

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550182

研究課題名(和文) 病原性細菌の鉄取り込みに関与するタンパク質の構造・機能に関する研究と創薬への応用

研究課題名(英文) Characterization of the proteins involved in iron uptake system of pathogen and its application to development of anti-bacterial drugs

研究代表者

内田 毅 (Uchida, Takeshi)

北海道大学・理学(系)研究科(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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は病原菌の一つであるコレラ菌が増殖に必要とする鉄を獲得する機構を明らかにすることを目的とした研究である。主要な鉄源は血液中のヘモグロビンに存在するヘムがであることから、ヘモグロビンからのヘムを獲得とそれを分解し、鉄を取り出す一連のタンパク質を網羅的に解析した。その結果、VCA0907がヘム分解酵素であり、その酵素活性は活性中心に存在する水素結合の強度により、制御されることがわかった。また、基質であるヘムはVCA0908から受け取ることがわかった。ヘムを分解し、鉄を取り出す過程は病原菌の増殖に必須の過程であることから、新たな病原菌増殖剤の開発につながり可能性を見いだすことができた。

研究成果の概要(英文)：Iron is an essential element for bacteria survival. To obtain this element, bacterial pathogens utilize heme from hemoglobin in blood as an iron source, because the vast majority of iron in human body is present as heme. In this project, we found that VCA0907 (HutZ) from *Vibrio cholerae* is a heme-degrading enzyme. The activity of VCA0907 depends on the strength of the hydrogen bond between His170 that is a sole ligand of heme, and Asp132. We further found that VCA0908 (HutX) binds to heme with a slightly higher affinity than that of HutZ. Unexpectedly, heme, which is bound to HutX, irreversibly moves to HutZ. We concluded that heme that is transported into cytosol is captured by HutX, and then it is transferred to HutZ through the direct interaction with HutX. Finally, HutZ degrades heme to release iron, which is used for survival of *V. cholerae*. Because iron is an essential element, our findings lead to development of a new kind of medicine for pathogens.

研究分野：生物無機化学

キーワード：病原菌 鉄 酵素 ヘム

1. 研究開始当初の背景

衛生環境の優れる日本では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性細菌の感染者は相当数に上り、いまだに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、死者は5千人を超え、いまだに感染に歯止めが掛からない状態である(外務省海外安全ホームページより)。また、我が国においても、近年、海外渡航歴のない人が感染するケースが増えており、日本国内においてコレラ菌が常在菌化している可能性が指摘されている。遺伝子解析からハイチで発生したコレラ菌は国連により派遣された他国の部隊が持ち込んだものと考えられており、日本において感染が広がらなくても、移動手段の発達した現代においては、いつ我々が感染源になるかわからないような状況である。

本研究では、このような病原性細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の取り込みに注目する。細菌は自己増殖する際、自身のエネルギー生産のために必要な蛋白質を合成するが、それらの蛋白質は鉄イオンを補因子として有するものが多いため、鉄を必要とする。動物のように食餌として鉄分を摂取できない細菌は宿主から獲得する。人の体内にはおよそ4~5gの鉄が存在するが、そのうち70%がヘモグロビンに存在するため、ヘモグロビンが細菌の鉄源となりうる。細菌はヘモグロビンと結合する蛋白質を分泌し、ヘムのみ細菌内部に取り込み、それを分解し、鉄を取り出し、使用する。まるで、強盗が人に襲いかかり、財布(=ヘム)からお金(=鉄)をとり出すようなことが細菌に感染された体内で行われている。そこで、細菌の自己増殖を抑え、人体への影響を軽減するためには、細菌の鉄の補給路を断つことが有効な手段であると考えられる。

病原性細菌は数多く存在するが、本研究では感染の広がりに対し、蛋白質レベルでの研究が遅れており、いまだにその有効な対策法が必要とされるコレラ菌に着目する。コレラ菌はゲノム配列が解読されており、他の生物の遺伝子情報との比較から、Hut (Hemin utilization) と呼ばれる一群の蛋白質が鉄の取り込みに関与していると推測されている。それによると、HutA, HutR, HasR という外膜蛋白質が細菌内部にヘムを取り込み、HutB という可溶性の蛋白質が膜間部においてヘムを輸送し、内膜蛋白質である HutCD を通り、細胞質内に取り込まれ、さらに、直接または、HutX という蛋白質を介して、HutZ にヘムが渡り、HutZ がヘムを分解し、鉄を取り出すと考えられている。しかし、蛋白質レベルでの研究はいまだほとんど行われていないのが研究を開始したときの状況であった。

