妨げている³³⁾。これ が「低温での」ヒドロペルオキソ型の構造である。ただし、 この構造では、ヒドロペルオキソは二つの Gly 残基により 周囲を覆われているので、鉄に結合した O 原子側にプロ トンが受け渡されることは難しい(図 5A 参照). 末端側のO原子にプロトンが供与されると,通常はO-O 結合は不均一分解を起こし,水が解離し, Compound I が生成することが知られているので,この構造のみでは,HO がヒドロキシへムを生成する謎を説明できない.

しかし、最近の Shaik らの OM/MM 計算では、HO ヒド ロペルオキソ型中間体の O-O 間の均一分解で生じた・OH ラジカルが、ヘム遠位側にある水分子クラスターとヘムピ ロール環の窒素原子に制御され、速やかにα-メソ-炭素に 結合することが示されている³⁴⁾.この計算に用いられた初 期モデルは、我々が報告した HmuO 酸素化型構造の末端 O原子にプロトンを付加したものであり、現在我々が得て いるヒドロペルオキソ型構造とほぼ同じである. O-O 結 合の切断とO-Cmea 結合の生成は、エネルギーの障壁なし にほぼ同時に起こることから、この機構は、ヒドロペルオ キソ型中間体とヒドロキシヘム中間体の間に中間体が観測 されていない実験事実とも矛盾しない35). ヘム遠位側にあ る堅固な水分子クラスターの存在や近位 His イミダゾール の "staggered" コンフォメーション, ヘムのα-メソ-炭素 方向に大きく傾いているヒドロペルオキソの独特の結合様 式などのため、HOではヘムの水酸化が可能になる独特の 機構が考えられる (図 6A).

また,我々は,ヒドロペルオキソ型中間体生成直後に結 晶の温度を一瞬上げることで,メソ-ヒドロキシヘム中間 体を捕捉することに成功し,結晶構造解析を行った(論文 未発表).この方法でα-メソ-ヒドロキシヘム構造が得ら れたことは,酸素化型中間体に放射光を照射したときに確 かにヒドロペルオキソ型中間体が生成していたことの裏付 けにもなる.得られた構造では,ヒドロペルオキソ型と比 較して,遠位ヘリックスがヘムから離れる方向に動いてい る.また,ヒドロキシヘムの鉄は6配位構造をとってお り,配位した水が水分子クラスター中の最近隣水分子と水 素結合を形成している(図 6B).つまり,温度上昇により, 水分子クラスターが,ヘム鉄に結合したO原子にプロト ンを受け渡すことが可能な位置にまで移動しているという ことになる.

Shaik らは、前述の研究において、HOのヒドロペルオ キソ型中間体がヘムの水酸化反応をする時、ヘム鉄に結合 したO原子が非常にプロトン化されやすい性質を持つこ とも示している³⁴⁾. さらに、強い水素結合が簡単にパート ナーを替えることができること³⁶⁾や、水や Gly に富んだ遠 位へリックスの「常温での」可動性¹⁵⁾を考えると、鉄に結 合したO原子がプロトン化される機構も可能性の一つと して充分考えられる(図 6A).

ヒドロキシヘムは、図7に示す三つの共鳴構造をとる. 我々が得たヒドロキシヘムの構造ではα-メソ-炭素から突 出したO原子までの距離が1.25Åであることから、二重 結合を持つオキソフロリンの構造(図7B)が優先種であることが示唆される.そして,還元型中性ラジカル(図7A)が酸素分子を活性化して,酸素を付加し,COを放出することによりベルドヘムに代謝されると考えられる³⁷⁾.

10. ベルドヘム中間体

ラット HO-1 の Asp140 変異体では、ベルドヘムからビ リベルジンを生成する反応の活性が落ちる.また、この反 応は、CO やアジド (N_a^-) によって阻害される.ゆえに、 最後の酸素添加反応は、ヘムからヒドロキシヘムが生成す る第一段階と同じように、 O_2 がベルドヘムの鉄に結合し、 中間体としてヒドロペルオキソ種を経る機構で進行してい ると考えられる^{38,39}.

一方で、合成ベルドヘムを再構成したヒト HO-1 複合体 構造が報告されているが、ベルドヘム遠位側には水分子が 見られず、プロトンの供給経路は必要ないと考察されてい る.しかし、この構造の論文に掲載されているベルドヘム 周辺の電子密度図を見る限り、分解能 2.2Åにしては非常 に不鮮明であり、ベルドヘム側鎖の電子密度も見えな い⁴⁰⁾.後述するが、ヒドロキシヘム中間体だけでなくビリ ベルジン-HmuO 複合体結晶構造でも水分子クラスターは 保たれており、ベルドヘム中間体の時にだけ水分子が消失 することはいかにも不自然である.また、我々のグループ で進行中のベルドヘム-HmuO 中間体の構造解析では、ヘ ム遠位側の水分子クラスターの構造は保たれていることが 示唆され、最後の酸素添加反応がヒドロペルオキソ種を経 て進行するという上記の提案との一致を示している.

