



Title	Reaction Mechanism of HutZ-type Heme Degradation Enzymes with Unique Structure [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	道順, 暢彦
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第13677号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74174
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Nobuhiko_Dojun_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 道順 暢彦

学 位 論 文 題 名

Raction Mechanism of HutZ-type Heme Degradation Enzymes with Unique Structure (特異な構造を有する HutZ 型ヘム分解酵素の反応機構)

第一章では、本学位論文の背景として、病原菌であるコレラ菌のヘム分解酵素に着目した理由について述べる。コレラの原因菌であるコレラ菌は、宿主から鉄ポルフィリン錯体であるヘムを獲得する一連のタンパク質群 Hut (Heme Utilization) 系を利用することで、生存に必要不可欠な鉄を得ており、この Hut 系の機能阻害は有効なコレラ治療薬の開発につながる可能性があることから、阻害剤の開発には立体構造に基づく反応機構を解明する必要がある。当研究室では HutZ がヘムを分解し、ヒト由来のヘム分解酵素 HO-1 と同じ分解産物であるビリベルジン生成することを明らかにした。しかし、HutZ のヘム分解反応において、一部の反応中間体が観測されておらず、さらに、HutZ は HO-1 の立体構造と全く異なり、その活性中心は 2 量体界面に存在し、ヘムの軸配位子である His170 と Asp132 とが水素結合を形成する。このような特異な構造を有するヘム分解酵素は報告例がないことから、本学位論文ではその反応機構の詳細や、この酵素がどのようにして機能を獲得したのかを明らかにするとともに、その反応機構の特徴から阻害剤開発への指針を得ることを目指した。

第二章第一節では、HutZ のヘム分解反応において同定されていなかった *meso*-hydroxyheme (Fig. 1. e) と verdoheme (Fig. 1. f) の同定を分光学的手法にて行った。HO-1 では *meso*-hydroxyheme が嫌気条件下で過酸化水素を 1 等量加えると生成することが報告されており (Fig. 1. a-d-e)、その生成を HutZ でも紫外可視吸収スペクトルにて確認した。一方、verdoheme と予想される中間体は、吸収スペクトルにて 645 nm に吸収極大を示し、これは HO-1 の verdoheme よりも 20 nm ほど短波長側にシフトしていた。これは HutZ では verdoheme の鉄の価数が HO-1 と異なり 3 価であることに由来すると考えられた。つまり、HutZ は verdoheme の鉄の価数が異なる以外は HO-1 と同じ反応中間体を経て (Fig. 1.) ヘムを分解することが明らかとなった。

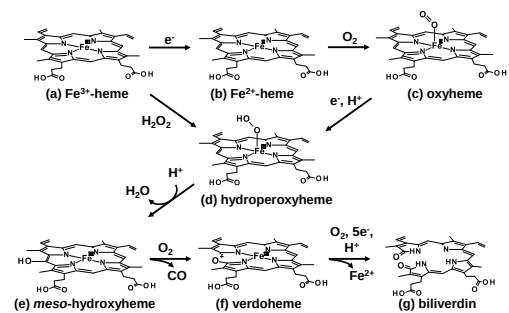


Fig.1. HutZ によるヘム分解反応機構

第二章第二節では、HutZ 型ヘム分解酵素に特徴的なヘム軸配位子側に存在する Asp132 と His170 間の水素結合の役割を明らかにすることを目指した。Asp132 が形成する水素結合は His170 をアニオン化することで、アスコルビン酸によるヘム鉄の還元反応 (Fig. 1. a-b) を阻害するため、ヘムの分解反応に不利だと考えた。そこで、水素結合を切断した D132L、H170A 変異体、および水素結合を保持した D132E 変異体を作成し、この水素結合の役割を検討した。しかし、D132L 変異体は、ヘムの解離定数が野生型の約 10 倍の値になったのでヘムとの親和性は低下し、さらに過酸化水素添加時に野生型では観測される verdoheme が生成しなかった。これは H170A 変

異体でも同様だった。一方、D132E 変異体ではヘムとの結合力は野生型と同等であり、過酸化水素によって *verdoheme* は生成した。しかし、野生型で His170 のアニオン化が弱くなることでアスコルビン酸による反応が進行する pH 6 では、Asp132 全変異体で野生型に比べヘムとの親和性が弱く、アスコルビン酸によるヘムの分解反応は進行しなかった。従って、Asp132 と His170 の水素結合は HutZ によるヘムの結合と *verdoheme* の生成に必要であり、基質であるヘムを分解するのに適切な位置に配位させる役割を担う可能性が示された。

