

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05708

研究課題名(和文) 病原性細菌が嫌氣的にヘムを開環分解して生存に必須の鉄を取り出す機構の解明

研究課題名(英文) Anaerobic heme degradation by pathogenic bacteria

研究代表者

小崎 紳一 (Ozaki, Shin-ichi)

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：通性嫌気性細菌で歯周病の原因菌でもある *Eikenella corrodens* が嫌気下で生育する際に、生存に必須の鉄源として菌体内に取り込んだヘムを如何に開環分解して鉄を抽出しているかについて検証した。そして、*E. corrodens* では鉄-硫黄クラスターを持つ HmuW と呼ばれる酵素が S-adenosylmethionine (SAM) 依存的にヘムを分解すること、また、この反応には NADPH などの電子供与体が必要であることなどを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*E. corrodens* の HmuW による嫌氣的なヘムの開環分解は、ヘムの meso 炭素原子への SAM 由来メチル基の付加ヘムのピロール炭素原子上でのラジカル生成が引金になる。これは、*E. corrodens* が好気下でヘムオキシゲナーゼ (HO) がヘムの meso 炭素原子への酸素分子由来の酸素原子の付加ヘムのピロール炭素原子上でのラジカル生成を経てヘムを開環分解するのと類似しておりポルフィリンの開環反応における普遍的な経路が示唆された。中間体であるラジカルをトラップする化合物は本酵素の阻害剤として、また、*E. corrodens* の生育抑制剤として機能することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Some Gram-negative bacteria including *Eikenella corrodens*, a facultative anaerobic bacterium that causes periodontal disease, import heme into the cytoplasm and utilize it as an iron source for their survival. Under aerobic condition, heme is degraded by canonical hemeoxygenase (HO); however, the enzyme which is responsible for heme degradation under anaerobic condition remains to be identified. We revealed that the anaerobic porphyrin ring-opening reaction is catalyzed by HmuW, an iron-sulfur cluster containing enzyme, in the presence of S-adenosylmethionine (SAM) and NADPH.

研究分野：生物無機化学

キーワード：ヘム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

鉄は呼吸によるエネルギー生産に必須の金属イオンであるため、生物は様々な鉄獲得機構を進化させてきた。病原性細菌において主たる鉄源は感染宿主の赤血球に含まれるヘモグロビン(Hb)である。一般的に、グラム陰性細菌は、① 溶血後 Hb から遊離したヘムをヘモフォア HasA によって外膜受容体 HasR まで輸送し ② 外膜・内膜を通し ③ 細胞質で分解することで生存に必須の鉄を抽出する。

私達はこれまで、*Pseudomonas aeruginosa* (グラム陰性好気性細菌 日和見感染の原因菌の一種で、皮膚、肺・気管支の炎症の原因細菌) *Yersinia pseudotuberculosis* (グラム陰性通性嫌気性細菌 胃腸炎の原因細菌) *Eikenella corrodens* (グラム陰性通性嫌気性細菌 歯周病の原因細菌) *Porphyromonas gingivalis* (グラム陰性偏性嫌気性細菌 歯周病の原因細菌) を研究材料にして「ヘムの細菌内への輸送」や「ヘムを分解して鉄の抽出」を行うタンパク・酵素の機能解析を実施してきた。そして、細菌は生育環境に応じて実に多様な鉄獲得のための仕組みを構築していることを明らかにした。さらに、ヘムの輸送を阻害することで病原性細菌の生育を阻害できることも実証した。具体的には、

- (1) *P. aeruginosa* (好気性) と *Y. pseudotuberculosis* (通性嫌気性) では、ヘムの輸送を担う HasA によるヘムの掴み方が異なること
- (2) *P. aeruginosa* の HasA にフタロシアニン鉄錯体を運ばせて外膜受容体 HasR のヘム通路に蓋をすると *P. aeruginosa* が生育しなくなる
- (3) 好气的条件において、*P. aeruginosa* や *E. corrodens* はヘム分解酵素ヘムオキシゲナーゼ(HO) を用いてヘムを biliverdin へと分解するのに対し、*Y. pseudotuberculosis* は HmuS と呼ばれる典型的な HO とは全く異なる酵素によって同様のヘム分解反応を行なっていること

