

令和元年6月10日現在

機関番号：82675

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15081

研究課題名(和文) 過渡的複合体に着目したヘムリレー輸送の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the heme relay transport by protein complex

研究代表者

村木 則文 (Muraki, Norifumi)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・助教)

研究者番号：20723828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：感染症の原因となる微生物の多くが宿主のヘムを鉄源として利用するために、ヘムをリレーのように輸送して細胞内に取り込むシステムを有している。本研究では、ヘムのリレー輸送の分子機構を解明するために、新規なヘム結合・輸送タンパク質HtaA・HtaBの複合体構造解析に取り組んだ。過渡的な複合体の安定化のために、ヘム結合部位にあるHisをAlaに変異させた変異体を作成して、ヘム結合能の解析と結晶構造解析を行った。HtaAのC末端ドメインのH434A変異体は、結晶中でドメインスワップした二量体を形成していた。本構造はヘムリレー輸送における過渡的な輸送複合体を模倣していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症の原因となる細菌はヒトの赤血球からヘム鉄を獲得して、鉄源として利用することができる。本研究は、ジフテリアの起炎菌を含むコリネバクテリアにおいてヘム鉄の獲得に利用されるHta/Hmuシステムに着目して、その詳細なヘム鉄輸送機構の解明を目指している。Hta/Hmuシステムの構造情報はジフテリア起炎菌等への特異的な薬剤開発の基盤となりうる。本研究の最終目標である過渡的複合体を介した輸送機構の解明は、生体における物質輸送という生命の根幹を担うシステムの理解につながると考えており、その学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Most commensal or pathogenic bacteria have heme uptake systems for utilizing host heme as an iron source. In Corynebacteria, the heme uptake systems consist of cell surface localized heme binding proteins HtaA and HtaB, and heme transport proteins HmuT, HmuU and HmuV. Although we determined the crystal structure of HtaA, Tab and HmuT recently, the heme relay transfer mechanism is still unclear. In this study, we analyzed the complex structure of heme binding proteins in this system.

We prepared apo form of the N- and C-terminal domains of HtaA and HtaB by mutation. This variants retained the heme binding affinity. Crystal structure of apo form of the C-terminal domain of HtaA H434A variant formed domain swapped dimer. We assume that this dimer mimic transient complex in heme relay.

研究分野：構造生物学

キーワード：ヘムタンパク質 過渡的複合体 結晶構造解析 生物無機化学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

鉄はすべての生物に必須の元素であり、鉄の欠乏は生理機能に重篤な障害をもたらす。そのため、ほとんどの生物が鉄を取り込むためのシステムを有していると考えられる。感染症の原因となる細菌は、宿主の体内という限られた環境において鉄を得るために、ヘムを取り込んで鉄源として利用している。遊離のヘムは細胞毒性を示すため、宿主の体内ではヘモグロビンに代表されるヘムタンパク質に結合した状態で存在している。感染症の原因菌は宿主のヘムタンパク質からヘムを抜きとって体内へ取り込むためのヘム取り込み系を有している。

ヘム取り込み系の構成は膜構造に大きく依存しており、グラム陰性菌とグラム陽性菌で異なる。グラム陰性菌は2つの脂質膜を有する。そのため、グラム陰性菌のヘム取り込み系は外膜を貫通するポーリンと、内膜貫通型の TonB 依存輸送体および ABC トランスポーターから構成されている。これらの輸送体タンパク質はヘム以外の物質輸送にも見られるため、知見も豊富である。一方、グラム陽性菌は細胞膜の外側に厚い細胞壁を有しており、膜輸送体単独ではヘムを取り込むことができない。これらの生物では、細胞外に分泌されて細胞表層に局在したヘム獲得・輸送タンパク質がヘムの取り込みに非常に重要な役割を担っている。

