

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号 : 82401
研究種目 : 若手研究 (B)
研究期間 : 2012~2013
課題番号 : 24770110
研究課題名 (和文) 病原菌による鉄の取り込み機構の分子論
研究課題名 (英文) Structural study of heme transporter from pathogenic bacteria
研究代表者 直江 洋一 (Naoe Youichi)
独立行政法人理化学研究所・加藤分子物性研究室・特別研究員
研究者番号 : 70464146
交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,500,000 円、(間接経費) 1,050,000 円

### 研究成果の概要 (和文) :

病原性のバクテリアは、感染した宿主のヘムを取り込み鉄源として利用している。ヘムの取り込みを行っているのがヘムトランスポーターという膜タンパク質である。ヘムトランスポーターによるヘム輸送機構の分子レベルでの理解を目指して、ヘムトランスポーターの結晶構造解析に挑戦した。最終的に分解能  $3.5 \text{ \AA}$  のヘムトランスポーターの結晶を得ることに成功した。またヘムが結合していると思われる色のついたヘムトランスポーターの結晶化にも成功した。

### 研究成果の概要 (英文) :

Pathogenic bacteria sequester heme from the infected host as an iron source. Heme transporter is the membrane protein used to transport heme into the cytoplasm. To further understanding of the transport mechanism, I have pursued X-ray crystallographic analysis. Through trial and error,  $3.5 \text{ \AA}$  resolution crystal of heme transporter was obtained. In addition, colored crystal thought to be heme-bound has been obtained.

### 研究分野 : 生物学

科研費の分科・細目 : 生物科学・構造生物科学

キーワード : ヘム、膜タンパク質、ABC トランスポーター、結晶

### 1. 研究開始当初の背景

緑膿菌やペスト菌などの病原菌はヒトや家畜等の宿主に感染する際、血液中にあるヘム(鉄-ポルフィリン錯体)を取り込み(奪い取り)鉄源として利用している。ヘムの取り込みを行っているのが本研究対象であるヘムトランスポーターという膜タンパク質である。菌体内に取り込まれたヘムはヘム分解酵素であるヘムオキシゲナーゼによってビリベルジンと遊離の鉄に分解される。遊離した鉄は様々な金属タンパク質の活性中心で利用される(図 1)。一方、宿主側は病原菌の感染を阻止するため、遊離のヘムを積極的に回収していることが知られている。つまり病原菌の観点からすれば、ヘムトランスポーターがヘムを輸送できるか否かが感染の律速となっている。感染した病原菌の鉄獲得経路を遮断して兵糧攻めにするという概念から、ヘ

ムトランスポーターは抗生物質のターゲットとしても注目されており、詳細な輸送機構の解明が望まれている。

ヘムトランスポーターは、細胞外のヘムを捕獲する PP と、膜貫通領域である TM、ATP 結合ドメインである NBD が 1:2:2 の 5 量体を形成した膜タンパク質であり(図 1)、ABC トランスポーターファミリーに属する。PP が捕獲したヘムを TM が受け取り、NBD による ATP 加水分解エネルギーを利用してヘムを輸送すると考えられているが肝心のヘムの認識と解離の機構が全く分かっていない。これまで知られているヘムタンパク質はヘムの鉄原子に His や Tyr などのアミノ酸側鎖を配位結合させることによりヘムを活性中心に固定していた。このことから、ヘムトランスポーターにおいても基質であるヘムの認識には His や Tyr に

よる配位結合を用いていると予想される。実際、最近構造解析に成功した PP は His や Tyr を用いた配位結合でヘムを認識していた。しかし配位結合は疎水性相互作用や水素結合などに比べ強固な化学結合であり、どのような仕組みで一度認識（結合）したヘムを解離させるのか、その詳細は不明であると同時に興味深い。

