

2017年2月7日

国立大学法人 宮崎大学
学校法人 久留米大学
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
国立大学法人 大阪大学
国立高等専門学校機構 久留米工業高等専門学校
国立大学法人 埼玉大学

新生児黄疸の原因となる生体内の反応機構を世界で初めて解明 ～50年以上に亘る謎を分子レベルで解き明かし、治療薬開発に手掛かり～

久留米工業高等専門学校の萩原義徳 講師は、宮崎大学 和田啓 准教授と久留米大学 杉島正一 准教授を中心とする研究グループ（農研機構・大阪大学・埼玉大学の研究者ら）に参画し、血液の分解プロセスの最終段階であり、新生児黄疸の原因にもなる生体内反応の仕組みをタンパク質の立体構造解析法を駆使して明らかにしました。これまで有効なクスリがない黄疸の治療薬開発に大きな手掛かりを与えました。本研究成果は 2017年2月7日（英国時間 10:00、日本時間 19:00）に英国科学誌『*Nature Communications*』（*1）で公開されます。

ポイント

- 血液中で酸素を運ぶ主成分として知られるヘムは、その分解過程でビリベルジン→ビリルビンとよばれる色素に順次変換されて体外に排出されます。ビリルビンは黄色を呈する色素であり、新生児黄疸の原因物質にもなっています。
- ビリベルジン還元酵素とよばれるタンパク質がビリベルジンをビリルビンに変換することは知られていましたが、その具体的な仕組みは 50 年以上の間謎に包まれてきました。
- 本研究では、ビリベルジン還元酵素の反応メカニズムを、X線結晶構造解析（*2）と呼ばれる手法によって分子・原子レベルで解明しました。
- ビリベルジン還元酵素は、ビリベルジンを二つ同時に取り込み、その一つがもう一方を変換し、ビリルビンをつくることがわかりました。このような機構の生体内反応は前例がなく、世界で初めての発見として、実証することに成功しました。
- ビリルビンの過剰産生が原因となる重度の新生児黄疸（ビリルビン脳症）の治療薬の開発に大きな手掛かりを与えました。

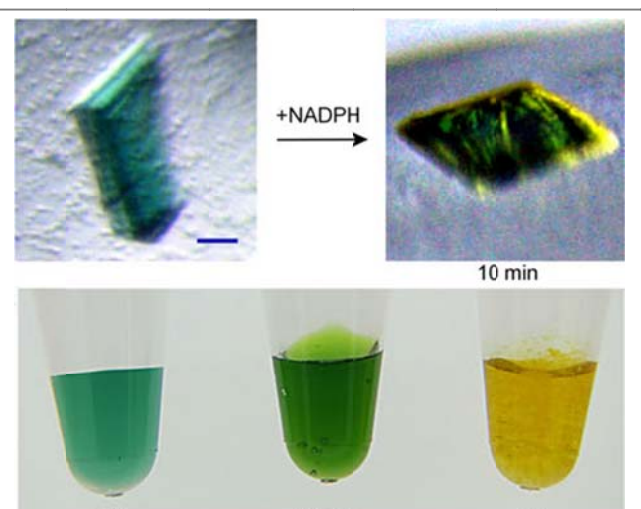


図1. ビリベルジン還元酵素の結晶状態での反応
結晶状態で酵素反応を進めると、ビリベルジンとビリルビンの混合状態を示す色（黄緑色）に変化する。
（BV:ビリベルジン、BR:ビリルビン）

背景

ビリベルジン還元酵素は、50年以上前に発見され、血液中の酸素運搬成分であるヘムの分解に機能することが知られていました。ビリベルジン還元酵素は、ビリベルジンの一部の二重結合を単結合に変換（C10位の還元反応を触媒）し、ビリルビンを産生します（図2）。これまで、この反応がどのような機構で進むのかは謎に包まれており、さまざまな手法による研究が国際的に繰り広げられてきました。

