

学位論文の要約

題目 へム A 合成酵素の構造生物学的研究

氏名 丹羽智美

1. 序論

へム A は呼吸鎖末端酵素であるシトクロム酸化酵素の補欠分子族であり、酸素還元部位とプロトンチャネルを形成している。へム A はシトクロム *a* ファミリー中でしか見られないことから、分子状酸素還元反応に重要であることが示唆される。へム A は一般的に見られるへム B とは異なり、2 位にヒドロキシエチルファルネシル基を、8 位にフォルミル基を持つ。生体中では、へム A はへム O の 8 位のメチル基がフォルミル基に変えられることで合成されている。この反応を触媒する酵素はへム A 合成酵素(HAS)である。HAS は内在性の膜タンパク質であり、へム B を補因子として結合している。HAS は好気生物にとって重要であるが、その反応機構は不明である。これは、活性を保った状態で HAS を単離・精製した例がないことに加え、構造も不明であることに由来する。現在最も研究が進んでいるのは枯草菌 *B. subtilis* 由来 HAS(BsHAS)である。BsHAS は大量発現系が構築されており、また種々の変異体も作製されている。しかしながら、構造が不明であるために、生化学的実験や変異体解析の結果の解釈は困難であった。そこで、本研究では BsHAS の構造解析をおこなった。また、得られた構造から過去の研究の結果の再解釈を試み、最終的にへム A 合成反応について考察した。

2. 結晶構造解析

Lipidic cubic phase 法を用いて BsHAS の結晶化をおこなったところ、最長辺 20 μm 程度の結晶が得られた。これらの結晶を用いて回折データを収集し、重原子同型置換法による位相決定とモデル構築をおこなった。その結果、2.2 Å 分解能での構造決定に成功し、アミノ酸の側鎖の配向や水分子といった反応考察に必要な情報を得ることができた。

3. 全体構造

BsHAS は 8 回膜貫通型の膜タンパク質であり、N 端側の TM1-TM4 と C 端側の TM5-TM8 はそれぞれドメインを形成していた。各ドメインは 4-ヘリックスバンドル型のへム結合サイトを形成しており、C 端側ドメインには補因子であるへム B が 1 分子結合していた。N 端側ドメインのへム結合サイトは空であり、かつ膜外ループ ECL1 によって占められていた

ことから、得られた構造が基質非結合型であることが判明した。2つのドメインの膜貫通部位はよく一致し、分子内擬似二回対称の関係にあった。しかしながら、配位子となるヒスチジンを保持している膜貫通ヘリックスでは両者の構造が異なっており、これは基質結合ドメイン側の TM2、TM4 での主鎖構造の崩れに由来していた。このことから膜貫通ヘリックス TM2、TM4 の可動性が推測された。また、N 端側と C 端側のドメインにそれぞれ属している大きな膜外ループ ECL1、ECL3 は、アミノ酸配列が類似しているにもかかわらず全く異なる構造を取っていた。

さらに、結晶構造と擬似二回対称性を利用することで基質結合型構造のモデルを作成した。得られた構造では、補因子ヘムと基質ヘムの最近接距離は 13 Å 程度であった。これは、ヘム間で電子伝達が可能であることを示している。また、完全に保存されている Glu57 が基質であるヘム O の 8 位メチル基近傍に位置していた。ヘム A 生合成におけるフォルミル化反応の酸素源は水分子であることが示されている。基質結合型構造では Glu57 とメチル基の周囲に水分子が占有できる空間が存在し、かつこの空間は膜外ループ ECL1 によって外界とは隔絶されていた。このことから、Glu57 が触媒残基であることが強く示唆された。

4. 変異体解析

得られた基質非結合型・基質結合型構造から、過去の文献で報告されていた変異体解析実験の解釈と考察をおこなった。ヘムの配位子となるヒスチジンの変異体の特徴から、補因子ヘムが構造の保持だけではなく、実際に反応に寄与していることが推測された。このことは、基質結合型構造でのヘム間距離が電子伝達可能な距離であることとも一致する。一方で、変異体解析の結果から ECL1、ECL3 のシステイン残基がジスルフィド結合を形成し、キノンなどの電子伝達体の結合サイトとなる可能性が示唆されていた。しかしながら、実際の構造中では、確かにジスルフィド結合は形成されていたものの、細胞外側領域に完全に露出していた。このため、ジスルフィド結合がキノンの結合サイトとなる可能性はやや低いと考えられる。

5. 反応機構

これまでに得られている知見と今回の構造に基づき、生体内でのヘム A 合成反応について考察をおこなった。基質であるヘム O はヘム O 合成酵素(HOS)から直接 HAS に渡されることが知られている。HOS の構造も未だに不明であるが、同じファミリーに属するタンパク質の既知構造を利用してホモロジーモデリングをおこなうことで、HOS のモデル構造を作成することができた。得られた HOS と HAS の構造、および HOS-HAS の複合体構造から、ヘム O 結合機構を提案した。この機構では、はじめにヘム O のヒドロキシエチルフェルニル基が HAS と相互作用する。これにより、HAS の膜貫通ヘリックスの構造変化が誘起され、引き続いてヘム O とヒスチジンが相互作用する。これにより、ECL1 は完全に細胞外側

へと移動し、触媒残基である Glu57 がヘム O のメチル基と相互作用可能な状態になる。

また、フォルミル化反応機構についても考察をおこなった。HAS の触媒する反応においては、一酸素添加反応が連続して起こること、フォルミル基の酸素源が水分子であることが知られている。こうした生化学的研究の結果から、他の研究グループよりこれまでに 2 通りの反応機構が提案されてきた。そこで、こうした知見と今回の構造から新たに 2 通りのフォルミル化反応機構を提案した。この 4 つの反応機構のうち、今回の構造から最も確からしいと思われるのは基質ヘムから電子受容体へ電子伝達が起こることで反応が開始する機構である。この機構ではヘム O のメチル基が Glu57 とエステル架橋構造を形成し、引き続き加水分解が起こることで一酸素添加反応が実現される。

6. 結論

本研究では、これまで不明であった HAS の立体構造の決定に成功した。また、得られた構造に基づいて BsHAS の基質結合機構、フォルミル化反応機構を考察することができた。本研究によって提案された触媒反応機構を検証するためには、HAS の反応過程におけるラジカル種の同定、ヘム鉄の価数の決定が必要である。さらには、反応に必要な電子の授受に関与する電子伝達体の同定も必要である。しかしながら、これらを研究するためには活性を保った状態での HAS の単離と活性測定系の確立が必須であり、これは今後の大きな課題となる。一方で、今回得られた構造は、ヘム A 生合成反応解明のための新たな実験の指針となることが期待される。