

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05933

研究課題名(和文) 感染性胃腸炎を引き起こす病原性細菌のヘム・鉄代謝機構の解明

研究課題名(英文) Heme transport and degradation by enteric pathogens

研究代表者

小崎 紳一 (Shin-ichi, Ozaki)

山口大学・大学院創成科学研究科 ・教授

研究者番号：40280581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：病原性細菌の中には生存に必須の鉄を感染宿主の血中ヘモグロビンのヘムから獲得する仕組みを活用しているものがある。ヘム鉄の獲得は、(1)ヘモグロビンから遊離したヘムを菌体外に分泌されたヘモフォアがつかむ(2)外膜、内膜を膜貫通タンパクを介してヘムが通り抜ける(3)細胞質に到達したヘムから鉄が引き抜かれるの3段階からなる。「胃腸炎の原因細菌の一種であり、通性嫌気性細菌に属するエルシニア菌のヘムならびに鉄の抽出プロセスをバイオインフォマティクスと各種分光法や結晶構造解析の手法を駆使して解明し、そのプロセスを人為的に狂わせて生育、感染を阻止すること」を目的として本研究を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な病気や細菌による感染リスクの高い高齢者が増える社会を迎え、病原性細菌の感染を抑えることは重要な課題である。本研究から得られる知見は、こうした細菌の生育を抑えることに寄与するものである。本研究により、グラム陰性病原性細菌であっても好気性細菌と通性嫌気性細菌ではヘムの菌内への取り込みやヘムからの鉄の抽出プロセスが異なることが明らかになってきた。細菌が持つ鉄獲得戦略の多様性と普遍性を精緻に検証することは学術的にも興味深い事項である。

研究成果の概要(英文)：Some Gram-negative pathogens import host heme into the cytoplasm and utilize it as an iron source for their survival. We report here that HmuS, encoded by the heme utilizing system (hmu) locus in *Y. pseudotuberculosis*, cleaves the protoporphyrin ring to release iron from heme. A liquid chromatography/mass spectrometry analysis revealed that the degradation products of this reaction are two biliverdin isomers that result from transformation of a verdoheme intermediate. Although HmuS does not share amino acid sequence homology with heme oxygenase (HO), a well-known heme-degrading enzyme, absorption and resonance Raman spectral analyses suggest that the heme iron is coordinated with an axial histidine residue and a water molecule in both enzymes. The search for HmuS inhibitors is underway to prevent the proliferation of the enteric pathogenic bacteria.

研究分野：生体関連化学

キーワード：ヘム 鉄

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鉄は生命活動に必須の金属イオンであり、生物は生存のために様々な鉄獲得機構を進化させてきた。人畜を宿主として感染する病原性細菌も例外ではない。こうした細菌は、宿主の血中ヘモグロビン(Hb)に豊富に存在するヘムを鉄源として取り入れ、ヘムから鉄を抽出する仕組みを活用していることが知られている。グラム陰性病原性細菌では、

第1 Hb から遊離したヘムを分泌タンパクであるヘモフォアを用いて掴まえ、外膜上の膜貫通タンパクにまで運ぶ過程

第2 外膜ならびに内膜上の膜貫通タンパクを介してヘムを細胞質にまで取り込む過程

第3 細胞質に達したヘムから鉄を抽出し、鉄含有タンパクと結合させて再利用する過程

の大きく3段階からなる (Fig.1)。私達は、好気性である緑膿菌(皮膚、呼吸器疾患の原因菌の一種)と通性嫌気性細菌であるエルシニア菌(胃腸炎の原因菌の一種)は、共にグラム陰性細菌に属しているにも関わらずヘモフォアによるヘム分子の掴み方が異なることを明らかにし (Fig.2 (a) 緑膿菌のヘモフォア, (b) エルシニア菌のヘモフォアの全体とヘム近傍構造)、それ故、緑膿菌においてヘモフォアの機能を狂わせて生育を抑えることのできる阻害剤がエルシニア菌では有効ではないことを知った。しかし、当時、エルシニア菌のヘモフォアを標的とした新たな生育阻害剤を見つけるには至っていなかった。病原性細菌の鉄獲得機構に勝つためには、ヘモフォアに偽基質を与え生育を阻害させるという手法のみでなく、ヘムの取り込み、ヘムからの鉄抽出、さらには、獲得した鉄の再利用に至るまで、ヘム、鉄のトランスポート・代謝を包括的に理解し、そうした役割を担う病原性細菌に特有の種々タンパクを標的にして検証を進める必要があった。

