

(様式第5号)

ビリベルジン-ヘムオキシゲナーゼ複合体の X 線結晶構造解析 X-ray crystallographic analysis of biliverdin-heme oxygenase complex

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)課題は、実施課題名の末尾に期を表す(I)、(II)、(III)を追記して下さい。
- ※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。(トライアルユースを除く)

1. 概要 (注：結論を含めて下さい)

ヘム分解系における主要酵素であるヘムオキシゲナーゼとその反応物であるビリベルジンを共結晶化した。ビリベルジンの結合位置を明確にするために、得られた結晶に Zn^{2+} をソーキングで加えた結晶について、X線回折測定を行なった。なお、 Zn^{2+} はビリベルジンにキレートされる。しかし、結晶の大きさ・質がそれほど良くなかったため、6 Å 程度までの回折データしか収集できず、 Zn^{2+} の結晶中での位置も特定することはできなかった。今後、結晶の改善および凍結条件の改善を行う必要がある。

(English)

Heme oxygenase which is involved in heme metabolism was crystallized with its product, biliverdin. To clarify the binding position of biliverdin, Zn^{2+} , which would be incorporated into biliverdin, was added to the crystal, and then the X-ray diffraction data were collected. Due to the poor crystal size and quality, the crystal was diffracted by around only 6 Å, and the position of Zn^{2+} could not be identified in the anomalous difference Fourier map. Improvements of the crystal size and quality, and freezing conditions are required to obtain better map.

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、酸素と還元力を用いて、ヘムをビリベルジン、 Fe^{2+} 、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。他生物種のHOにおいて、ビリベルジン-HO複合体の結晶構造は報告されているが(4)、その結合位置は基質であるヘムや他の反応中間体の結合位置と大きく異なる。また、この結晶内ではビリベルジンは結晶の非対称単位中に存在する3つのHOの1つにしか結合しておらず、報告されているビリベルジンの電子密度は曖昧である。本実験では、 Fe^{2+} のHOからの解離とともに本当にビリベルジンの結合位置が動くのかを明らかにするために、ビリベルジンのHOに対する結合位置を明確にすることを目的とした。

3. 実験内容(試料、実験方法、解析方法の説明)

ビリベルジンは生成物であるので、HOに対する親和性が他の反応中間体に比べて弱いことが予想される。その為、先の報告では、ビリベルジンの電子密度が曖昧であったと思われる。そこで、本実験では、まずビリベルジンとHOを共結晶化し、 Zn^{2+} を結晶にソーキングすることで、 Zn^{2+} をビリベルジンに配位結合させ、 Zn^{2+} の吸収端付近の波長である1.2782 ÅのX線を用いて、振動法による

回折実験を行うことで、異常分散差フーリエ図から Zn^{2+} の位置を決定し、それによってビリベルジンの結合位置を確定することを試みた。測定条件の詳細は表 1 に示した。

結晶	Zn^{2+} -ビリベルジン-HO
波長(Å)	1.2782
一枚あたりの振動角 (°)	1
測定枚数	200
カメラ長(mm)	250
一枚あたりの露光時間(秒)	30

4. 実験結果と考察

回折実験の結果、分解能 6 Å までの回折データを収集した。収集した回折データの統計値は表 2 に示した。このデータを用いて、heme-HO 複合体の立体構造 (PDB ID: 1DVE) を基に、分子置換法による位相決定を試みた。回折データ処理には XDS (5)、位相決定には Phaser (6) を用いた。その結果、非対称単位中に 7 つの HO の位置を決定した。得られた電子密度は低分解能なため、ビリベルジンらしい電子密度は特定できず、また、この位相を用いて計算した差異常分散フーリエ図にも Zn^{2+} を示すピークは見られなかった。すなわち、このデータを用いた解析ではビリベルジンの位置は特定できず、それはビリベルジンの HO に対する結合が不安定なためか、データの質が悪いためかは判別できなかった。また、本実験で収集した回折写真には別方位の結晶からの回折点が含まれており、回折データの質をより悪くしている。

