

ラットヘムオキシゲナーゼ-1 の近位ヘリックス残基の変異によるアスコルビン酸共役ヘム分解反応速度の制御

右田たい子¹・合屋知彦¹・張旭紅²・吉田匡²

(¹ 山口大学農学部生物機能科学科、² 山形大学医学部生化学講座)

ctmigita@yamaguchi-u.ac.jp

<序> ヘムオキシゲナーゼ (HO) によるヘム分解反応は分子状酸素と NADPH 由来の電子を用いて行われ、還元的にヘムに 2 段階で酸素原子が付加し、CO の放出と鉄-ビリベルディン複合体を経てビリベルジン分子と鉄イオンが生成する。過剰のアスコルビン酸を電子供与体とした場合もこの反応は同様の機構で進行するが、ヘム分解の速度定数が 2 相性を示し、基質が低濃度で遅く、高濃度で速くなる。また、速反応の見かけの速度定数は、アスコルビン酸の濃度に依存して大きくなる傾向がある。このような反応の 2 相性は、ヘムポケットの遠位アミノ酸配列がほとんど同じラット HO-1 とシアノバクテリア HO-1 (Syn HO-1) で共に観測されるが、後者では速反応は相対的により高濃度の基質、高濃度のアスコルビン酸の下で起こる。このような反応の 2 相性の要因を明らかにするために、ラット HO-1 ヘムポケットの近位配位子周辺のアミノ酸変異体を合成し、反応への影響を調べた。

<実験> ラットヘムオキシゲナーゼ-1 (rHO-1) とその変異体は、*E. Coli* 発現系を構築して合成した。アスコルビン酸 (AscH₂) は市販の特級試薬をそのまま用いた。緩衝液は、0.1M カリウムリン酸水溶液 (pH 7.0) を用いた。速度論解析は、Shimadzu 2200、EPR 測定は液体ヘリウムクライオスタットを装備した Bruker E-500 分光器を用いた。

<結果と考察> 今回合成したラットの近位ヘリックス部位のアミノ酸変異体は、D12A、E15A、E23A、E29A、E32A、D12K/E15K/E23K/E32 (4 重変異体)、Q38L、K18R、の 8 種類である (図 1)。これらを選んだのは、速反応が起こりにくい Syn HO-1 と比較して、rHO-1 では D12、E15、E23、E32 の 4 つの酸性アミノ酸残基が存在することが特徴的であること (Syn HO-1 ではこれらはそれぞれ N、S、K、G)、また K18 はプロピオン酸残基の一つとの相互作用が Syn HO-1 での R と比較して相対的に弱いと考えられること、そして、Q38 は Syn HO-1 での L と比較してヘムポケットの極性を高めている可能性があり、これが速反応の起こりやすさに関わりがあると予想したためである。