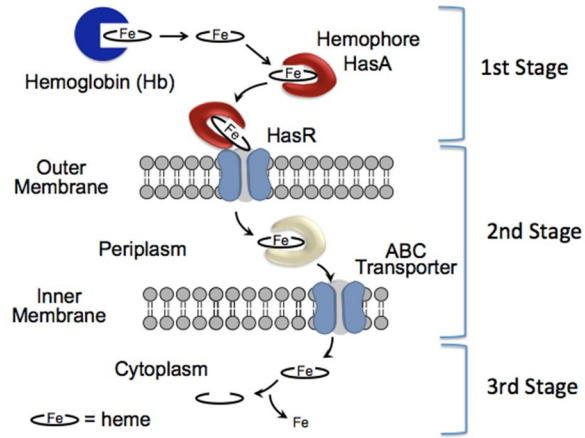


Fig. 1

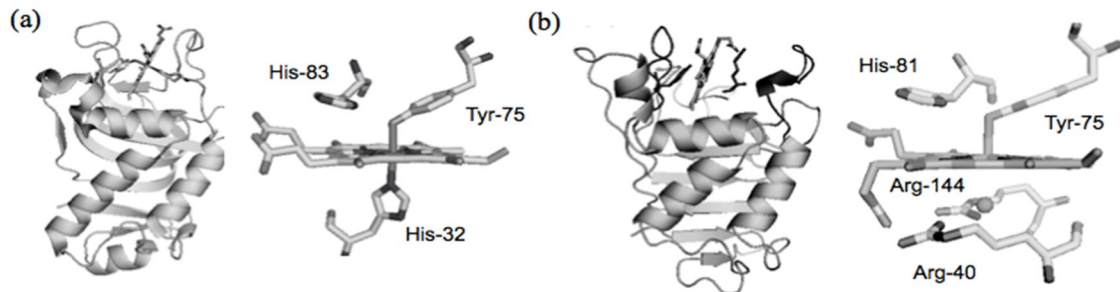


Fig. 2

2. 研究の目的

胃腸炎の原因菌の一つ、エルシニア菌において、ヘムを細菌内に取り込む役割を担うトランスporter、ならびに、ヘムから鉄を引き抜く役割を担っているタンパクなどを同定し、それらが働く仕組みを解明した上で、その仕組みを阻害する物質を見つけ、病原性細菌の生育抑制に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

エルシニア菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) の Fur (Fe uptake regulator) 結合領域の下流に存在する遺伝子群、即ち、鉄枯渇環境下で発現する遺伝子群、をクローニングして大腸菌に導入し、それらにコードされているタンパク質群を大量発現させ、精製し、タンパクレベルの特性を、吸収、共鳴ラマン、EPR などの分光法、ならびに、結晶構造解析の手法などを用いて解析した。ヘムの分解により鉄が抽出される仕組みの解析に際しては、ヘム代謝物の同定を LC/MS を用いて分析した。また、胃腸炎の原因菌 *Yersinia pseudotuberculosis* の鉄獲得機構と比較対照するために、皮膚や呼吸器疾患の原因菌として知られる緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) や歯周病の原因菌として知られるオイコネラ菌 (*Eikenella corrodens*) の鉄獲得を担うタンパクの機能・構造解析にも取り組んだ。生理的役割の検証ならびに生育抑制剤の検索は、*Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Eikenella corrodens* の欠損株の作成、生育曲線のモニタリングなどにより検証した。

4. 研究成果

(1) Fur の下流に存在する Hmu (heme utilization protein) 遺伝子群にコードされている種々のタンパクを発現・精製し、その機能を検証して、意外にも HmuS が酸素分子と電子供与体を用いてヘムを分解し、ポルフィリン環を開裂することで鉄を取り出す役割を担う酵素であることを

