

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 25日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21550157

研究課題名(和文) ユニークな配位構造を用いてヘムをトランスポートするタンパク質の機能解析

研究課題名(英文) Characterization of heme transport proteins from pathogenic bacteria

研究代表者

小崎 紳一 (OZAKI SHINICHI)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：40280581

研究成果の概要(和文)：病原性細菌の中には、鉄が枯渇した環境においても生存していくために、感染先の組織からヘムを捕捉し、細菌内へと取り込み、分解して鉄源として利用するシステムを持つものがある。本研究では、こうしたヘム捕捉タンパクが感染組織に存在する遊離のヘムを掴まえ、しっかりと保持する上でヘム鉄と酸素原子との結合が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Iron is involved in a wide range of essential functions in various metabolic pathways; therefore, most bacteria have some form of iron-scavenging system in order to survive. Heme acquisition system A (HasA), secreted by various gram-negative pathogens, uses a unique histidine-iron-tyrosine (His-Fe-Tyr) or an iron-tyrosine (Fe-Tyr) coordination to scavenge heme. Our results suggest that the binding of heme in apoprotein is initiated by interactions between heme and hydrophobic residues in the heme binding pocket. Subsequent coordination of Tyr to the heme iron complete holoprotein formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ヘム

## 1. 研究開始当初の背景

ヘムタンパクは、(1)ヘモグロビンやミオグロビン等酸素分子の運搬・保存を行うもの(2)チトクロムbやc等電子伝達に関わるもの(3)P450、カタラーゼ、ペルオキシダーゼなど酸化還元反応を触媒するもの(4)CooAやFixLなどCOやO<sub>2</sub>といった小分子のセンサーとして働くものなどに大別できる。これ

までの「ヘムタンパク質の機能とヘム近傍構造に関する研究」の結果、(1)に属するヘムタンパクはFe-His 5配位(2)に属するヘムタンパクはHis-Fe-His 6配位(3)に属するヘムタンパクはCys-Fe、Tyr-Fe、あるいはHis-Fe 5配位(4)に属するヘムタンパクでは、His、Cysの配位を用いてそれぞれ独自の機能を果たしていることが明らかにされてきた。

研究開始当初、病原性細菌であるセラチア菌には、His-Fe-Tyr というユニークな配位構造を持つものがあり、このタンパクが細菌の生存にとって必須の鉄をへムから獲得する上で重要な役割をしている可能性があることが示唆された。そこで、「His-Fe-Tyr 配位は、へム獲得に関与するタンパクに普遍的なものなのか」また「こうしたタンパクは、His 並びに Tyr を如何に活用してへムの獲得・保持を行っているのか」を検証することとした。

## 2. 研究の目的

上記の研究背景・動向を踏まえて、「病原性細菌の生存に必須の鉄をへムから獲得・保持するタンパクが、どんな配位子をどのように活用しているのかを解明すること」を目的とした。

へム獲得の際には、感染先の組織においてへムを奪い取る役割を担うヘモフォアのみならず、ヘモフォアを菌体外へと分泌する役割を担うタンパク、ヘモフォアが捕獲・保持したへムを受け取り、菌体内へと取り込む役割を担う受容体など多くのタンパクが協同的に作用している。本研究では、ヘモフォアと受容体とを絞って実験を行うこととした。具体的には、

- (1) 緑膿菌、エルシニア菌などにおいてへム獲得に関与している可能性のあるタンパクを発現・精製する方法の確立
- (2) 各種分光法、結晶構造解析法などによる配位構造の確定
- (3) 生化学的手法などを駆使した機能解析を実施した。

## 3. 研究の方法

(1) クローニング：PCR により増幅したヘモフォア(HasA)ならびにへム受容体(HasR)の遺伝子を pQE や pBAD などのベクターへ導入し、それを大腸菌へと形質転換してタンパクの発現・精製に使用した。

(2) タンパクの発現・精製：HasA 遺伝子を含む大腸菌を培養・集菌し、溶菌液に溶解しているヘモフォアをニッケルイオンを固定化したアフィニティークラムと陰イオン交換カラムを用いて精製した。HasR は膜画分を準備し、それを可溶化した後、アフィニティークラムや陰イオン交換カラムで精製を試みた。

(3) 解析方法：①スペクトル解析：へムと結合したホロタンパクについて、吸収、ESR、共鳴ラマンスペクトルを測定した。

②へム獲得速度の測定：へムと結合していないアポ HasA は、1% HCl を含むアセトンとホロ HasA 溶液を混合することで調製した。そして、アポ HasA と遊離のへムあるいはヘモグロビンとを混合し、吸収スペクトル変化を観測することで HasA へのへムの取り込み