第三章では、第二章で HutZ が HO-1 と同じ反応を触媒する酵素でありながら、HO-1 とは異なる立体構造によってヘムを分解する機構を持つことを明らかにしたので、HutZ は HO-1 とは異なる祖先型タンパク質から分子進化を経てヘム分解能を獲得したと予想し、これを検討した。HutZ 型ヘム分解酵素は酸素を利用する酵素であることから、その共通祖先の探索のため、生命の酸素利用の原因となった光合成細菌で、分子進化の初期に近いタンパク質を保持していると想定されるシアノバクテリアに注目した。シアノバクテリアには HutZ と 43% の同一性を持つ Alr5027 が存在し、HutZ の活性に必要な Arg92、Asp132 は保存されている。しかし、ヘムの軸配位子である His170 は Alr5027 では Lys164 であり、その分光学的手法による検討からも Alr5027 にはヘムが結合せず、ヘムの分解反応も観測されなかった。そこで、Alr5027 にヘムとの結合やヘムの分解の機能を付与するため、Lys164 を His に変異した K164H 変異体でヘムの結合と分解反応を観測したところ、K164H 変異体にはヘムが結合し、過酸化水素を添加するとヘム分解酵素に特有の反応生成物である *verdoheme* を生成した。しかし、アスコルビン酸によるヘム鉄の還元を経由した反応は K164H 変異体では進行せず、この原因として HutZ では、その二量体界面の距離が厳密に制御されており、K164H 変異体では二量体界面が開いているためと考えた。K164H 変異体の二量体界面の距離は活性中心のヘムと Asp に近接する Trp の FRET より、HutZ 野生型に比べて約 6 Å 長くなっていた。以上より、アスコルビン酸での反応は進行しなかったものの、Alr5027 に His を導入しただけで、*verdoheme* の生成機能を持たせることに成功した。*verdoheme* は、ヘムの分解産物としてヘム分解酵素のみが生成することから、HutZ 型のヘム分解酵素は Alr5027 と共通の祖先型タンパク質による分子進化を経て機能を獲得したことを示唆している。

第四章では、コレラ菌の第一選択薬である抗生物質のテトラサイクリンが鉄キレート能を持つことから、テトラサイクリンが HutZ の酵素活性を阻害する可能性を検討した。テトラサイクリンを添加し、HutZ の反応を観測したところ、406 nm の Soret 帯の吸収強度の減少が抑制され、反応で得られた遊離鉄は約半分ほどに減少した。一方で、鉄をキレートしない抗生物質であるクロラムフェニコール存在下では、HutZ の酵素活性の抑制は観測されなかったことから、阻害効果は鉄キレート剤に特異的な現象であった。次に、鉄キレート剤が HutZ のヘム分解反応をどの段階を抑制しているのかを検討するため、第二章で得られた HutZ のヘム分解機構 (Fig. 1.) をもとに、各段階の反応速度を測定した。その結果、鉄キレート剤は HutZ のオキシヘムからヒドロペルオキシヘムの生成過程 (Fig. 1. c-d) であるプロトン付加反応を抑制していると考えられた。この過程には活性中心に存在する水分子がプロトン供給源として機能するので、鉄キレート剤は水分子によるオキシヘムへのプロトン供給を (Fig. 1. c-d) 阻害すると考えられた。以上より、鉄キレート剤による HutZ の活性阻害機構を明らかにすることができ、これはキレート能を持つ化合物が HutZ の阻害剤として機能することを示唆する。

第五章では、本学位論文において明らかになった点や今後の展望をまとめた。これまでの研究では、HutZ がヘムを分解することは明らかになっているものの、その詳細な機構や特異な構造の機能的意義が明らかにされていない例はなかった。本学位論文では、HutZ 型ヘム分解酵素が反応に不利な構造を持ちながらもその機能を獲得した酵素であることを示唆した。さらに、HutZ のような病原菌のみに存在するヘム分解酵素をターゲットとした際、鉄キレート能を持つ化合物は宿主内のヘム分解酵素を阻害することがないので、より選択的な阻害剤の開発につながる可能性を示した。本学位論文で得られた知見は、明確な治療薬が提示されていない細菌性感染症に対し、鉄代謝の抑制という新たな側面からの創薬に展開すると期待される。