明らかにした。HmuS は、これまでに知られている典型的なヘム分解酵素、例えば、緑膿菌のヘムオキシゲナーゼとは、タンパクの大きさもアミノ酸配列も全く異なる (Fig. 3) が、どちらもヘムを 及び ビルベルジンへと酸素分子を用いて開環分解して鉄を遊離させる (Scheme 1)。エルシニア菌において、ヘム分解を担う酵素がどの遺伝子にコードされているかは未知であったが、我々の本研究で実験的に証明することができた。

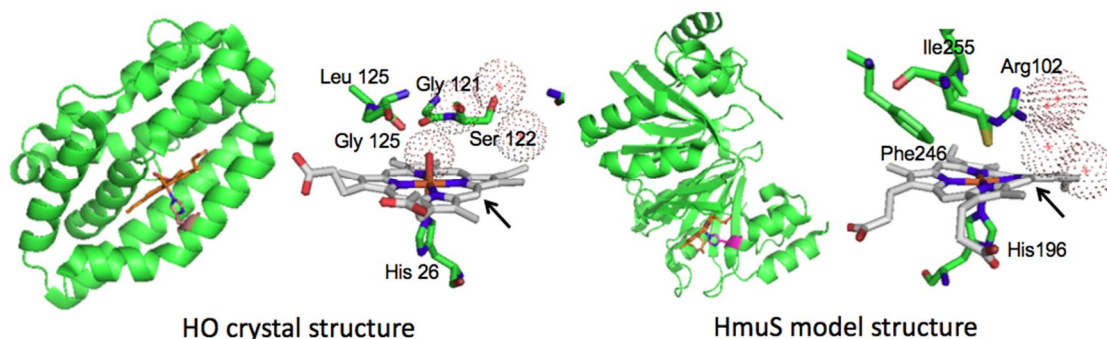
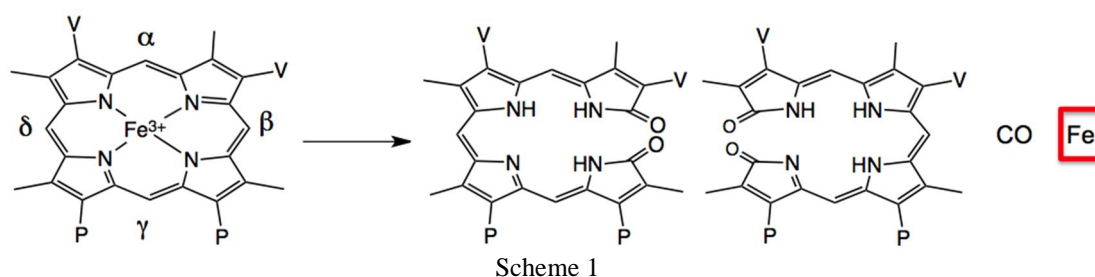


Fig. 3



(2) HmuS によるヘムの分解には酸素分子とともに電子も必須である。そこで、細菌内で NAD(P)H からの電子伝達のメディエーターとして一般的に活用されている ferredoxin NAD(P)⁺ reductase (FNR)をクローニング・発現・精製し、HmuS/FNR/NAD(P)H を含む緩衝水溶液にヘムを加えて好氣的に (即ち、酸素分子存在下で) 反応をしたところヘムの分解と鉄の遊離を確認した。FNR が NAD(P)H から HmuS のヘムへの電子伝達を媒介できることを示した。FNR による電子伝達を阻害する分子が、HmuS によるヘムの分解、さらには、エルシニア菌の生育を阻害できるかどうかについて、現在、検証を進めているところである。

(3) HmuS の反応機構を検証する過程で、ヘム鉄の配位子であるヒスチジン(His-196)、ヘム上部に存在するアルギニン(Arg-102)のプラス電荷がヘムの分解に必須であることがわかった。また、反応過程をスペクトル変化で追跡し、ヘムの分解がヘム鉄に酸素分子が配位したオキシ中間体やベルドヘム中間体を経由して進行することを突き止めた。さらに、チオール(-SH)構造を有する分子が HmuS の機能を阻害することも明らかにした。