速度を決定した。高速プロセスの測定には、ストップトフローを使用した。

③タンパクの解析：HasA の質量分析は TOF-MS で行った。会合状態に関しては、ゲルろ過カラム、ゲルろ過 HPLC、Native-、Blue Native- PAGE で解析した。

## 4. 研究成果

(1) 緑膿菌、エルシニア菌、歯周病菌などにおいてへム獲得に関与している可能性のタンパクを発現・精製する方法の確立

BLAST, FAST サーチなどによりアミノ酸配列を比較し、*Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis* などにおいてへムの獲得に関与する可能性のあるタンパク、具体的には、ヘモフォア HasA 並びに受容体 HasR をコードしている遺伝子のクローニングした。遺伝子は His-tag を付け、大腸菌による発現系で発現させた。ヘモフォア HasA については、発現量も充分であり、ニッケルイオンを固定化したアフィニティークラムでタンパクを単離・精製することに成功した。アフィニティークラム後、陰イオン交換カラムをかけることでより純度の高いタンパクを得ることができた。一方、受容体 HasR は、発現量が低く、ニッケルイオンを固定化したアフィニティークラムを用いた精製では、各種実験に十分な量のタンパクを得ることはできなかった。しかし、遺伝子の末端に flag-tag を付けて発現させ、flag-tag に対する 1 次抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、膜画分に HasR が確認された。

(2) 各種分光法、結晶構造解析法などによる配位構造の確定

① *Pseudomonas aeruginosa* 由来 HasA のスペクトル

<野生型>吸収スペクトルを pH 7.3 の緩衝水溶液中 (PBS) で測定したところ、へム鉄が 3 価の時、407nm にへム由来の最大吸収が観測された。ESR では、 $g = 2.78, 2.19, 1.75$  に低スピンのへムに起因するシグナルが観測された。こうしたスペクトルは、HasA 野生型のホロタンパクが His-Fe(III)-Tyr 配位をしているという結晶構造解析の結果と矛盾するものではなかった。

<H32A 変異体>鉄に対する配位子の一つ His-32 を Ala に置換した変異体の吸収スペクトルを pH 7.3 の緩衝水溶液中で測定したところ、へム鉄が 3 価の時、404nm にへム由来の最大吸収が観測された。ESR では  $g = 6, 2$  の位置に高スピンのへム鉄によるシグナルが観測された。共鳴ラマンでは、 $\nu_3$  バンドが  $1483\text{cm}^{-1}$  に現れた。この位置は、Tyr を配位子とするカタラーゼの  $\nu_3$  バンドの位置と類似していた。こうした結果を総合して、

H32A 変異体は Tyr-75 のみを用いてヘムを保持できることが明らかになった。

<Y75A 変異体>鉄に対する配位子の一つ Tyr-75 を Ala に置換した変異体の吸収スペクトルを pH 7.3 の緩衝水溶液中で測定したところ、ヘム鉄が 3 価の時、405nm にヘム由来の最大吸収が観測された。また、ESR、共鳴ラマンの結果は低、高スピンの混合状態であった。一方、CO 体の吸収スペクトルでは、His-Fe(II)-CO 配位に特徴的な吸収バンドが 419 nm に観測された。以上を総合して、Y75A 変異体では、His-32 がヘム鉄に配位しているのではないかと判断した。

<H32A/Y75A 変異体>興味深いことに、本来の配位子 2 つを共に持たない H32A/Y75A 変異体にヘムを添加したところ、遊離のヘムとは異なる吸収スペクトルを示した。このことから、このダブル変異体は、ヘムと結合する能力を保持していると判断した。ヘム結合部位には、代替配位子として働くアミノ酸残基が存在しているように思われる。また、鉄を持たないプロトポルフィリンをヘムポケットに保持できることもわかった。このことは、ヘモフォアへのヘム取り込みには、配位子ばかりでなく、ポルフィリンと結合部位との間の疎水的相互作用も重要な役割を担っていることを示唆する結果であった。