ヘムは赤色、ビリベルジンは青色、ビリルビンは黄色を呈する色素です。例えば、打撲によるあざ（痣）が赤色→青色→黄色に変化しながら治癒するのは、まさに血液の分解過程を皮膚の上から見ていることとなります（図3）。また、ビリルビン（黄色）は通常は優れた抗酸化作用を発揮しますが、血液分解の盛んな新生児体内で過剰に存在すると重度の黄疸を引き起こし（図4）、脳内に沈着して神経毒性をもたらします（ビリルビン脳症）。

研究チームは、ビリベルジン還元酵素がどのようにビリベルジンを取り込み、どのような仕組みでビリルビンに変換するのか、その分子レベルでの解明に挑みました。

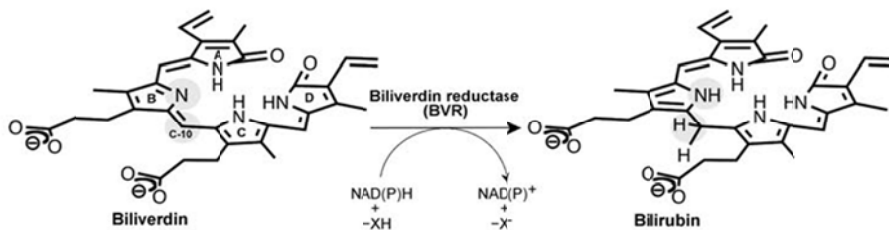


図2. ビリベルジン還元酵素が担う生体内反応
本酵素は、NAD(P)Hを補酵素として、ビリベルジン（左）をビリルビン（右）に変換する。

図3. あざ（痣）
打撲によるあざの治癒過程は、血液の分解反応が現れている。周囲の黄色い部分は、ビリルビンによる呈色。

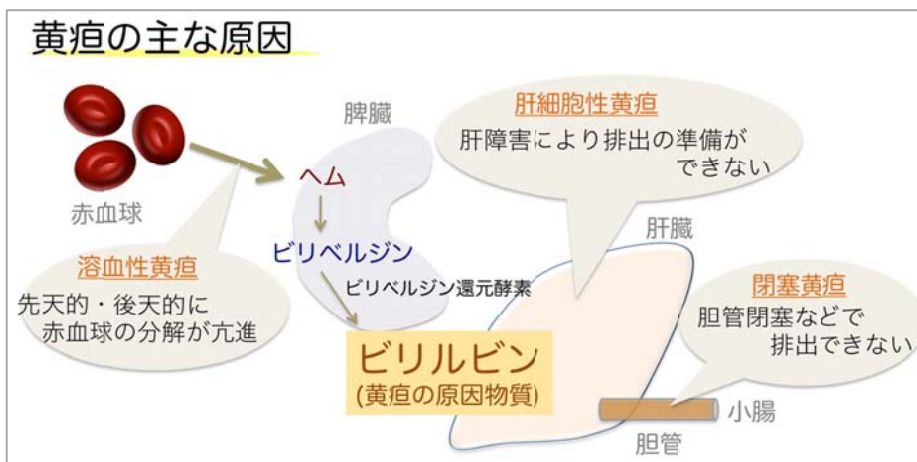


図4. 黄疸の主な原因
ビリベルジン還元酵素により作られるビリルビンは、黄疸の原因物質となっている。ビリルビンの過剰産生や排出異常によりビリルビンが蓄積し、重篤な場合は脳症を引き起こす。

研究手法と成果

X線結晶構造解析方法は、タンパク質の立体構造を分子・原子レベル（Åオーダー：1 mの1/100億）で可視化する手法です。顕微鏡ではカタチが見えない非常に小さな分子でも、原子一つ一つを目で見ることができるようになります。研究チームは、ビリベルジン還元酵素-ビリベルジン補酵素の3成分を結晶状態にして、大型放射光施設SPring-8（*3）においてX線回折データを収集しました。