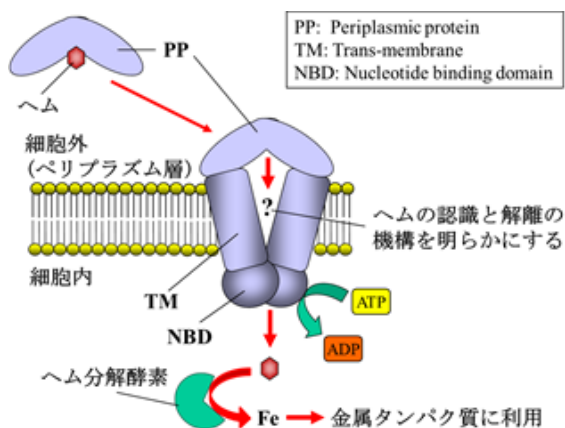


図 1: ヘムトランスポートのサブユニット構造と病原菌の鉄源獲得のストラテジー。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヘムトランスporterによるヘムの認識と解離の詳細を分子レベルで明らかにすることで病原菌によるヘムの輸送機構及び鉄獲得能を理解することを目的とした。そのための主な研究手法として X 線結晶構造解析を用いた。

## 3. 研究の方法

本研究は結晶化に最適なヘムトランスporterを見つけるところから始まった。最初に、ヒトに感染することが知られているグラム陰性菌で、かつゲノム上で PP, TM, NBD がオペロンを形成しているヘムトランスporterすべてをデータベースから調べた。その中の各属から 1 種ずつを選んで、12 種類のヘムトランスporterのコンストラクトを準備した。PP と TM が強く相互作用するものは、結晶化の際に親水性領域が増えるため結晶化に有利であるという考えのもと、PP と TM が強く相互作用するコンストラクトの選別を行った。選別方法には GFP を用いた蛍光ゲルろ過法を用いた。まず PP に GFP を付けたコンストラクトを作成し、それを発現させた菌体の破碎液をゲルろ過に流して、GFP 由来の蛍光を測定する。次に PP-GFP の発現菌体破碎液に TM-NBD を発現して可溶化したモノを加えて再び蛍光

ゲルろ過を行う。PP と TM が強く相互作用する場合は PP-TM-NBD 複合体を形成するため PP-GFP に由来する蛍光が高分子量側にシフトする(図 2)。このような方法を経て 12 種類のコンストラクトの中から病原菌 *Burkholderia cenocepacia* 由来のヘムトランスporterを選別、結晶構造解析に用いた。

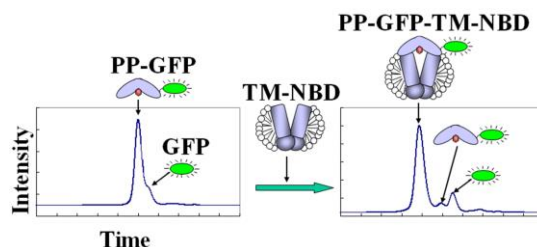


図 2: 蛍光ゲルろ過法を用いたヘムトランスporterの選別のイメージ。横軸に溶出時間、縦軸に GFP の蛍光強度をとっている。左側は PP-GFP のみのチャート、右側は PP-GFP に可溶化した TM-NBD を加えたときのチャート。

選別されたヘムトランスporterをコードするプラスミドを大腸菌 C41 (DE3) 株に形質転換し、LB 培地で大量培養を行った。得られた菌に対しフレンチプレスと超遠心機を用いて膜画分を得た。膜画分に界面活性剤を加えてヘムトランスporterを可溶化後 Ni-NTA agarose とゲルろ過カラム Superdex 200 を用いて目的タンパク質を精製した。精製したヘムトランスporterを結晶化に適した濃度に加えて濃縮した。精製、濃縮したヘムトランスporterをシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化した。沈殿剤の濃度、種類、pH 等、結晶化スクリーニングで得られたパラメーターの最適化を行い、結晶化条件の精密化を行った。得られた結晶に対し、SPring-8 ビームライン BL41 XU を用いて結晶の回折強度データを収集した。この時、回折データ収集に適したクライオプロテクタントの条件の検討も行った。