11. ビリベルジンの生成・放出

我々は、ビリベルジンの前駆体である Fe³⁺-ビリベルジ ン複合体を構造解析した(論文未発表). ラット HO-1の 中間体で示された構造⁴¹¹と類似しており、鉄と His20 は配 位結合をしている.一方、鉄は残っているが、His20 がそ の鉄から大きく離れている構造も得た.これは、Fe³⁺が還 元され Fe²⁺になり His20 が外れた構造ということになろ う.

ビリベルジンのラクタム酸素同士は立体的に同一平面内 に収まらないが, γ-メソ位は二重結合を含む sp² 混成軌道 になっているため,ビリベルジンの構造は平面構造から外 れてもその度合いは限られる.我々が解析した 1.85 Å分 解能のビリベルジン-HmuO 複合体構造解析では,鉄が放 出された後も,らせん状構造をしたビリベルジンが水素結 合によってヘム結合部位に保たれていることが明らかに なった(論文未発表).近位軸配位子であった His20Nε と ビリベルジンの二つのピロール環の N との間には一つの 水分子が存在し,水素結合を形成している.また,ビリベ ルジンの一方のラクタム酸素が,遠位水分子クラスター中 鉄の還元が,まず His20 の解離を起こし,その結果,鉄 が放出される.離れた His20 とビリベルジンとの間に水分 子が入り込み,それぞれと水素結合を形成し,ビリベルジ ンは結合部位に保持されると考えられる(図 8B).

最後にビリベルジンは HO から外れる. 当然, ビリベル ジンと相互作用している数々のアミノ酸残基や水分子クラ スター(図8A)の構造変化が起こる. その結果が, 基質 非結合型 HmuO の構造で示したように, ヘム結合ポケッ トを大きく開くような構造変化につながると考えられる. この漏斗のような大きく開いたヘム結合ポケットは, 新た な基質を結合するのに有利な構造である.

12. おわりに

この酵素は小さな構造変化と大きな構造変化をうまく組 み合わせ、基質であるヘムと周囲の水分子と酸素分子を 使って、ヘムをビリベルジンという生成物にまで変換して いく.特にヘム結合ポケットを形成する2本のヘリックス の可動性やヘム遠位側にある堅固な水分子クラスターが、 へムの結合、酸素の活性化、位置特異的ヘム分解反応、生 成物の放出などに重要な役割を果たしている.

HOによる酸素活性化機構やヘムの水酸化機構は,「原 子レベル」の結晶構造単独ではやはりまだ不明な点が多い が,分光学的手法を用いた研究の結果,変異体の反応解 析,更に理論計算などの結果を反応中間体の構造解析と組 み合わせることで,「電子レベル」・「水素原子レベル」の 情報が得られ,多くのことがわかってきた.特にHOで は,水素結合とプロトンの授受が酵素活性に重要で,X線 結晶構造解析以外の手法が必要であった.酵素反応を理解 するためには,このような多角的な手法による慎重な解析 が必要である.

X線結晶構造解析で得られる電子密度図は、実験データ (回折強度)と位相の組み合わせで表わされるものであり、 構築したモデルには解析する者の電子密度図の解釈も入 る.それゆえ、実験データの質や位相決定手法、そして構 築したモデルの化学的理想ジオメトリーからの誤差やモデ ルと実験値との差などは議論の対象にならなければならな い.反応機構や機能を解明するためには、基になる構造の 正確さが重要であり、そのため、構造の信頼性・正確性に ついての議論はもっと活発に行われるべきだろう.

文 献

- 1) Maines, M.D. (1997) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 37, 517–554.
- 2) 岩井一宏, 植田 亮 (2007) 生化学, 79, 1021-1031.
- Williams, S.E., Wootton, P., Mason, H.S., Bould, J., Iles, D.E., Riccardi, D., Peers, C., & Kemp, P.J. (2004) Science, 306,

2093-2097.