などを明らかにした。ヘム分解酵素が HO のみではないことは極めて興味深く、また、重要な発見であったが、通性嫌気性細菌 (*Y. pseudotuberculosis*, *E. corrodens*) が嫌気条件で酸素分子を使わずに如何にヘムを分解して鉄を抽出しているかは未だ十分に解明されていなかった。

### 2. 研究の目的

以上の経緯を踏まえ、病原性細菌内の嫌气的条件下での鉄イオン動態を理解し、そのプロセスを阻害することで細菌の生育を抑制する方法を提示するという観点から、通性嫌気性細菌 (*Y. pseudotuberculosis*, *E. corrodens*) における嫌气的ヘム分解経路を解明し、その知見から阻害剤をデザイン・合成して細菌の生育抑制に寄与する知見を得ることを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

既に公表されているゲノム情報と偏性嫌気性菌のヘム分解酵素の遺伝子情報などから *Y. pseudotuberculosis*, *E. corrodens* における嫌气的ヘム分解遺伝子の候補を選び出し、コードされている酵素を発現、精製し、反応を行った後、生成物を LC/MS、LC/MS/MS などで同定した。酵素の構造、基質都合様式などをモデリング、ドッキングシミュレーションした。得られた知見をもとに反応機構を考察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 酵素の発現・精製と特徴

###### (a) HmuW(*yp*)ならびに HmuW(*ec*)の好気下での発現・精製

*Y. pseudotuberculosis* と *E. corrodens* から嫌氣的なへム分解に寄与している可能性のある酵素をコードしている遺伝子を選び、それぞれ *hmuW(yp)*と *hmuW(ec)*と名付け、N 末端に His-tag を付与して大腸菌の発現系を用いて発現させることに成功した。発現したタンパク HmuW(*yp*)と HmuW(*ec*)を Ni-NTA アフィニティカラムで精製し、プロテアーゼで His-tag を切断することで目的の酵素を精製することができた。HmuW(*yp*)は無色、タンパク精製・保存の過程で懸濁がみられた。一方、HmuW(*ec*)は 4Fe-4S クラスターに由来する黄色、タンパク精製・保存の過程で懸濁は見られなかったが、タンパク精製・保存の過程で脱色が観察された。

HmuW は 4Fe-4S クラスターを有するタンパクであることから、活性型 HmuW(*yp*)は精製できていない。一方、活性型 HmuW(*ec*)は精製できたが、好気下での精製では Fe-S クラスターが徐々に壊れていることがわかった。

###### (b) HmuW(*ec*)の好気下での発現・精製

4Fe-4S クラスターを有する活性型 HmuW(*ec*)をキャラクタリゼーションに十分な量を得るために ①培養時に鉄(Fe)源と硫黄(S)源を培地に添加すること ②溶菌後のタンパク精製プロセスを嫌気ボックス内で行い、可能な限りタンパクを酸素にさらさないこと などの工夫をすることで、4Fe-4S クラスターを有するタンパク特有の吸収スペクトルを示す活性型 HmuW(*ec*)を獲得することに成功した。

##### (2) 精製した HmuW(*ec*)を用いた S-adenosylmethionine (SAM) 依存嫌氣的へム分解反応

脱酸素化した緩衝水溶液にへム、SAM、NADPH あるいはクエン酸チタン(III)と活性型 HmuW(*ec*)を混合して嫌気ボックス内で反応させ、生成物を抽出し、LC/MS ならびに LC/MS/MS 分析を行なったところ、下記に示す嫌氣的にポルフィリン環が開裂したへム分解物と考えられる化合物を同定することができた(図 1 product A,B)。この分解物は SAM 由来の炭素原子が 1 つ付加したもので(図 1 青の炭素原子)、鉄が遊離した(鉄と錯形成していない)分解物であった。また、このへムの嫌氣的分解によって SAM から生じたと考えられる S-adenosylhomocysteine (SAH) 5'-デオキシアデノシン (5'-dA)も LC/MS 分析で確認した。