2. 研究の目的

病原性細菌の一つであるコレラ菌は自身の増殖に鉄原子を必要とする。その獲得に関与するのが Hut と呼ばれる一群の蛋白質である。Hut 蛋白質を欠損させたコレラ菌は生存できなくなることから、Hut 蛋白質はコレラ菌の増殖を抑制する薬剤ターゲットと考えられるが、蛋白質レベルでの研究はほとんど行われていない。そこで、一連の Hut 蛋白質を網羅的に発現・精製し、構造・機能解析を行うことで、鉄の取り込み機構及び獲得した鉄の利用機構を明らかにし、さらに、それらの知見を元に、病原性細菌の鉄の獲得・利用を阻害する化合物を設計し、細菌の増殖を抑制する薬剤の開発へつなげる。

3. 研究の方法

(1) タンパク質の発現系の構築

Hut 蛋白質 (HutA, HutB, HutC, HutD, HutX, HutZ) の遺伝子を cDNA ライブラリからクローニング後、大腸菌での発現系を構築し、それらの発現・精製を行う。

(2) ヘムの結合

基質であるヘムの結合能をヘムによる光吸収を利用し、滴定実験により求める

(3) HutZ のヘム分解活性

電子供与体として過酸化水素、またはアスコルビン酸を利用し、ヘム分解活性を測定する。

(4) 活性部位周辺構造

活性部位であるヘム近傍の構造を吸収スペクトル、ラマンスペクトル、円偏光二色性スペクトル等分光学的手法を用い、明らかにする。

(5) HutX から HutZ へのヘムの輸送

HutX から HutZ へのヘムの輸送を吸収スペクトルを用い検討する。

4. 研究成果

(1) タンパク質の発現:

発現系を構築した HutA, HutC, HutD, HutW, HutX, HutZ のうち、可溶性タンパク質と予測された HutX, HutZ は発現・精製ができたが、HutW と膜タンパク質と予想された HutA, HutC, HutD は解析に十分なタンパク質が得られなかったため、以降の実験は HutX, HutZ のみで行った。

(2) ヘムの結合:

紫外可視吸収スペクトルを利用した滴定実験により HutX と HutZ のヘムの結合とその解離定数を求めた。その結果、HutX には2個、HutZ には1個のヘムが結合し、その解離定数はそれぞれ 0.02 μM 、0.050 μM で、HutX は HutZ に比べ、ヘムの親和性が約2倍高かった。

(3) HutZ のヘム分解活性:

ヘム分解酵素は過酸化水素と反応させるとベルドヘムと呼ばれるヘム分解酵素にしか形成されない特徴的な中間体を生ずる。そこで、HutZ と過酸化水素を反応させ、紫外可視吸収スペクトルにより、ベルドヘムが生成

するか観測した。その結果、過酸化水素添加後、数分以内にペルドヘムに特徴的な吸収が観測されたことから、HutZ はヘム分解酵素の特徴をもつことがわかった。その反応速度は pH に依存し、pH 6 では pH 8 に比べ、20 倍以上速かった。コレラ菌体内では、過酸化水素のような酸化剤ではなく、還元酵素から電子が供給されると考えられることから、還元剤としてアスコルビン酸を使用し、過酸化水素と同様に反応を追跡した。過酸化水素の場合同様、反応は pH に依存し、pH 6 以下で活性、pH 8 以上ではほぼ不活性であり、その pK_a は pH 7 付近であった。活性の pK_a 値は活性部位であるヘムに結合した水分子の pK_a 値とほぼ一致していることがわかった。

(4) 活性部位周辺構造：

この pH 依存性の原因を明らかにするため、活性中心の構造に関して検討した。基質であり、活性中心でもあるヘムは特徴的な共鳴ラマンスペクトルを与えることから、共鳴ラマン分光法を用い、ヘム周辺の構造について検討した。その結果、ヘムとタンパク質間の唯一の結合である His170 が Asp132 と水素結合を形成していることが分かった。この水素結合の強度が pH 依存的に変化しており、酵素活性の pH 依存性の原因であることがわかった。つまり、His170-Asp132 間の水素結合の強度が強まると His170 のイミダゾール環が陰イオン性のイミダゾレートになり、His170 からヘムへの電子の押し込みが強くなり、その結果、ヘムの酸化還元電位が負側に移動するため、ヘム分解の最初の過程である鉄の還元が起こらなくなることがわかった。逆に、His170-Asp132 間の水素結合の強度が弱まると His170 からヘムへの電子の押し込みが減少し、還元されやすくなり、酵素が活性になる。このような水素結合の強度変化による活性制御機構はこれまでに報告はなく、HutZ に特徴的な新規の性質を発見することができた。