2003年、黄色ブドウ球菌において、細胞壁に局在してヘムの獲得と輸送に関わる Isd タンパク質群が発見された (Mazmanian *et al.*, *Science*, 2003)。Isd タンパク質群から構成されたヘム取り込み系は Isd システムと呼ばれ、黄色ブドウ球菌以外にもグラム陽性低 GC 含量細菌に広く利用されていることがわかっている。黄色ブドウ球菌では、IsdH がヘモグロビン (Hb) からヘムを獲得し、獲得されたヘムは IsdA に渡される。IsdA は IsdC に、IsdC は IsdE にヘムを輸送する。IsdE は ABC トランスポーターの基質結合コンポーネントとして働き、ヘムはトランスポーターを通過して細胞内へと運ばれる。このように、複数のヘム結合タンパク質を介したヘムの輸送はヘムリレー輸送と呼ばれている。

一方、コリネバクテリアや放線菌に代表されるグラム陽性高 GC 含量細菌は Isd システムを有していない。グラム陽性高 GC 含量細菌のヘム取り込み系は長らく不明であったが、2011年にコリネバクテリアが新規な細胞膜外タンパク質 HtaA/HtaB と ABC トランスポーター HmuT-UV から構成された Hta/Hmu システムを使ってヘムを取り込むことが報告された (Allen *et al.*, *J Bacteriol.*, 2011)。HtaA と HtaB は新規なヘム結合タンパク質であり、グラム陽性高 GC 含量細菌に広く保存されていた。このことから、Hta/Hmu システムは高 GC 含量細菌において、Isd システムに代わるヘム取り込み系であると予想される。また、HtaA と HtaB は外膜貫通領域を有することから、外膜に局在してヘムを輸送すると考えられる。Hta/Hmu システムは Isd システムと同様にヘムリレー輸送を行うと予想される。研究代表者は Hta/Hmu システムを対象に構造生物化学的研究を行っており、世界に先駆けて、新規ヘム結合タンパク質 HtaA と HtaB, HmuT の結晶構造解析に成功している (Muraki *et al.*, *Chem Lett.*, 2015 他)。しかし、ヘム輸送の詳細な分子機構は未解決の問題となっている。

### 2. 研究の目的

本研究では、Hta/Hmu システムに着目して、複数のヘム結合タンパク質を介したヘムリレー輸送の分子機構の解明を目指す。感染症の原因菌にとって、遊離のヘムは重要な鉄源であると同時に細胞毒性をもつ危険な分子でもある。そのため、ヘムの輸送は自由拡散ではなく、より厳密な輸送方法が存在すると考えられていた。最近、Isd システムにおいて、NMR 解析や結晶構造を基にした分子シミュレーションの結果から、Isd タンパク質が過渡的な複合体形成を形成してヘム輸送していることが示唆されている (Moriwaki *et al.*, *PLoS One*, 2015)。Hta/Hmu システムを構成する新規タンパク質 HtaA と HtaB は Isd タンパク質とのアミノ酸配列に相同性は見られないものの、逆平行シート構造を骨格としてその末端にヘム結合部位をもつという構造上の類似性を示した。そこで、Hta/Hmu システムのヘムリレーにおいても、Isd システムと同様に過渡的な複合体形成が生じるという作業仮説を立てた。

ヘムがヘム結合・輸送タンパク質同士の過渡的な複合体を介してリレー輸送されると考えると、輸送反応の分子メカニズムの理解のためには、過渡的な複合体の構造情報が不可欠である。本研究では、ヘムリレー輸送反応の理解を目的として、Hta-Hmu システムを構成するヘム結合タンパク質を標的として複合体結晶構造解析に取り組んだ。

なお、このような過渡的な複合体を介したリレー輸送は病原生物のヘム取り込み系に限られたものではなく、細胞毒性を有する生体分子の輸送において一般的であると考えられる。本研究によって、生命の根幹を担う物質輸送のシステムの理解につなげたいと考えている。

### 3. 研究の方法

これまでに研究代表者によって、コリネバクテリア *Corynebacterium glutamicum* 由来の HtaA の N 末端ドメイン、C 末端ドメイン、HtaB および HmuT の結晶構造が明らかになっている (HtaA と HtaB については現在論文執筆中、HmuT は Muraki *et al.*, *Chem. Lett.*, 2015 と Muraki *et al.* *Int J Mol Sci.*, 2016 に既報)。最初に、本研究では、これらの構造情報を基にして複合体構造解析の計画を立てた。

