

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05835

研究課題名(和文) 病原菌に特徴的な鉄の取り込みタンパク質に着目した新規な抗菌剤の開発

研究課題名(英文) Repression of growth of pathogens on the basis of iron uptake systems

研究代表者

内田 毅 (Uchida, Takeshi)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：30343742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：病原菌が生存するために鉄は必須の元素である。感染源である人は鉄の大部分をヘモグロビン中にヘムとして、保有するため、病原菌の主な鉄源はヘムであり、ヘムを取り込み、分解し、鉄を取り出す。そこで、これらに関するタンパク質の機能について検討した。その結果、ヘムを分解し、鉄を取り出すHutZという酵素が活性中心に水素イオンが1個結合することで、活性型で変換することを見出し、その機構を明らかにした。さらに、鉄の輸送タンパク質であるCyaY、ヘム合成酵素であるPBGD、フェロキラーターゼにヘムが結合し、いずれもそれぞれの機能を阻害することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の発見の一つであるHutZの活性制御機構は、二量体の界面構造の変化を通じて行っているが、ヒトが保有するヘム分解酵素は単量体のタンパク質であり、コレラ菌由来HutZに特有な性質である。そのため、この界面構造を抑制する分子が存在すれば、コレラ菌の鉄獲得機構をのみを選択的に抑制することが可能である。キレート能をもつ小分子がHutZの反応を抑制するなど候補となる分子も発見した。それ以外にも今回発見した多くの事象はコレラ菌などの病原菌がもつタンパク質に特有な性質である。今後は本研究課題により見出された多くの性質を利用することで、従来型とは異なる新規な機構の阻害剤の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Iron is an essential element for bacterial growth because it is contained in proteins playing key roles in metabolic processes. Most irons in the human body are present as a heme iron. Therefore, heme is a dominant iron source for most pathogens. In this project the reaction mechanism of a heme-degrading enzyme HutZ from *V. cholerae* was solved. We found that iron chelators are able to inhibit HutZ by perturbing the proton transfer to heme intermediate. This mechanism suggests that iron chelators are candidates of antibiotics. We further found that heme binds to iron-carrier protein CyaY and PBGD that catalyzes the polymerization of porphobilinogen to form 1-hydroxymethylbilane. Heme binding to CyaY and PBGD resulted in less activity, indicating the presence of heme-induced negative feedback. These were not observed in the corresponding human proteins. Therefore, we can propose that HutZ, CyaY and PBGD are good target for new medicine to repress pathogen growth without side reaction.

研究分野：生物無機化学

キーワード：タンパク質 ヘムタンパク質 酵素 反応機構解析 構造解析 病原菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

衛生環境の優れる日本に、おいて、ほとんど意識することはないが、世界的にはコレラや赤痢といった病原菌の感染者はいまだに相当数に上り、毎年多くの犠牲者を出している。最近の例としては、2010年1月に大地震に見舞われたハイチでコレラ患者が激増し、感染者だけで20万人以上、死者は5千人を超え、長期間に渡って感染に歯止めが掛からない状態が続いた。本研究課題では、このような病原菌の増殖に対応するため、細菌の生存に必須な元素である鉄に注目した。エネルギーを生産する呼吸鎖タンパク質の多くがヘムや鉄-硫黄クラスター等を補因子として有するため、病原菌が増殖する際に鉄を必要とする。人の体内に存在する鉄の約70%はヘモグロビン中にヘムとして存在するため、ヘムが病原菌の絶好の鉄源となる。そのため、細菌の鉄の補給路を断つことは、細菌の増殖を抑え、人体への影響を軽減するための有効な手段になると期待される。

2. 研究の目的

病原菌は、ヘモリシンというタンパク質を分泌し、赤血球を破壊し、放出されたヘモグロビンからヘムを取り出す。我々が研究している代表的な病原菌の一つであるコレラ菌では、遺伝子配列から、外膜に存在する HutA というタンパク質がヘモグロビンからヘムを取り出し、ペリプラズム内に取り込み、HutB が内膜に存在する HutC/HutD 複合体にそのヘムを輸送し、細胞質内部に取り込まれた後、HutZ がヘムを分解し、鉄を取り出すと予測されている。この一連の機構を阻害し、鉄の供給を断つことは病原菌の増殖の防止につながる可能性があり、特に、我々が以前発見したヘムを分解する酵素である HutZ の阻害剤は新規な抗菌剤の候補として期待が高い。HutZ の酵素活性はヒトのヘム分解酵素と同様にシアン化物により抑制されるが、シアン化物のようにヘムに直接作用する分子は、HutZ の反応を阻害するだけではなく、ヘモグロビンなどのヒトのヘムタンパク質の機能も阻害するため、副作用が大きく実用的ではない。そこで、病原菌のタンパク質がもつ固有の特徴を明らかにし、ヒトのタンパク質との違いを利用することで、これまではない新たな作用機序による抗菌剤の開発が期待できる。