(5) 水素結合と活性制御：

上記のように酵素活性の制御において中心的な役割を果たす His170 とヘム平面を挟んで反対側には、水分子がヘムと結合しており、この水分子が Arg92 と水素結合を形成していることがわかった。さらに、この Arg92 と水分子の水素結合の強度が上記の His170 と Asp132 間の水素結合の強度と相関していることがわかった。つまり、Arg92 と水分子の水素結合を切断すると His170 と Asp132 の水素結合が弱まり、活性が上昇した。また、ヘムのプロピオン酸は His63 及び Thr94 と水素結合しており、この水素結合を切断しても活性が上昇した。ヘムタンパク質の活性中心に水素結合が存在する場合、活性に必須の存在であることがほとんどであるが、HutZ の場合、水素結合を切断すると酵素活性が上昇するという他のヘムタンパク質に存在しない特徴を有していることが分かった。これは、鉄は菌体の増殖に必須の元素である一方、

過剰に存在すると、酸化ストレスなどを誘発し、有毒であることから、過剰に鉄を獲得しないように酵素活性が制御されているためと思われる。

(6) HutX から HutZ へのヘムの輸送：

HutX の機能は不明であったが、相同タンパク質においてヘムと結合するという報告があったことから、HutZ へのヘムの輸送体である可能性を検討した。ヘムが HutX に結合した時と HutZ に結合した時とでは吸収スペクトルが異なることから、ヘムがどちらに結合しているか吸収スペクトルから判断が可能である。そこで、ヘムと結合した HutX にヘムを結合していない HutZ を加え、吸収スペクトルの変化を観測した。混合直後のスペクトル、HutX ではなく HutZ にヘムが結合したスペクトルであった。その状態に 10 倍量のヘムを結合していない HutX を加えても、吸収スペクトルに変化はなかったことから、HutX から HutZ へのヘムの移動は測定の不感時間 (~30 秒) 内に起こり、不可逆反応であることがわかった。この HutX から HutZ へのヘムの移動は、HutX の方がヘムの親和性が HutZ より高いため、ヘムの親和性の高い方から低い方へ一方的にヘムが輸送するという特徴的なものであった。これは、HutX が HutZ と複合体を形成することにより、構造変化が誘起され、親和性が変化し、不可逆的 HutZ にヘムが輸送されるものと思われ、現在、複合体の形成に関する構造化学的情報の解析を行っている。

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2件)

Takeshi Uchida, Yukari Sekine, Toshitaka Matsui, Masao Ikeda-Saito, and Koichiro Ishimori, A heme degradation enzyme, HutZ, from *Vibrio cholerae*, Chemical Communications, 査読有、Vol. 48, 2012, pp. 6741-6743

DOI:10.1039/C2CC31147J

Shin-ichi Ozaki, Takehiro Sato, Yukari Sekine, Catharina T. Migita, Takeshi Uchida, Koichiro Ishimori, Spectroscopic studies on HasA from *Yersinia pseudotuberculosis*, Journal of Inorganic Biochemistry, 査読有、Vol. 138, 2014, pp. 31-38

DOI:10.1016/j.jinorgbio.2014.04.013

[学会発表](計22件)

内田 毅、関根 由可里、宗田 壮一郎、石森 浩一郎、コレラ菌の鉄取り込み機構、第 39 回生体分子科学討論会、2012 月 6 月 8-9 日、東北大学(宮城県・仙台市)

Takeshi Uchida, and Koichiro Ishimori, "O₂-dependent oxidation mechanism of iron response Regulator (Irr)", 7th International Conference on Porphyrins

and Phthalocyanines (ICPP-7) 2012 月 7 月 1-6 日, International congress center Jeju (Korea)

内田 毅、佐々木 美穂、関根 由可里、宗田 壮一郎、石森 浩一郎「ヘムから鉄を引き抜くコレラ菌由来の新規蛋白質の構造と機能」第 49 回日本生化学会北海道支部例会、2012 月 7 月 20 日、北海道大学(北海道・札幌市)

関根 由可里、内田 毅、松井 敏高、齋藤 正男、石森 浩一郎「コレラ菌由来 HutZ によるヘム分解反応と活性中心周辺の構造」第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、2012 月 9 月 6-8 日、北海道大学(北海道・札幌市)