ヘムリレー輸送は高速であり、リレー輸送の過程で生じる過渡的な複合体はヘムの授受が終わる

と速やかに解離すると予想される。このような複合体を調製するためには、基質が結合していない状態のタンパク質が必要となる。しかしながら、これまでに研究代表者が取り組んだ Hta-Hmu システムを構成するタンパク質は、大腸菌発現系を用いると全てヘム結合状態で得られた。複合体構造解析を行うにあたって、立体構造を保ちつつ、受容体としての機能が低下したタンパク質の調製が必要であると考えた。実際に研究代表者は電子伝達系に関わるタンパク質フェレドキシンについて、電子伝達に関わる鉄をガリウムに置換した [2Ga-2S] 型フェレドキシンの調製に成功しており (Mutoh and Muraki *et al.*, *Biochemistry*, 2015)、同試料を用いることで光化学系 I とフェレドキシンの過渡的複合体の結晶構造が報告されている (Kubota-Kawai *et al.*, *Nature Plant*, 2018)。本系では、ヘムの結合能が低下した変異体を調製することによって、複合体を安定化できると考えた。

本研究では、ヘム鉄の軸配位子となる Tyr 側鎖と水素結合を形成している His がヘムとの親和性の調節に関与していると考えた。そこで、当該 His を Ala に変異させた変異体タンパク質 (HtaA-N H111A 変異体, HtaA-C H434A 変異体, HtaB H113A 変異体) を調製した。さらに、これら変異タンパク質について、ヘム結合能の解析と結晶化および結晶構造解析を試みた。詳細は次章に述べる。

#### 4. 研究成果

これまでに研究代表者は HtaA の N 末端ドメイン (HtaA-N), C 末端ドメイン (HtaA-C), HtaB と HmuT の結晶構造解析に成功している。これらはいずれも大腸菌発現系を用いて調製するとヘム結合型として得られる。そこで、HtaA-N, HtaA-C, HtaB において、Tyr 側鎖と水素結合を形成している His (H111, H434, H113) をそれぞれ Ala に置換した変異体を作成した。その結果、いずれの変異体もヘムを結合していない Apo 型で得られた。これらにヘムを滴定したところ、いずれの変異体も 1:1 のモル比でヘムを結合することがわかった (図 1)。

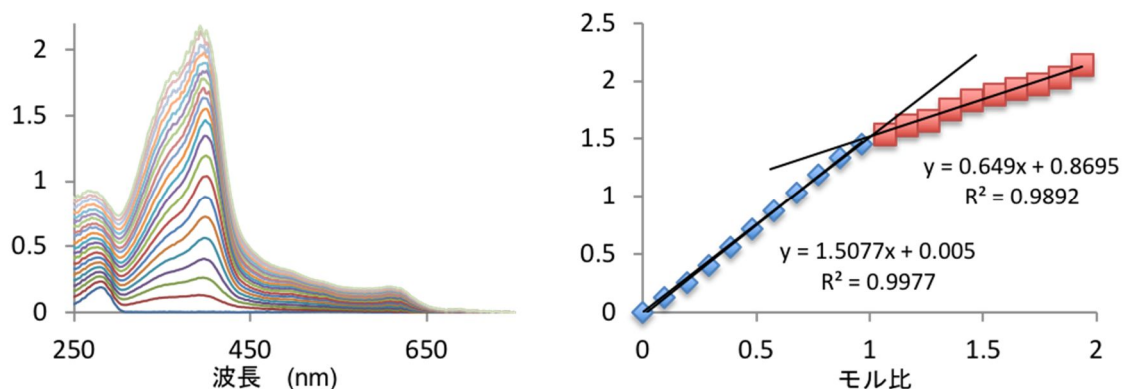


図 1. HtaA-C H434A 変異体の紫外可視吸収を用いたヘム滴定実験の結果

(左: タンパク質溶液にヘムを一定量ずつ加えた際のスペクトル変化, 右: 410nm の吸収の値をプロットしたグラフ, x 軸はタンパク質とヘムのモル比を示す)