構造解析で、これまで不明であったビリベルジン還元酵素がビリベルジンを結合した状態の立体構造決定にはじめて成功しました（図5）。一般的には酵素は一つの基質を一つの場所で結合しますが、ビリベルジン還元酵素は非常に珍しいことに、基質（ビリベルジン）二分子を一つの場所で同時に結合することが分かりました（図6）。さらに、このように二つのビリベルジンを同時に結合する意義を調べるために、明らかにした立体構造をベースにしてビリベルジン還元酵素を様々に改変し、どの部位が機能に必要なのかを分光学的な手法によって調べました。得られたすべてのデータを俯瞰することで、ビリベルジン還元酵素が他に類をみない反応機構でビリベルジンを還元することが見えてきました。すなわち、取り込まれた二つのビリベルジンのうち、片方がもう一方をビリルビンに変換する触媒として機能するという、非常にユニークな反応過程を進行することが分かりました（図7）。ビリベルジン還元酵素の結晶を用いてこの反応を結晶状態のまま進めると、青色結晶（2分子のビリベルジン結合の呈色）が黄緑色結晶（1分子のビリベルジン+1分子のビリルビンの呈色）に変化しました（図1）。このことは、今回明らかにした機構を裏付けています。

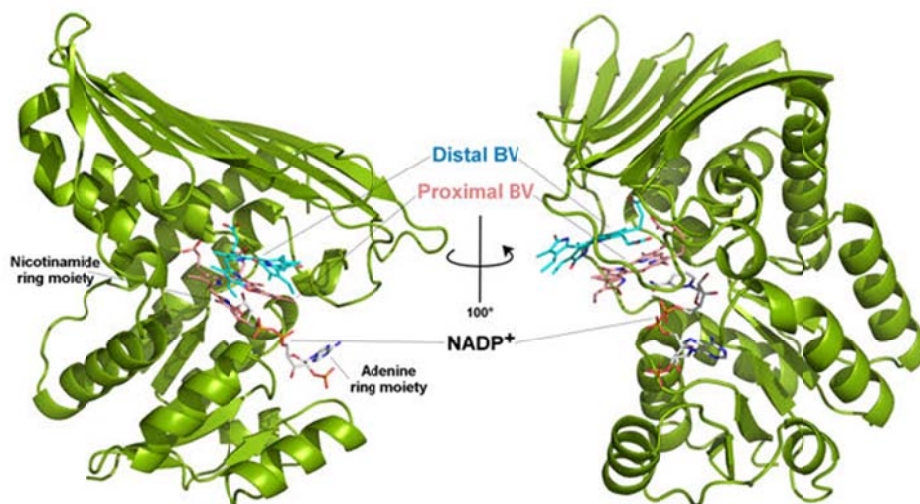


図5. 本研究で初めて決定したビリベルジン還元酵素-ビリベルジン補酵素の立体構造
ビリベルジン還元酵素に二つのビリベルジン（Distal BVおよびProximal BV）が結合することを明らかにした。

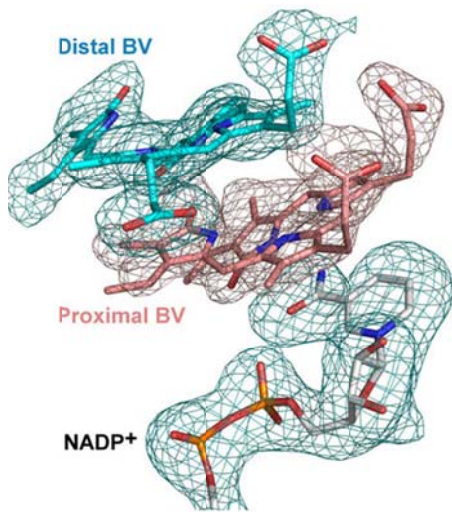


図6. 結合したビリベルジンの構造
X線結晶構造解析によって可視化したビリベルジンの電子密度を表している。二つのビリベルジンが重なるように本酵素に結合する。さらに、一方のビリベルジン (Proximal BV) は、補酵素 (NADP⁺) に挟まれており、ビリルビンに変換され易い環境が作られている。