3. 研究の方法

病原菌は増殖に鉄イオンを必要とするため、鉄の獲得機構の阻害は効果的な抗菌剤の開発につながることを期待される。病原菌の主な鉄源はヘムであり、細胞質内でヘムを分解し、鉄を取り出す。ヘムを分解する酵素、それにヘムと電子を供与するタンパク質、生成物であるビリベルジンや鉄を輸送するタンパク質を同定し、大腸菌での発現系を構築した。生成物はヒスチジントグを利用し、ゲルろ過カラムと組み合わせて行った。構造解析のために紫外可視吸収、蛍光、共鳴ラマン、円二色性など各種分光法や結晶構造解析を組み合わせ、多面的な角度から検討した。また、活性測定には吸収分光法を中心に時間分解ラマン分光法や嫌気下分光など不安定で、短寿命な反応中間体の測定も試みた。

4. 研究成果

【HutZ】

<ヘム分解反応機構の解明>

我々はすでに、代表的な病原菌の一つであるコレラ菌由来の HutZ がヘムの分解酵素であることはすでに明らかにしてきたが、今回、不安定で観測が困難であった酸素付加体とメソ-ヒドロキシヘムの二つの中間体を観測し、反応機構の決定に成功した。酸素付加体は、還元状態の HutZ と酸素分子を高速混合装置を用い混合し、混合後、10~350 ミリ秒後の吸収スペクトルと共鳴ラマンスペクトルを測定することにより同定した（図1）。また、メソ-ヒドロキシヘムは、酸素分子存在すると直ちにベルドヘムに変換されることから、酸素濃度が 1 ppm 以下の環境下で 1 当量の過酸化水素と反応させることにより観測に成功した。さらに、HutZ が生成するベルドヘムは中心金属の鉄が 3 価であるため（ヒトのヘム分解酵素 HO では 2 価）、酸化活性を有するという特徴をもつことがわかった。本研究により明らかにされた病原菌のヘム分解機構は、新規な抗菌剤の開発への有効な知見となることを期待される。

<ヘムの近位側の水素結合の役割>

西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）のようなヘム酸化酵素ではヘムに配位したヒスチジンがアスパラギン酸やグルタミン酸と水素結合を形成し、イオン化することで、高い酸素活性を發揮することが知られている。我々が発見したコレラ菌由来のヘム分解酵素である HutZ にはヘム分解酵素としては例外的にこの水素結合が存在しており、これにより HutZ のヘム分解活性が中性で抑制されていると予想された。そこで、ヘム分解活性におけるこの水素結合の役割を知るため、ヒスチジンおよびアスパラギン酸の変異体を作成し、それらの酵素活性を調べた。その結果、この水素結合を切断するとヘム分解活性は消失し、ヘムの結合能も減少することがわかった。このことから、HutZ はヒスチジンとア

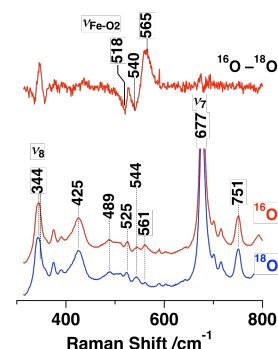


図1 HutZの酸素結合体の時間分解ラマンスペクトル

スパラギン酸が形成する水素結合を切断することなく、その強度を微調整させることにより、酵素活性を制御していることが示された。

<二量体界面の相互作用による活性制御>

HutZ のヘム分解活性は pH 依存的で、pH 6.0 で最大であり、pH を高くするにつれ、活性は減少し、pH 8.0 以上では 10%以下の活性しかない。今回、ヘムとヘムから 20 Å 程度離れた位置に存在する Trp109 との距離変化を FRET (Förster resonance energy transfer)を用いて解析した結果、pH 6 では pH 8 に比べ、約 1 Å 長くなることがわかった。二量体界面に存在する Ala31 を Val に置換すると、この距離が 7-9 Å 近く増大し、二量体の構造が崩れ、活性を失う。以上のことから、ヒトのヘム分解酵素と異なり二量体である HutZ はその二量体の相対配置を微小に動かすことで、不活性型から活性型に変換することを明らかにした (図 2)。