内田 毅、佐々木 美穂、関根 由可里、宗田 壮一郎、石森 浩一郎「コレラ菌に存在するヘムから鉄を引き抜く酵素の反応と構造」第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、2012 月 9 月 6-8 日、北海道大学(北海道・札幌市)

内田 毅、佐々木 美穂、石森 浩一郎「コレラ菌に存在するヘムから鉄を引き抜く酵素の反応と構造」第 45 回酸化反応討論会、2012 月 11 月 16-17 日、名古屋市立大学(愛知県・名古屋市)

Takeshi Uchida, Miho Sasaki, and Koichiro Ishimori, Heme Demetallation Enzyme from *Vibrio cholerae*, The First International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012), 2012 月 11 月 28-30 日、東京工業大学(東京都・目黒区)

Miho Sasaki, Takeshi Uchida, and Koichiro Ishimori, Heme Demetallation Enzyme from *Vibrio cholerae*, 8th Nanjing-Suzhou-Hokkaido-NIMS/MANA Joint Symposium on Frontiers of Chemistry, 2012 月 12 月 6-7 日、北海道大学(北海道・札幌市)

佐々木 美穂、内田 毅、石森 浩一郎「コレラ菌由来ヘムから鉄を引き抜く酵素の反応と構造」化学系学協会北海道支部 2013 年冬季研究発表会、2013 月 1 月 29-30 日、北海道大学(北海道・札幌市)

関根 由可里、内田 毅、石森 浩一郎「HutZ の活性中心近傍に存在する水素結合によるヘム分解活性の制御」2012 年度日本生物物理学会北海道支部例会、2013 月 3 月 5 日、北海道大学(北海道・札幌市)

佐々木 美穂、内田 毅、石森 浩一郎、Dye-decolorizing peroxidase によるヘムからの鉄の引き抜き反応、第 40 回生体分子科学討論会、2013 年 6 月 7-8 日、大阪大学(大阪府・吹田市)

佐々木 美穂、内田 毅、石森 浩一郎、コレラ菌 DyP 型ペルオキシダーゼによるヘムからの鉄遊離機構、第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013 年 6 月 12-14 日、とりぎん文化会館(鳥取県・鳥取市)

Takeshi Uchida, Miho Sasaki, and Koichiro Ishimori, Demetallation of Heme by Dye-Decolorizing Peroxidase from

Vibrio cholerae, International Congress of Bioinorganic Chemistry (ICBIC 16), 2013 年 7 月 22-26 日, Alpexpo center of Grenoble, Grenoble, (France)

内田 毅「コレラ菌の鉄獲得戦略」第 86 回生化学会大会、2013 年 9 月 11-13 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

佐々木 美穂、内田 毅、石森 浩一郎、Dye-decolorizing peroxidase による色素分解反応とヘムからの鉄を引き抜き反応に関する考察、第 46 回酸化反応討論会、2013 年 10 月 15-16 日、筑波大学(筑波県・つくば市)

内田 毅、病原菌の鉄獲得機構 -コレラ菌のヘム分解酵素を中心に、合同シンポジウム、2013 年 11 月 22 日、北海道大学(北海道・札幌市)

道順 暢彦、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 における活性中心への配位制御、第 51 回日本生化学会北海道支部例会、2014 年 7 月 18 日、北海道大学(北海道・札幌市)

内田 毅、Heme-iron uptake proteins from *Vibrio cholerae*, 第 52 回生物物理学会年会、第 52 回生物物理学会年会、2014 年 9 月 25-27 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

道順 暢彦、関根 由可里、石森 浩一郎、内田 毅、コレラ菌由来 HutZ のヘム分解活性制御機構の解明、第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2014、2014 年 10 月 14-16 日、タワーホール船堀(東京都・江東区)

佐々木 美穂、石森 浩一郎、内田 毅、コレラ菌由来 DyP 型ペルオキシダーゼの色素分解反応における活性部位の同定、第 47 回酸化反応討論会、2014 年 11 月 14-15 日、市民会館崇城大学ホール(熊本県・熊本市)

21. Takeshi Uchida, Heme Uptake proteins, Bacterial pathogens, Frontiers in Chemical Sciences 2014 @ SNU & HU, 2014 年 11 月 28 日、北海道大学(北海道・札幌市)

22. 佐々木 美穂、石森 浩一郎、内田 毅、コレラ菌 DyP 型ペルオキシダーゼによる色素分解反応機構、2014 年度日本生物物理学会北海道支部例会、2015 年 3 月 13 日、北海道大学(北海道・札幌市)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
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) 研究代表者

内田 毅 (UCHIDA TAKESHI)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：30343742

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：