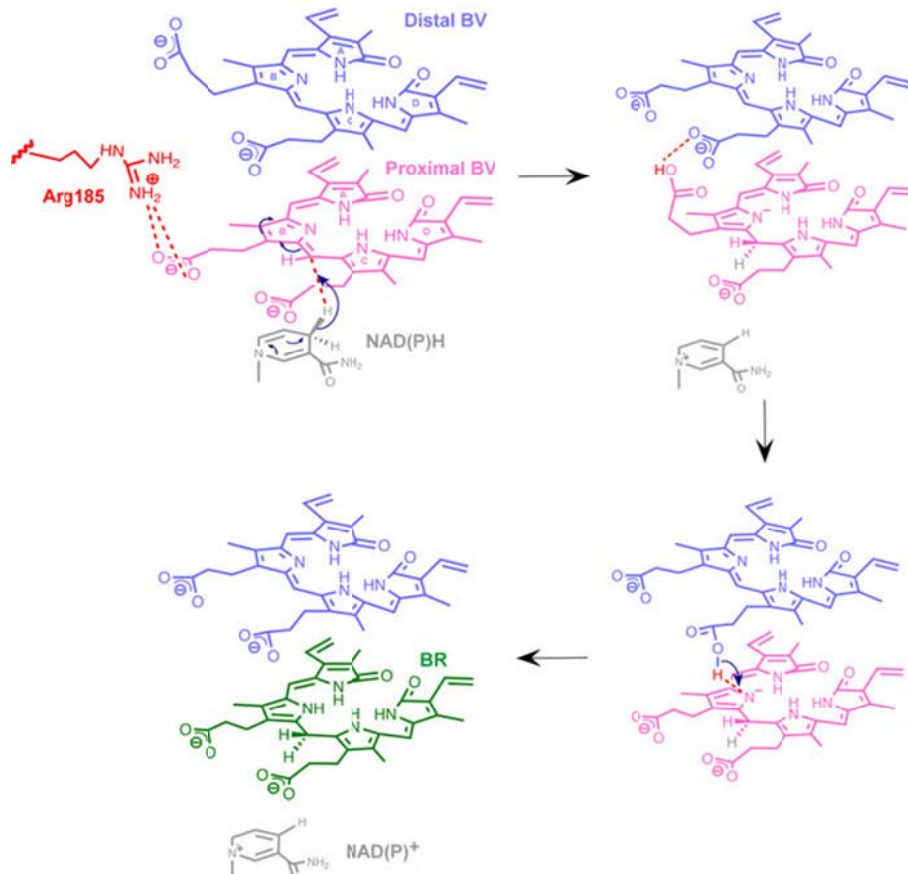


図7. ビリベルジン還元酵素の反応機構

ビリベルジン還元酵素に結合した二つのビリベルジンのうち、Distal BVはProximal BVにプロトンを渡すことで、Proximal BVはビリルビンに変換される。一般的な酵素反応において、基質自身が触媒反応を担うことは極めて珍しい。さらに本酵素がユニークな点として、二つの同じ基質が同時に結合し、それぞれの役割が完全に異なっていることが挙げられる。

今後の期待

医学的な観点では、ビリベルジン還元酵素は黄疸の原因となるビリルビンを作り出すタンパク質として知られています。とくに、血液分解が盛んな新生児においては、血中ビリルビン濃度の急激な上昇に排出が間に合わず、核黄疸（ビリルビン脳症）を引き起こします。現在、軽度の黄疸には、光によって変化したビリルビンが体から排泄されやすいという特性を利用した光照射治療が行われています。一方、重度の新生児黄疸では、有効な治療薬がないことから、血液の全交換の必要があります。ビリベルジン還元酵素の反応を阻害する薬剤が開発できれば、ビリルビン合成量の制御が可能になるため、画期的な黄疸治療薬となる可能性があります。本研究では、これまで謎に包まれていたビリベルジン還元酵素の反応機構を分子レベルで解明したことから、この立体構造およびユニークな反応機構をベースとした創薬開発（SBDD（Structure Based Drug Design））が進むことが期待されます。