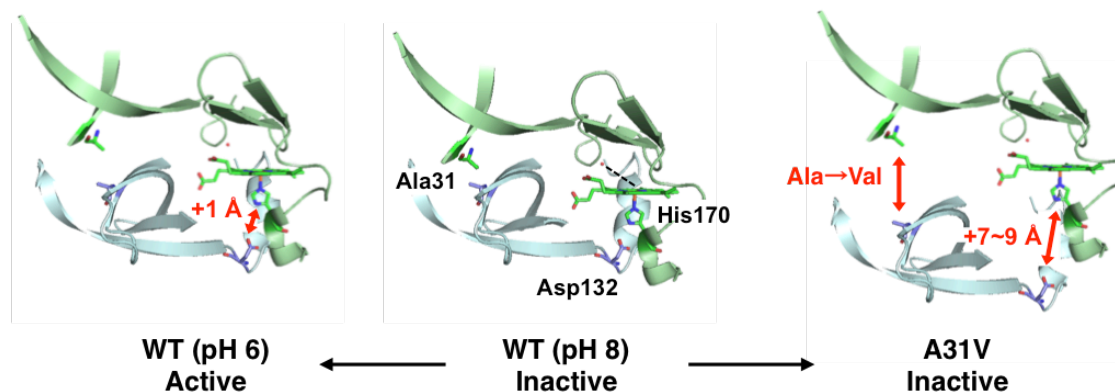


図 2 HutZ の活性制御機構

<ヘムのプロピオン酸の水素結合の役割>

ヒトのヘム分解酵素はほぼ 100%の割合で、 α 位で開裂するのに対し、コレラ菌のヘム分解酵素である HutZ はヘムの β 位と δ 位をほぼ 1:1 で開裂する。HO ではヘムのプロピオン酸と水素結合するアミノ酸残基が存在し、この残基を置換すると α 位以外でも開裂することが知られる。HutZ においてヘムのプロピオン酸近傍に唯一存在する His63 がヘムの開裂部位を決定しているのか検討した。

その結果、His63 を置換してもヘムの開裂部位は天然型と変わらなかったことから、HutZ のヘムの開裂は特定のアミノ酸残基により決定するのではないことがわかった。この変異体はヘムの親和性が低下し、ヘムの分解活性も消失した。FRET による距離変化の観測から、二量体界面の間隔が広がり、二量体間の相互作用が変化していることが示された。ヒトのヘム分解酵素と異なり二量体である HutZ はその二量体の相対配置を微小に動かすことで、不活性型から活性型に変換することを明らかにしてきたが (図 2)、His63 はこの相対配置の変化に関与しており、ヘム分解反応の鍵となるアミノ酸であることが明らかになった。

<HutZ のヘム分解反応の阻害剤の発見>

HutZ によるヘム分解反応を定量的に解析するため、ヘムの分解により放出された Fe^{2+} 量を測定した。 Fe^{2+} の呈色試薬である ferrozine を添加し、アスコルビン酸による反応を観測したところ、反応が大幅に抑制された。 Fe^{2+} として知られるデフェロキサミンやクエン酸でも同様に活性の抑制が観測された。すでに明らかにした反応機構をもとに各素過程の反応速度を比較した結果、キレート剤は鉄をキレートするのではなく、酸素結合体が還元され、 H^+ が付加する過程を阻害していることがわかった。さらに、変異体を用いた結果、この H^+ は Thr27 付近に結合した水分子に由来することがわかった。キレート剤はこの水分子の構造に摂動を加えることで、 H^+ 輸送を妨げ、ヘムの分解を抑制することを明らかにした。コレラの治療で利用される抗生物質の一つであるテトラサイクリンは鉄のキレート能があり、HutZ の反応は抑制されたが、キレート能のない抗生物質であるクロラムフェニコールでは反応抑制されなかった。以上のことから、キレート能を持つ化合物がコレラ菌を含む多くの病原菌の治療薬となる可能性が示された。