格子定数(Å, °)	a = 77.0, b = 40.1, c = 309.7, β = 96.9
空間群	P2 ₁
分解能(Å)	15 – 6.0 (6.32-6.0)
完全性(%)	89.3 (97.6)
冗長性	2.18 (2.14)
R-merge	0.126 (0.564)
Mean I ₀ /σ	6.09 (1.64)

5. 今後の課題

今回の実験では、低分解能な質の悪いデータしか収集できなかった。これは主に結晶の大きさ・質が十分ではないことによると思われる。結晶の改善および結晶凍結条件の改善を試みる必要がある。

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. Lad L., Friedman J., Li H., Bhaskar B., Ortiz de Montellano P. R., Poulos T. L. "Crystal structure of human heme oxygenase-1 in a complex with biliverdin." (2004) *Biochemistry* 43(13), 3793-801.
5. Kabsch, W. "XDS." (2010) *Acta Cryst. D*66, 125-132.

6. McCoy A. J., Grosse-Kunstleve R. W., Adams P. D., Winn M. D., Storoni L.C., Read R.J. "Phaser crystallographic software." (2007) **J. Appl. Cryst.** 40, 658-674.

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. Sugishima M., Omata Y., Kakuta Y., Sakamoto H., Noguchi M., Fukuyama K. "Crystal structure of rat heme oxygenase-1 in complex with heme." (2000) **FEBS Lett.** 471, 61-66.

2. Sugishima M., Sakamoto H., Kakuta Y., Omata Y., Hayashi S., Noguchi M., Fukuyama K. "Crystal structure of rat apo-heme oxygenase-1 (HO-1): Mechanism of heme binding in HO-1 inferred from structural comparison of the apo and heme complex forms." (2002) **Biochemistry** 41, 7293-7300.

3. Sugishima M., Sakamoto H., Higashimoto Y., Omata Y., Hayashi S., Noguchi M., Fukuyama K. "Crystal structure of rat heme oxygenase-1 in complex with heme bound to azide: Implication for regiospecific hydroxylation of heme at the α -meso carbon." (2002) **J. Biol. Chem.** 277, 45086-45090.

4. 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, 32352-32358.

5. Sugishima M., Sakamoto H., Noguchi M., Fukuyama K. "Crystal structures of ferrous and CO-, CN⁻, and NO-bound forms of rat heme oxygenase-1 (HO-1) in complex with heme: Structural implications for discrimination between CO and O₂ in HO-1." (2003) **Biochemistry** 42, 9898-9905.

6. Sugishima M., Sakamoto H., Noguchi M., Fukuyama K. "CO-trapping site in heme oxygenase revealed by photolysis of its CO-bound heme complex: mechanism of escaping from product inhibition." (2004) **J. Mol. Biol.** 341, 7-13.

7. Sugishima M., Higashimoto Y., Oishi, T., Takahashi H., Sakamoto H., Noguchi M., Fukuyama K. "X-ray crystallographic and biochemical characterization of the inhibitory action of an imidazole-dioxolane compound on heme oxygenase." (2007) **Biochemistry** 46, 1860-1867.

8. 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, 339-345.

9. Sugishima M., Moffat K., Noguchi M. "Discrimination between CO and O₂ in heme oxygenase: Comparison of static structures and dynamic conformation changes following CO photolysis." (2012) **Biochemistry**, 51, 8554-8562.

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)

ヘムオキシゲナーゼ：ヘム分解系における主要な酵素で、酸素と還元力を用いて、ヘムポルフィリン環の α -meso 部位を特異的に開裂し、ビリベルジン、一酸化炭素、鉄イオンを生じる。生理的には体内の鉄イオンの恒常性、酸化ストレスに対する防御、種々のシグナル伝達反応に関わる。

X線結晶解析：分子の立体構造決定法の一つ。結晶に対して X線を照射することによって生じるラウエ斑点の強度を測定する。その強度データを利用して、結晶内の電子密度分布を計算することにより分子の立体構造を決定する。

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下さい。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下さい)

(2012年度実施課題は2014年度末が期限となります。)

トライアルユースのため、研究成果公開の予定はない。