さらに等温滴定型熱測定 (Isothermal Titration Calorimetry; ITC) を用いて、結合定数を求めた。その結果、HtaA-C と HtaA-N の結合定数 ( $K_a$ ) が HtaB よりも顕著に高いことがわかった。ヘムリレー輸送において、過渡的複合体を介さず、ヘム親和性の差を利用してヘムが移動すると過程すれば、HtaA の各ドメインよりも HtaB の方が低い結合定数を示すはずである。今回、用いた試料は変異体タンパク質であるが、過渡的複合体モデルを支持する結果が得られた。次に、これら変異タンパク質について、Apo 型とヘム結合型の双方で結晶化条件のスクリーニングを行った。その結果、HtaA-C の H434A 変異体において、Apo 型とヘム結合型でそれぞれ結晶が得られた (図 2)。

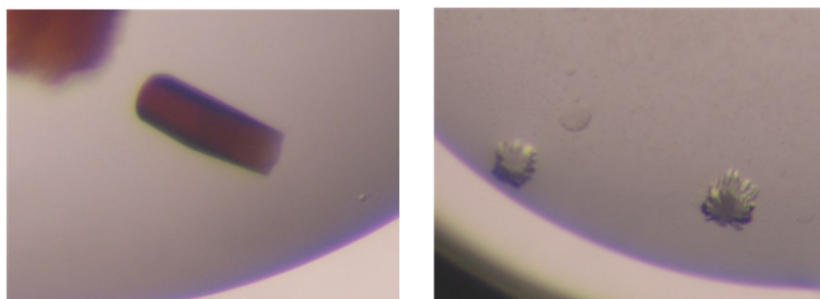


図 2. HtaA-C の H434A 変異体のヘム結合型の結晶 (左) と Apo 型の結晶 (右)

結晶化条件を最適化することで良質な結晶を調製し、放射光施設 Spring-8 のビームライン

BL44XUにおいて、エックス線回折実験に供した。HtaA-C 野生型の構造を用いて、分子置換法による位相決定を行い、結晶構造を決定した。ヘム結合型の HtaA-C H434A 変異体は、野生型と結晶化条件や空間群が異なる結晶であったが、構造はよく一致した。ヘムの分子認識に関わるアミノ酸の位置も変異部分を除けば同じ配置にあった (図 3)。

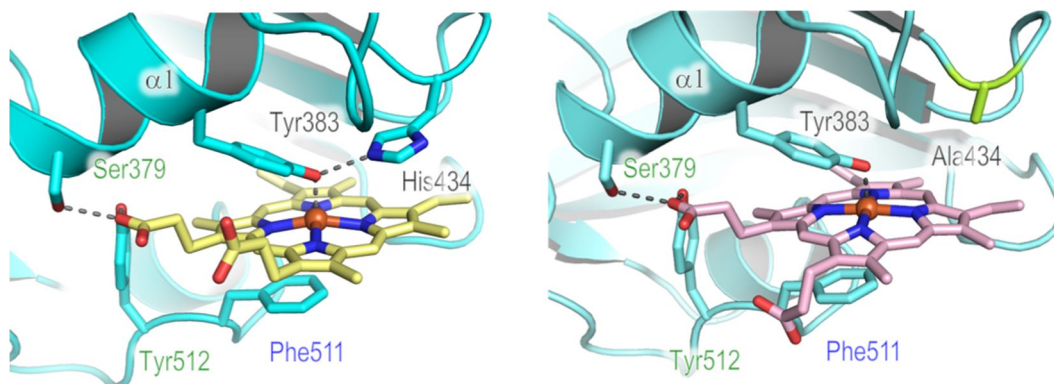


図 3. HtaA-C のヘム結合領域の構造 (左: 野生型, 右: H434A 変異体)