電子供与体としての NADPH あるいはクエン酸チタン(III)のいずれかが存在しない場合には、へムの分解は進行しなかった。同様に、SAM あるいは酵素が存在しない場合も分解物は得られなかった。また、好気下ではへム、SAM、NADPH あるいはクエン酸チタン(III)と HmuW(*ec*)を混合しても嫌氣的なへム分解物は得られなかった。こうした結果を総合して、嫌氣的なへムの分解では SAM のメチル基がへムの *meso* 炭素原子(図 1 青矢印)に付加し、その後、 $\alpha$ ピロール炭素原子にラジカルが生じ(図 1 赤矢印)、ポルフィリン環が開環するという反応機構を提案する。嫌気下ならびに好気下でのへムの分解機構の比較を図 1 に記す。

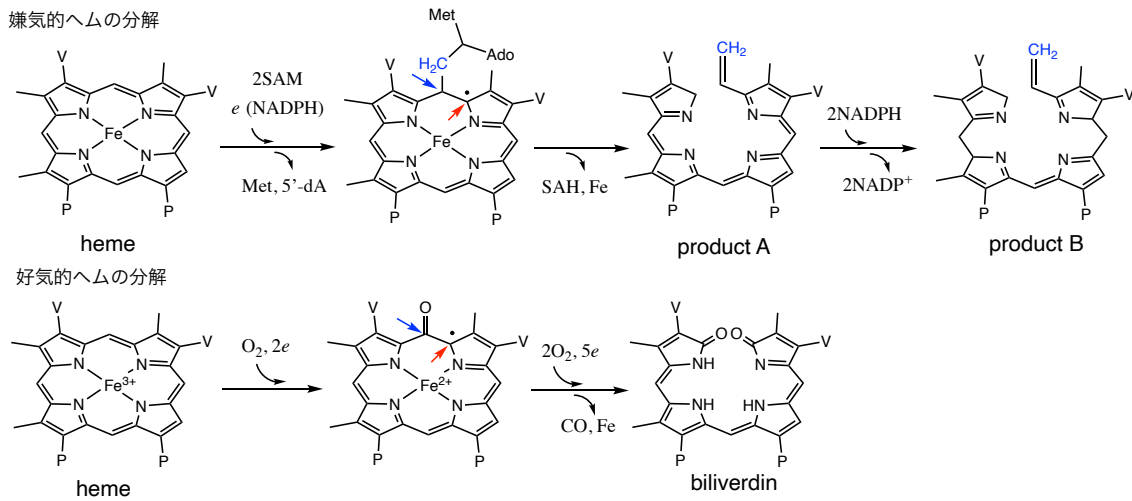


図1 嫌氣的ならびに好氣的ヘムの分解経路

### (3) 酵素の構造予測

HmuW の結晶構造は未だ明らかではないのでモデル構造を構築したところ、HmuW(*ec*)も HmuW(*yp*)も全体構造は類似していたが、HmuW(*ec*)は HmuW(*yp*)と比較してサイズが大きく N 末端に約 150 のアミノ酸残基が付与されており、その部分構造が HmuW(*ec*)の 4Fe-4S クラスターの維持、安定性に寄与している可能性が示唆された。

また、モデル構造に基質であるヘムと SAM をドッキングさせたところ、HmuW(*ec*)の 4Fe-4S クラスター付近に両基質が結合しうる予想モデルを構築することができた (図2)。

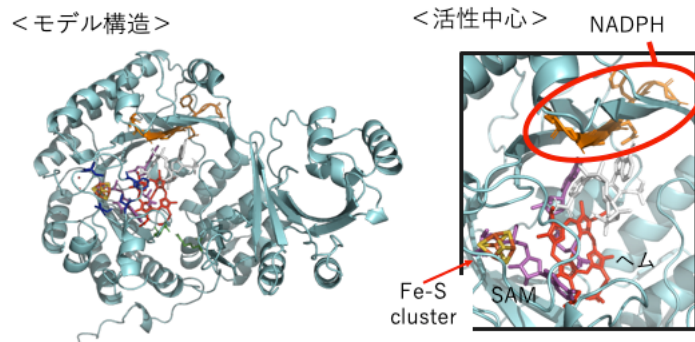


図2 HmuWモデル

### (4) 他の SAM 依存酵素による反応との比較など

これまでに報告されている嫌気生細菌が持つ SAM 依存嫌氣的ヘム分解酵素には、NADPH からの電子を仲介するフラボドキシソキシン様タンパクを必要とするものと、必要としないものに分類されるが、本研究で扱った HmuW(*ec*)は電子仲介のタンパクを必要としないものであった。