【CyaY】

<鉄輸送タンパク質へのヘムの結合>

CyaY は生体分子の酸化還元中心である鉄-硫黄クラスターやヘムの生合成系に鉄を輸送するタンパク質で、微生物からヒトまでほぼ全ての生物に共通に存在するタンパク質の一つである。ヒトの相同タンパク質であるフラタキシンに異常が起こるとフリードライヒ運動失調症を発症することが知られている。本研究では CyaY は鉄だけではなく、ヘム二分子とも結合し、それにより単量体から三量体に変化し、鉄の親和性が低下することを発見した。このことから、鉄を含む補因子の生合成は鉄だけではなく、ヘムの濃度にも依存し、調節されるというこれまで知られていない制御機構が存在することが示された。

【PBGD】

<ヘム合成のヘム結合による活性阻害>

ポルフォビリノーゲンデアミナーゼ (PBGD) は、ポルフォビリノーゲンからヒドロキシメチルビルランを合成する酵素で、ヘム合成の3段階目(または4段階目)の反応を触媒する。この段階の生成物から環状に近い構造になることから、ヘムによる酵素反応の阻害の可能性について注目した。PBGDにヘムが結合するか調べたところ、Cys105にヘムが結合し、その結果、PBGDの酵素活性は約20%減少することがわかった。ただし、Cys105にヘムが結合するだけでは活性に変化はなく、Cys105の近くに存在するHis227がさらにヘムに配位することで、ドメイン間の相対配置が変化し、活性が減少することが変異体や結晶構造解析により示された。ヘムは生体に必須の分子である一方、過剰に存在すると細胞毒にもなることから、過剰にヘムが存在するとヘム合成に関係するタンパク質に結合し、その合成を抑制するような負のフィードバック機構が存在することが明らかとなった(図3)。

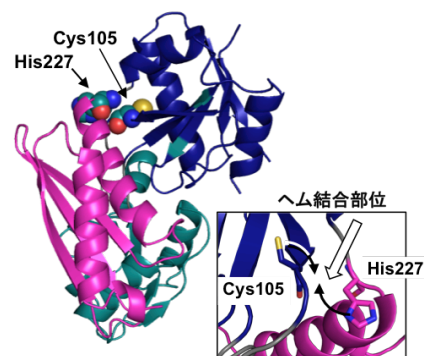


図3 PBGDのヘムに活性調節機構

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

1. Uchida*, T., Dojun, N., Sekine, Y., and Ishimori, K., Role of His63 in HutZ from *Vibrio cholerae* in the heme degradation reaction and heme binding, *Dalton Transactions*, 査読有, 48, 5408-5416 (2019)
DOI: 10.1039/10.1039/C9DT00926D
2. Uchida*, T., Ota, K., Sekine, Y., Dojun, N., and Ishimori, K., Subunit-subunit interactions play a key role in the heme-degradation reaction of HutZ from *Vibrio cholerae*, *Dalton Transactions*, 査読有, 48, 3973-3983 (2019)
DOI: 10.1039/C9DT00604D
3. Uchida*, T., Funamizu, T., Chen, M., Tanaka, Y., and Ishimori, K., Heme binding to porphobilinogen deaminase from *Vibrio cholerae* decelerates the formation of 1-hydroxymethylbilane, *ACS Chemical Biology*, 査読有, 13, 750-760 (2018)
DOI: 10.1021/acscchembio.7b00934
4. Uchida*, T., Sekine, Y., Dojun, N., Lewis, A., Ishigami, I., Matsui, T., Yeh, S.-R., and Ishimori, K., Reaction intermediates in the heme degradation reaction by HutZ from *Vibrio cholerae*, *Dalton Transactions*, 査読有, 46, 8104-8109 (2017)
DOI: 10.1039/C7DT01562C
5. Uchida*, T., Dojun, N., Sekine, Y., and Ishimori, K., Heme proximal hydrogen bonding between His170 and Asp132 plays an essential role in the heme degradation reaction by HutZ from *Vibrio cholerae*, *Biochemistry*, 査読有, 56, 2723-2734 (2017)
DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00152
6. Uchida*, T., Funamizu, T., Ogura, M., and Ishimori, K., Heme iron coordination structure of heme transport protein HutB from *Vibrio cholerae*, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 査読有, 90, 924-930 (2017)
DOI: 10.1246/bcsj.20170104
7. Uchida*, T., Kobayashi, N., Muneta, S., and Ishimori, K., The iron chaperone protein CyaY from *Vibrio cholerae* is a heme-binding protein, *Biochemistry*, 査読有, 56, 2425-2434 (2017)
DOI: 10.1021/acs.biochem.6b01304
8. Dojun, N., Sekine, Y., Ishimori, K. and Uchida*, T., Iron chelators inhibit the heme-degradation reaction by HutZ from *Vibrio cholerae*, *Dalton Transactions*, 査読有, 46, 5147-5150 (2017)
DOI: 10.1039/C7DT00121E
9. Sekine, Y., Tanzawa, T., Tanaka, Y., Ishimori, K., and Uchida*, T., Cytoplasmic heme-binding protein (HutX) from *Vibrio cholerae* is an intracellular heme transport protein to the heme-degrading