一方、Apo 型の HtaA-C H434A 変異体は結晶中で二量体を形成していた。この二量体は N 末端 30 アミノ酸からなる  $\beta$ -strand1 と  $\beta$ -helix1 が互いにドメインスワップすることによって形成されたドメインスワップダイマーだった (図 4)。Chain A の  $\beta$ -helix1 は chain B のヘム結合領域に近接しており、ヘムの軸配位子である Tyr はヘム結合領域に入り込んでいた (図 4 右)。

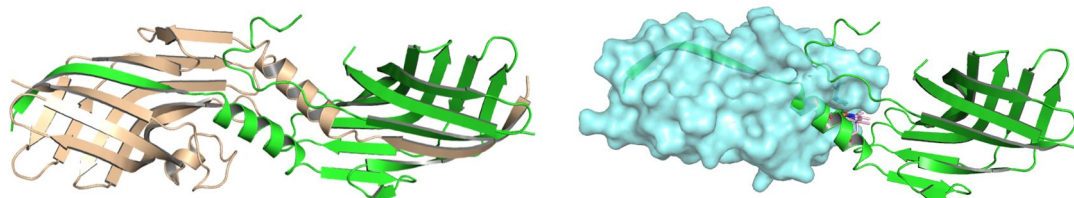


図 4. HtaA-C H434A のドメインスワップ二量体構造 (右は chain B を野生型に置き換えた図)

本研究で決定した HtaA-C H434A 変異体の二量体構造について、ヘム輸送の過渡的な複合体のモデルとして捉えて、考察を行なっている。現在、ヘム輸送について以下のような仮説を提唱している。ヘムのリレー輸送において、ヘムのアクセプター (Apo 型) はドメインスワップをもたらすような大きくほどけた構造をもっていると予想される。アクセプターは、 $\beta$ -helix1 上にある Tyr を利用して、ヘムのドナー (ヘム結合型) からヘムを獲得する。ヘムを獲得すると、フレキシブル領域 ( $\beta$ -strand1 と  $\beta$ -helix1) を折りたたんで、ヘムを結合する。この仮説の検証のためには、実際の過渡的二量体構造の構造情報が不可欠であり、今後の研究の進展が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

河合(久保田) 寿子, 村木 則文, 田中 秀明, 栗栖 源嗣. “ガリウム置換が可能にした光化学系  $\beta$ -フェレドキシン電子伝達複合体の結晶構造解析” 放射光, 31, pp373-380, 2018, 査読あり, <https://iss.ndl.go.jp/books/R100000002-1000000063266-00>

Suyama Y, Muraki N, Kusunoki M, Miyake H. “Crystal structure of the starch-binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*.” *Acta Cryst. section F*, 73, pp550-554, 2017, 査読あり, DOI: 10.1107/S2053230X17012894

〔学会発表〕(計 7 件)

Muraki Norifumi, Aono Shigetoshi, “Structural insights into the catalytic mechanism of carbon monoxide biosynthesis for the maturation of NiFe-hydrogenases” 第 99 回日本化学会年会, 2019 年

村木 則文, 青野 重利, “光受容体型転写因子 CarH の構造と機能の解明” 第 45 回生体分子科学討論会, 2018 年

村木 則文, 青野 重利, “ Hta-Hmu システムによるヘム鉄輸送機構の構造基盤 ” 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 2018 年

村木 則文, 青野 重利, “ コリネバクテリアによるヘムの獲得に関わる Hta ファミリータンパク質の結晶構造 ” 平成 29 年度日本結晶学会年会, 2017 年

村木 則文, 青野 重利, “ コリネバクテリア由来 HtaA/HtaB によるヘム認識と輸送の分子基盤 ” 第 11 回バイオ関連シンポジウム, 2017 年

村木 則文, 青野 重利, “ ヘム取り込み系を担う新規ヘム結合タンパク質 HtaA/HtaB の構造と機能 ” 第 44 回生体分子科学討論会, 2017 年

村木 則文, 青野 重利, “ コリネバクテリアのヘム取り込み系の構造と機能 ” 第 17 回日本蛋白質科学会年会, 2017 年

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：青野 重利

ローマ字氏名：Aono Shigetoshi

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。