用語説明

(* 1)： ネイチャー・パブリッシング・グループの Nature Communications 誌は我々研究者の世界では超一流紙として認識されております。その HP では以下が示されております。「総合科学分野 1 位は Nature であるとともに、Nature Communications は 3 位のジャーナルです。」

<http://www.natureasia.com/ja-jp/info/press-releases/detail/8463>

(* 2)： X線結晶構造解析とは、タンパク質の分子の形（立体構造）を詳細に決定する実験方法。対象となるタンパク質の単結晶を作成し X線を照射することによって、精密な立体構造を決定することができます。今回の成果は、大型放射光施設 SPring-8 生体超分子構造解析ビームライン BL44XU および理化学研究所ビームライン BL32XU を利用することで得られました。

(* 3)： 大型放射光施設 SPring-8 とは兵庫県の播磨科学公園都市にある世界最高性能の放射光を生み出すことができる大型放射光施設です。SPring-8 では放射光を用いて、ナノテクノロジー、バイオテクノロジーや産業利用まで幅広い研究を行っています。

研究費

本成果は、以下の研究事業・資金的援助により得られたものです。

JST 科学技術人材育成費補助事業「テニュアトラック普及・定着事業（個人選抜型）」

文部科学省 科学研究費補助金 基盤研究（B）および基盤研究（C）

原著論文情報

A substrate-bound structure of cyanobacterial biliverdin reductase identifies stacked substrates as critical for activity

Nature Communications, 8:14397, DOI: 10.1038/ncomms14397

Haruna Takao^{1,2}, Kei Hirabayashi¹, Yuki Nishigaya³, Haruna Kouriki¹, Tetsuko Nakaniwa⁴, Yoshinori Hagiwara⁵, Jiro Harada⁶, Hideaki Sato⁶, Toshimasa Yamazaki³, Yoichi Sakakibara⁷, Masahito Suiko⁷, Yujiro Asada⁸, Yasuhiro Takahashi⁹, Ken Yamamoto⁶, Keiichi Fukuyama^{4,10}, Masakazu Sugishima^{6,*}, and Kei Wada^{1,*}

¹Organization for Promotion of Tenure Track, University of Miyazaki

²Graduate School of Medicine and Veterinary Medicine, University of Miyazaki

³Advanced Analysis Center, National Agriculture and Food Research Organization

⁴Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University

⁵Department of Biochemistry and Applied Chemistry, National Institute of Technology, Kurume College

⁶Department of Medical Biochemistry, Kurume University School of Medicine

⁷Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

⁸Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki

⁹Division of Life Science, Graduate School of Science and Engineering, Saitama University

¹⁰Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University

*責任著者

研究グループ（各機関代表者）

国立大学法人 宮崎大学 テニュアトラック推進機構

准教授 和田 啓

学校法人 久留米大学 医学部

准教授 杉島 正一

国立高等専門学校機構 久留米工業高等専門学校 生物応用化学科

講師 萩原義徳

国立研究開発法人 農業・食品産業技術研究機構 高度解析センター

生体高分子解析チーム長 山崎 俊正

国立大学法人 大阪大学 大学院工学研究科

招聘研究員/名誉教授 福山 恵一

国立大学法人 埼玉大学 大学院理工学研究科

教授 高橋康弘

問い合わせ・報道担当

研究内容に関すること

国立大学法人 宮崎大学 テニュアトラック推進機構 医学系物質科学分野

准教授 和田 啓

TEL: 0985-85-0873 FAX: 0985-85-0873

E-mail: keiwada@med.miyazaki-u.ac.jp

久留米大学医学部医化学講座

准教授 杉島 正一

TEL: 0942-31-7544 FAX: 0942-31-4377

E-mail: sugishima_masakazu@med.kurume-u.ac.jp

報道担当

国立大学法人 宮崎大学

企画総務部 広報・渉外課 広報・渉外係

TEL:0985-58-7114 FAX: 0985-58-2818

E-mail: kouhou@of.miyazaki-u.ac.jp

学校法人 久留米大学

経営企画部企画広報課

TEL : 0942-31-7511 FAX : 0942-31-7718

E-mail : kikakukouhou@kurume-u.ac.jp