(4) HmuS 遺伝子の近傍に存在する HmuX にコードされているタンパクは HmuS と類似するフォールドのヘム結合タンパクであるが、酸素分子存在下でヘムを分解する能力はなかった。HmuS はヘムが過剰な時に一時保存する役割を担っている可能性が示唆された。

(5) エルシニア菌と同じ通性嫌気性であるオイコネラ菌によるヘムの分解を検証したところ、既知のヘム分解酵素、ヘムオキシゲナーゼにより行われており、分解物は ビルベルジンであった。さらに、ヘムの菌体への輸送もエルシニア菌のヘモフォア HasA とは異なるヘモグロビン結合タンパクによって行われていることが明らかになった。Table 1 にまとめたように、ヘムの輸送、ヘム鉄を取り出すためにヘム開環する酵素、そして、ヘム分解物は病原性細菌により実に多様であることがわかった。

Table 1

	緑膿菌 (好気性)	エルシニア菌 (通性嫌気性)	オイコネラ菌 (通性嫌気性)
ヘモフォア	HasA (配位子: His, Tyr)	HasA (配位子: Tyr)	無
ヘム分解酵素 (分解物)	HO (& ビルベルジン)	HmuS (& ビルベルジン)	HO (ビルベルジン)

(6)ヒトではヘムオキシゲナーゼによるヘム代謝物のビリベルジンは、引き続き還元、配糖化されて体外に排出される。細菌におけるビリベルジン以後の代謝経路や配糖化酵素に関する基礎実験も現在進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masato Onzuka, Yukari Sekine, Takeshi Uchida, Koichiro Ishimori, Shin-ichi Ozaki	4. 巻 1861
2. 論文標題 HmuS from <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> is a non-canonical heme-degrading enzyme to acquire iron from heme	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BBA-General Subjects	6. 最初と最後の頁 1870-1878
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.04.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kei Shimoda, Naoji Kubota, Daisuke Uesugi, Yuya Fujitaka, Shouta Doi, Hiroki Hamada, Atsuhito Kuboki, Yuya Kiriake, Takafumi Iwaki, Tomohiro Saikawa, Shin-ichi Ozaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Synthesis of Glycosides of Resveratrol, Pinostilbene, and Piceatannol by Bioconversion with <i>Phytolacca Americana</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Natural Product Communications	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maharjan, Rakesh Fukuda, Yohta Nakayama, Taisuke Nakayama, Toru Hamada, Hiroki Ozaki, Shin-ichi Inoue, Tsuyoshi	4. 巻 x
2. 論文標題 Title: Crown ether mediated crystal structures of a glycosyltransferase PaGT3 from <i>Phytolacca americana</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 S. Ozaki *, M. Onzuka, N. Shimomura
2. 発表標題 Heme transport and metabolism in pathogenic bacteria
3. 学会等名 International Conference on Coordination Chemistry（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 恩塚 誠士 安川 諒 小崎 紳一
2. 発表標題 仮性結核菌のヘム代謝酵素の機能と構造
3. 学会等名 第17回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masato Onzuka, Daishi Miyakawa, Naomichi Shimomura, Shin-ichi Ozaki
2. 発表標題 Functions of the heme degradation enzymes in <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 下村直道・沖本雄大・小崎紳一
2. 発表標題 病原性細菌のヘム分解
3. 学会等名 第69回 錯体討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shin-ichi Ozaki, Naomichi Shimomura, Masashi Onzuka
2. 発表標題 Heme transport and metabolism in pathogenic bacteria.
3. 学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	阿座上 弘行 (Hiroyuki Azakami) (40263850)	山口大学・大学院創成科学研究科 ・教授 (15501)	
研究分担者	木股 洋子 (Yoko KImata) (60255429)	山口大学・大学院創成科学研究科 ・准教授 (15501)	
研究分担者	永野 真吾 (Shingo Nagano) (60286440)	鳥取大学・工学研究科・教授 (15101)	