② *Yersinia pseudotuberculosis* 由来 HasA のスペクトル

<野生型>アミノ酸配列を比較した結果、*Yersinia pseudotuberculosis* 由来 HasA には、*Pseudomonas aeruginosa* 由来 HasA で配位子の一つとして働く His-32 に対応する His 残基が存在しない。しかし、ヘム滴定の結果、*Yersinia pseudotuberculosis* 由来 HasA は、タンパクに対して 1 当量のヘムと結合することができることがわかった。ヘムと結合したホロタンパクは、403nm に最大吸収を持ち、ESR ならびに共鳴ラマンスペクトル解析により Tyr を配位子とする 5 配位高スピン状態であることがわかった。こうしたスペクトルの特徴は、*Pseudomonas aeruginosa* 由来 HasA の H32A 変異体を持つスペクトルの特徴と類似していた。

<Y75A 変異体>アミノ酸配列の解析により *Yersinia pseudotuberculosis* 由来 HasA の配位子として働いていると推測される Tyr-75 を Ala に置換し、ヘムと結合する能力を検証したところ、この変異体はタンパクと当量のヘムと結合できることがわかった。また、鉄を持たないプロトポルフィリンをヘムポケットに保持できることもわかった。このことは、ヘモフォアへのヘム取り込みには、配位子ばかりでなく、ポルフィリンと結合部位との間の疎水的相互作用も重要な役割を担っていることを示唆する結果であった。

そこで、*Yersinia pseudotuberculosis* 由来

HasA の野生型ならびに Y75A 変異体における配位子を確定するために結晶化を行い、結晶化条件の絞り込みを行っているところである。

(3) 生化学的手法などを駆使した機能解析

① *Pseudomonas aeruginosa* 由来 HasA の機能

<遊離のヘムとアポタンパクとの結合> 野生型 HasA のアポタンパクとヘムを混合し、遊離のヘムがヘモフォアに取り込まれるプロセスをラピッドスキャン検出器を備えたストップフローで追跡したところ、 $150 \pm 17 \text{ s}^{-1}$  の速いステップとそれよりも遅い  $3.8 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$  のステップの 2 段階を経て Tyr-Fe-His 配位のホロタンパクへと変換されていることがわかった。

また、変異体についても同様の実験を実施し、ヘムとの結合速度を測定した結果、H32A 変異体では  $190 \pm 7.6 \text{ s}^{-1}$ 、Y75A 変異体では  $5.6 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$  という結果が得られた。さらに、H32A/Y75A 変異体もヘムと結合する能力を保持していること、野生型 HasA は鉄を持たないプロトポルフィリン IX と結合する能力を持っていることなども明らかになった。

これらの結果から、*Pseudomonas aeruginosa* 由来 HasA のアポタンパクによる遊離のヘムの取り込みは、疎水性相互作用により結合部位へと取り込まれたヘムがまず Fe-Tyr 配位を素早く作り、その後、ゆっくりと Fe-His 配位が形成されることによって、Tyr-Fe-His 配位を完成させているということがわかった。

<ヘモグロビンから HasA へのヘムの移動>

「HasA はヘモグロビンと相互作用をしてヘムを積極的に引き抜いているのか」を検証するために、HasA のアポタンパクとヘモグロビンを混合し、吸収スペクトル変化をモニターし、ヘムの移動速度を測定した。その結果、ヘモグロビンから HasA へのヘムの移動速度は  $1.5 \text{ h}^{-1}$  で、ヘモグロビンからヘムが遊離する速度と類似していた。こうした観察結果は、ヘモグロビンから遊離したヘムがアポ型ヘモグロビンによって再び掴まえられるよりも先にアポ型 HasA がヘムを捉え、離さないでいることを示唆していると考えられた。

② *Yersinia pseudotuberculosis* 由来 HasA の機能

*Yersinia pseudotuberculosis* 由来 HasA は、*Pseudomonas aeruginosa* 由来 HasA で配位子の一つとして働く His-32 に対応する His 残基が存在しないが、*Pseudomonas aeruginosa* 由来 HasA とほぼ同等の速度で遊離のヘムと結合する能力を持っていることが確認された。また、ヘモグロビンからの

ヘムの移動速度は  $1.5 \text{ h}^{-1}$  で、ヘモグロビンからヘムが遊離する速度と類似していた。以上より、HasA はヘムタンパクから遊離したヘムを Tyr を用いて、素早く、がっちりとは掴む役割を担っていることが示唆された。