- Parfenova, H., Basuroy, S., Bhattacharya, S., Tcheranova, D., Qu, Y., Regan, R.F., & Leffler, C.W. (2006) Am. J. Physiol. Cell. Physiol., 290, C1399–1410.
- 5) Maines, M.D. (1988) Faseb. J., 2, 2557-2568.
- Beale, S.I. & Cornejo, J. (1984) Arch. Biochem. Biophys., 235, 371–384.
- Cornejo, J., Willows, R.D., & Beale, S.I. (1998) *Plant. J.*, 15, 99–107.
- Davis, S.J., Kurepa, J., & Vierstra, R.D. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96, 6541–6546.
- 9) Genco, C.A. & Dixon, D.W. (2001) Mol. Microbiol., 39, 1-11.
- Unno, M., Matsui, T., & Ikeda-Saito, M. (2007) Nat. Prod. Rep., 24, 553–570.
- 11) Schmitt, M.P. (1997) J. Bacteriol., 179, 838-845.
- 12) Chu, G.C., Tomita, T., Sonnichsen, F.D., Yoshida, T., & Ikeda-Saito, M. (1999) J. Biol. Chem., 274, 24490–24496.
- Schuller, D.J., Wilks, A., Ortiz de Montellano, P.R., & Poulos, T.L. (1999) *Nat. Struct. Biol.*, 6, 860–867.
- 14) Sugishima, M., Omata, Y., Kakuta, Y., Sakamoto, H., Noguchi, M., & Fukuyama, K. (2000) FEBS Lett., 471, 61–66.
- 15) Hirotsu, S., Chu, G.C., Unno, M., Lee, D.S., Yoshida, T., Park, S.Y., Shiro, Y., & Ikeda-Saito, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 11937–11947.
- 16) Matsui, T., Furukawa, M., Unno, M., Tomita, T., & Ikeda-Saito, M. (2005) J. Biol. Chem., 280, 2981–2989.
- Chu, G.C., Katakura, K., Tomita, T., Zhang, X., Sun, D., Sato, M., Sasahara, M., Kayama, T., Ikeda-Saito, M., & Yoshida, T. (2000) J. Biol. Chem., 275, 17494–17500.
- 18) Li, Y., Syvitski, R.T., Chu, G.C., Ikeda-Saito, M., & La Mar, G.N. (2003) J. Biol. Chem., 278, 6651–6663.
- 19) Hernandez, G., Wilks, A., Paolesse, R., Smith, K.M., Ortiz de Montellano, P.R., & La Mar, G.N. (1994) *Biochemistry*, 33, 6631–6641.
- 20) Caignan, G.A., Deshmukh, R., Wilks, A., Zeng, Y., Huang, H. W., Moenne-Loccoz, P., Bunce, R.A., Eastman, M.A., & Rivera, M. (2002) J. Am. Chem. Soc., 124, 14879–14892.
- 21) Friedman, J., Lad, L., Li, H., Wilks, A., & Poulos, T.L. (2004) Biochemistry, 43, 5239–5245.
- 22) Bianchetti, C.M., Yi, L., Ragsdale, S.W., & Phillips, G.N., Jr. (2007) J. Biol. Chem., 282, 37624–37631.
- 23) Lad, L., Schuller, D.J., Shimizu, H., Friedman, J., Li, H., Ortiz de Montellano, P.R., & Poulos, T.L. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 7834–7843.
- 24) Sugishima, M., Sakamoto, H., Kakuta, Y., Omata, Y., Hayashi, S., Noguchi, M., & Fukuyama, K. (2002) *Biochemistry*, 41, 7293–7300.
- 25) Chance, B., Angiolillo, P., Yang, E.K., & Powers, L. (1980) FEBS Lett., 112, 178–182.
- 26) Berglund, G.I., Carlsson, G.H., Smith, A.T., Szoke, H., Henriksen, A., & Hajdu, J. (2002) *Nature*, 417, 463–468.
- 27) Unno, M., Matsui, T., Chu, G.C., Couture, M., Yoshida, T., Rousseau, D.L., Olson, J.S., & Ikeda-Saito, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 21055–21061.
- 28) Takahashi, S., Ishikawa, K., Takeuchi, N., Yoshida, T., Ikeda-Saito, M., & Rousseau, D.L. (1995) J. Am. Chem. Soc., 117, 6002–6006.
- 29) Sugishima, M., Sakamoto, H., Noguchi, M., & Fukuyama, K. (2003) *Biochemistry*, 42, 9898–9905.
- Davydov, R.M., Yoshida, T., Ikeda-Saito, M., & Hoffman, B. M. (1999) J. Am. Chem. Soc., 121, 10656–10657.

- 31) Denisov, I.G., Ikeda-Saito, M., Yoshida, T., & Sligar, S.G. (2002) FEBS Lett., 532, 203–206.
- 32) Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A.M., Maves, S. A., Benson, D.E., Sweet, R.M., Ringe, D., Petsko, G.A., & Sligar, S.G. (2000) Science, 287, 1615–1622.
- 33) Sono, M., Roach, M.P., Coulter, E.D., & Dawson, J.H. (1996) *Chem. Rev.*, 96, 2841–2888.
- 34) Chen, H., Moreau, Y., Derat, E., & Shaik, S. (2008) J. Am. Chem. Soc., 130, 1953–1965.
- 35) Davydov, R., Matsui, T., Fujii, H., Ikeda-Saito, M., & Hoffman, B.M. (2003) J. Am. Chem. Soc., 125, 16208–16209.
- 36) Derat, E., Shaik, S., Rovira, C., Vidossich, P., & Alfonso-

Prieto, M. (2007) J. Am. Chem. Soc., 129, 6346-6347.

- 37) Sano, S., Sano, T., Morishima, I., Shiro, Y., & Maeda, Y. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 531–535.
- 38) Matsui, T., Nakajima, A., Fujii, H., Matera, K.M., Migita, C.T., Yoshida, T., & Ikeda-Saito, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 36833–36840.
- 39) Matsui, T., Omori, K., Jin, Y., & Ikeda-Saito, M. (2008) J. Am. Chem. Soc., 130, 4220–4221.
- 40) Lad, L., Ortiz de Montellano, P.R., & Poulos, T.L. (2004) J. Inorg. Biochem., 98, 1686–1695.
- 41) Sugishima, M., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., Noguchi, M., & Fukuyama, K. (2003) J. Biol. Chem., 278, 32352–32358.