また、我々が別に扱っているフラボン、スチルベン、フェニルプロパノール骨格を持つ化合物のヒドロキシ基に SAM 由来のメチル基を付加する *O*-メチルトランスフェラーゼ(OMT)と SAM 依存的に嫌気下でヘム分解を行う HmuW(*ec*)とを比較しところ、いずれの SAM 依存酵素も SAM のメチル基由来の炭素原子が基質に付加されるという共通点がある一方で、HmuW(*ec*)による反応には電子供与体が必要であること、また、SAM 分解物として OMT には見られない 5'-dA が検出されることなどの違いがあることがわかった。

最後に、ヒトにおいてはヘムの分解物はグリコシルトランスフェラーゼ(GT)によって配糖体へ変換後に体外に排出されることが知られているが、我々が扱っている GT では本研究で得られた嫌氣的ヘムの分解物は配糖化されなかった。開環したヘムの分解物の菌体外への排出機構については未だ不明で今後の課題である。

#### まとめ

①HmuW(ec)は *E. corrodens* が嫌氣的に生育する際にヘムを開環して鉄を取り出す役割を担う酵素であること、②分解反応にメチル基ドナーの SAM、電子供与体 (NADPH あるいはクエン酸チタン(III)) が必須であること、がわかった。反応中間体と考えられるラジカルをトラップする化合物はヘムの分解を阻害し、生存に必須の鉄獲得を妨げることから、病原性細菌の生育抑制に寄与する可能性があるのではないかと期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Takao Koeduka, Bunta Watanabe, Konomi Shirahama, Masaru Nakayasu, Shiro Suzuki, Takumi Furuta, Hideyuki Suzuki, Kenji Matsui, Tomoyuki Kosaka, Shin-ichi Ozaki	4. 巻 113
2. 論文標題 Biosynthesis of dillapiole/apiole in dill ( <i>Anethum graveolens</i> ): characterization of regioselective phenylpropene O-methyltransferase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 562-575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.16068	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 Rakesh Maharjan, Yohta Fukuda, Taisuke Nakayama, Toru Nakayama, Hiroki Hamada, Shin-ichi Ozaki, Tsuyoshi Inoue	4. 巻 78
2. 論文標題 Structural basis for substrate recognition in the <i>Phytolacca americana</i> glycosyltransferase PaGT3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology	6. 最初と最後の頁 379-389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/s2059798322000869	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, R.; Fukuda, Y.; Shimomura, N.; Nakayama, T.; Nakayama, T.; Hamada, H.; Inoue, T.; Ozaki, S	4. 巻 59
2. 論文標題 <i>Phytolacca americana</i> PaGT2 is an Ambidextrous Polyphenol Glucosyltransferase.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2551-2561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00224.	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, R.; Fukuda, Y.; Nakayama, T.; Hamada, H.; Ozaki, S.; Inouem T.	4. 巻 76
2. 論文標題 Crown-ether-mediated crystal structures of the glycosyltransferase PaGT3 from <i>Phytolacca americana</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D: Structural Biology	6. 最初と最後の頁 521-530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2059798320005306	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大庭浩平 平野智子 小崎紳一
2. 発表標題 仮性結核菌におけるヘムの分解
3. 学会等名 錯体化学討論会
4. 発表年 2022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	樋口 恒彦  (Higuchi Tsunechiko)  (50173159)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授   (23903)	
研究分担者	木股 洋子  (Kimata Yoko)  (60255429)	山口大学・大学院創成科学研究科 ・教授   (15501)	
研究分担者	永野 真吾  (Nagano Shingo)  (60286440)	鳥取大学・工学研究科・教授   (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------