enzyme, HutZ, *Biochemistry*, 査読有, 55, 884-893 (2016)
DOI: 10.1021/acs.biochem.5b01273

[学会発表] (計 18 件)

1. 道順 暢彦、石森 浩一郎、内田 毅「シアノバクテリア由来 Alr5027 の 1 残基変異によるヘム分解能の付与」日本化学会第 99 春季年会 (2019)
2. 船水 拓実、石森 浩一郎、内田 毅「ヘム合成関連酵素ポルフォビリノーゲンデアミナーゼ (PBGD)のヘム結合による活性制御」第 45 回生体分子科学討論会 (2018)
3. 大村 翼世、石森 浩一郎、内田 毅「DyP 型ペルオキシダーゼの色素分解活性の至適 pH 変換」第 28 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (2018)
4. Takeshi Uchida, "Heme Uptake Proteins from Pathogenic *Vibrio cholerae*", International Congress on Pure & Applied Chemistry (ICPAC) 2018 (2018)
5. 船水 拓実、石森 浩一郎、内田 毅「ヘム合成酵素 PBGD のヘム結合による活性制御」日本化学会第 98 春季年会 (2018)
6. 大田 一喜、道順 暢彦、石森 浩一郎、内田 毅「コレラ菌由来 HutZ の二量体界面構造のヘム分解活性への寄与」日本化学会第 98 春季年会 (2018)
7. 小林 則之、宗田 壮一郎、石森 浩一郎、内田 毅「ヘムの結合による鉄シャペロンタンパク質 CyaY の活性制御」第 27 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (2017)
8. 内田 毅、道順 暢彦、関根 由可里、石森 浩一郎「コレラ菌由来ヘム分解酵素 HutZ のヘム分解機構の詳細」第 11 回バイオ関連化学シンポジウム (2017)
9. 道順 暢彦、関根 由可里、石森 浩一郎、内田 毅「分子進化的手法を用いたコレラ菌由来 HutZ のヘム分解機能の獲得機構の解明」第 11 回バイオ関連化学シンポジウム (2017)
10. 道順 暢彦、石森 浩一郎、内田 毅「進化の過程を模倣したコレラ菌由来 HutZ のヘム分解機能の獲得機構の解明」日本化学会第 97 春季年会 (2017)
11. 道順 暢彦、関根 由可里、石森 浩一郎、内田 毅「キレート剤によるヘム分解酵素 HutZ の酵素活性阻害機構」第 26 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (2016)
12. 船水 拓実、石森 浩一郎、内田 毅「ヘム合成に関わる酵素 Porphobilinogen deaminase のヘムによるフィードバック制御」第 26 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (2016)
13. 関根 由可里、石森 浩一郎、内田 毅「コレラ菌由来 HutX によるヘム分解酵素 HutZ へのヘム輸送」第 26 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (2016)
14. 関根 由可里、石森 浩一郎、内田 毅「コレラ菌由来ヘム分解酵素 HutZ のヘム分解反応機構」第 43 回生体分子科学討論会 (2016)
15. 道順 暢彦、関根 由可里、石森 浩一郎、内田 毅「キレート剤によるコレラ菌由来ヘム分解酵素 HutZ の活性阻害とその分子機構」第 4 回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム (2016)
16. 船水 拓実、内田 毅「ヘム合成系酵素 porphobilinogen deaminase のヘムによる制御機構」第 10 回バイオ関連化学シンポジウム (2016)
17. 道順 暢彦、関根 由可里、内田 毅「キレート剤によるコレラ菌由来ヘム分解酵素 HutZ の活性阻害とその分子機構」第 10 回バイオ関連化学シンポジウム (2016)
18. 佐々木 美穂、石森 浩一郎、内田 毅「ヘムから鉄の引き抜きと色素分解を行う二刀流タンパク質 VcDyP の構造と反応機構」第 10 回バイオ関連化学シンポジウム (2016)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~stchem/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。