さらに、異なる2つの細菌から単離されたHasAの特徴を比較する中で、*Pseudomonas aeruginosa* 由来 HasA のホロタンパクは主として単量体として存在しているのに対し、*Yersinia pseudotuberculosis* 由来 HasA のホロタンパクは、単量体のみならず、二量体、多量体が混在しており、平衡を保っていることが、ゲルろ過カラム、Native-, Blue Native-PAGE による解析の結果から示唆された。*Yersinia pseudotuberculosis* 由来 HasA のホロタンパクは5配位状態であるため、このようにいくつかの状態を取り得るのではないかと推測される。

#### (4) 総括と今後の展望

HasA は、ヘムタンパクから遊離したヘムを素早く奪い取り、保持して、HasR へと渡す役割を担っている。今回、*Pseudomonas aeruginosa* と *Yersinia pseudotuberculosis* 由来の HasA について調べた結果、こうしたプロセスに、ヘムとタンパク結合部位との疎水性相互作用、ならびに、Tyr とヘム鉄との配位が重要であることが明らかになった(図1)。今後、ヘム受容体である HasR の発現量を向上させ、精製方法を確立することで、HasA から HasR へとヘムが移動する仕組みがタンパクレベルで解明され、こうした研究が、細菌の生存において必須の鉄源としてのヘム獲得に関わるタンパクを標的とした抗菌剤の探索に広い意味で役立つことが期待される。

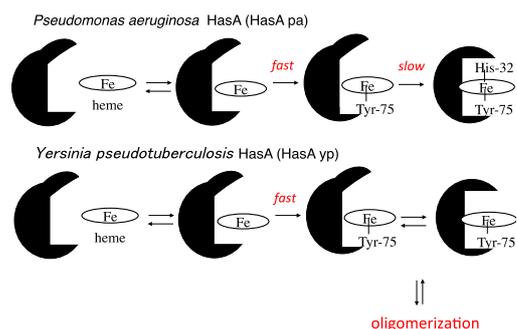


図 1

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Ozaki, S., Nakahara, A., Sato, T. Mechanism of heme uptake by heme acquisition system A. *Chemistry Letters*, **2011**, *40*, 362-363. 査読有

- ② Ozaki, S., Sakaguchi, C., Nakahara, A., and Yoshiya, M. Mutagenesis studies of human cystathionine  $\beta$ -Synthase: Residues important for heme binding and substrate interactions. *Protein & Peptide Letters*, **2010**, *17*, 351-355. 査読有
- ③ Ukita, S., Fujii, T., Hira, D., Nishiyama, T., Kawase, T., Migita, C.T., Furukawa, K. A heterodimeric cytochrome c complex with a very low redox potential from an anaerobic ammonium-oxidizing enrich, *FEMS Microbiology Letters*, **2010**, *313*, 61-67. 査読有
- ④ Mogi, T., Ano, Y., Nakatsuka, T., Toyama, H., Muroi, A., Miyoshi, H., Migita, C.T., Ui, H., Shiomi, K., Omura, S. Biochemical and spectroscopic properties of cyanide-insensitive quinol oxidase from *Gluconobacter oxydans*, *Journal of Biochemistry*, **2009**, *146*, 263-271. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 小崎紳一, 病原性微生物によるヘムの輸送機構、錯体討論会、2011年9月17日、岡山理科大学 岡山市
- ② 小崎紳一, 病原性微生物によるヘム捕捉機構、生体分子科学討論会、2011年6月23日、筑波大学 筑波市
- ③ 佐藤豪洋, 小崎紳一, ヘムを捕捉するタンパクの機能とスペクトル、錯体化学討論会、2010年9月27日、大阪国際交流センター 大阪市
- ④ 小崎紳一, ヘムを捕捉するタンパクの機能とスペクトル、バイオ関連化学シンポジウム、2010年9月26日、大阪大学 大阪市
- ⑤ 小崎紳一, Heme acquisition system A (HasA)の機能とスペクトル、生体分子科学討論会、2010年6月19日、山口大学 山口市
- ⑥ 小崎紳一, Heme acquisition system A (HasA)によるヘム獲得機構について、日本生化学会 中国・四国支部例会、2010年5月15日、山口大学 山口市
- ⑦ 中原章, 小崎紳一, 緑膿菌由来のヘム結合タンパクに関する研究、生体関連化学シンポジウム、2009年9月14日、九州大学 福岡市
- ⑧ Ozaki, S., Redox-dependent change in the coordination of heme acquisition system A, International Conference on Bioinorganic Chemistry, 2009年7月29日, Nagoya.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小崎 紳一 (OZAKI SHINICHI)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：40280581

(2) 研究分担者

右田 たい子 (MIGITA TAIKO)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：90159161