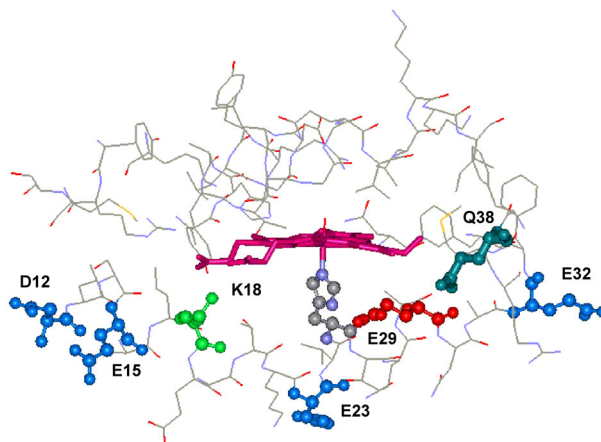
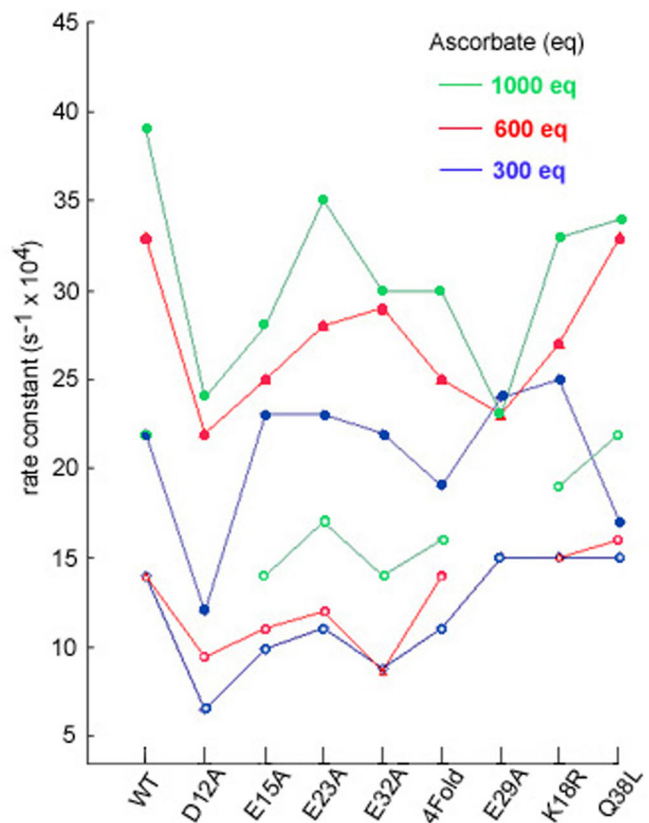


図 1 rHO-1 のアミノ酸変異部位

上記 rHO-1 ヘム複合体の EPR は、g-垂直成分の異方性が大きい E29A を除いて、野生型酵素と同じ酸化型ヘム複合体のスペクトルを示した。NO 配位型 Fe(II)heme 複合体についても、E29A だけが 5 配位と 6 配位の混合型スペクトルを示し、他は野生型と同じ 6 配位型であった。E29 のカルボキシル基は結晶構造解析から H25 の δ -N と水素結合しヘムへの配位構造を固定していることは知られていたが、この水素結合が Fe-His の結合、ひいては遠位方向の結合性に大きく影響していることが、はっきり確認された(後述)。

速度論解析の結果、すべての変異体において速反応の速度定数の減少が見られた(図 2)。特に著しい変化を示しているのは E29A であり、これでは速反応速度定数のアスコルビン酸濃度依存性が消失しており、また遅反応も低濃度のアスコルビン酸でしか観測されない。これに対して E23A と E32A では WT からの変化は比較的小さい。また、D12A、4 重変異体、Q38L でアスコルビン酸低濃度での速度定数が目立って低下している。Q38L についてのこの結果は、相当する構造を持つ SynHO-1 でアスコルビン酸によるヘム分解反応速度が rHO-1 と比べ著しく小さいことと一致しており、予想通りヘムポケットの極性の低下が反応速度に影響していると結論される。これに対して、K18R では、高・中濃度のアスコルビン酸による速度が低下しており、また遅反応 速反応への切り替わりが相対的にヘム複合体の高濃度領域で起こった。D12 については、ヘムポケット結晶構造を見ると、カルボキシル基は近隣の残基との水素結合に参与しておらず、今のところ速度定数の減少の原因は明らかではないが、4 重変異体への影響は、主に D12K への変異による影響ではないかと考えられる。酸性アミノ酸変異の結果と、ゲルクロマトグラフィー(Superdex 200)でヘム複合体の 2 量体が検出されなかったことから、近位ヘリックス部位のアスコルビン酸を介した分子間の相互作用については否定的な結果を得た。したがって、アスコルビン酸共役によるヘム分解反応速度は、ヘム鉄 - 近位配位子の結合性と、ヘムポケットの極性に大きく支配されていると考えられる。



は遅反応、 は速反応速度定数を表す。

図 2 rHO-1 近位ヘリックス変異体におけるヘム分解反応速度定数のアスコルビン酸濃度依存性。