ヘムトランスporterの位相決定に向けて、メチオニン要求の大腸菌株 B834 (DE3) と最小培地を用いて、温度 (16, 25, 30°C)、IPTG 濃度 (0.3 mM, 1.0 mM) 等をパラメーターにしてセレノメチオニン誘導体の培養条件検討も行った (表 1, 図 5)。

## 4. 研究成果

(1)ヘムトランスporterの結晶化について。申請時に得られていたヘムトランスporterの結晶の分解能向上のため、ヘムトランスporterをノニルグルコシド (以下 NG) という界面活性剤で精製、シッティングドロップ

ブ法による結晶化を行った。その結果、20°C, 5% PEG 2K, 100 mM HEPES (pH 7.6)の条件で分解能 3.5 Å の結晶を得ることに成功した (図 2)。



図 2 :NG で精製したヘムトランスポーターの結晶。

得られたヘムトランスポーターの回折強度データについて分子置換法による位相決定を試みた結果、主鎖を認識できる程度の電子密度を得ることができた (図 3)。

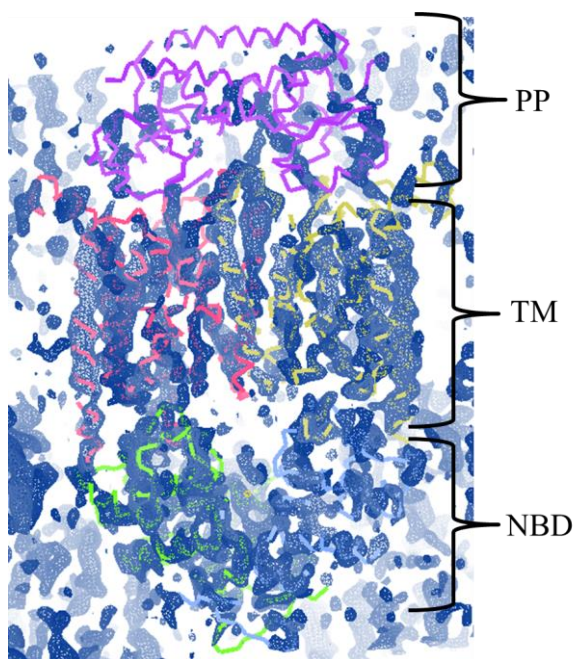


図 3: ヘムトランスポーターの電子密度図と主鎖モデル。

しかしヘムトランスポーターによるヘムの認識と解離の機構を明らかにするためには、側鎖の構造情報が必要であり、さらなる結晶の分解能向上のためオクチルグルコシド (以下 OG) という界面活性剤での精製を試みた。試行錯誤の末、スクロースやグリセ

ロール等の添加材を加えることで OG を使った精製に成功し、結晶化にも成功した。また 20°C, 33% PEG400, 0.2 M MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M KCl, 25 mM Sodium Citrate (pH4.0) の条件でヘムが結合していると思われる色のついたヘムトランスポーターの結晶化にも成功した (図 4)。これはヘムトランスポーターがどのようにヘムを認識しているのかを明らかにするために重要な結晶である。



図 4: ヘムトランスポーターの有色結晶。

(2)ヘムトランスポーターの位相決定に関して。前述した結晶の構造解析のためにはヘムトランスポーターのセレノメチオニン誘導体等が必須となる。メチオニン要求株である大腸菌 B834 (DE3) 株においてヘムトランスポーターの最適な発現条件検討を行った。誘導時の温度や IPTG 濃度の他に、コントロールとして、培地 (最小培地や LB 培地)、発現菌株等もパラメーターとして加えた (表 1)。検出方法は TM について His タグへのウェスタンブロッティングを用いた (図 5)。その結果、最も発現量の多い条件は 16°C, 0.3 mM IPTG であることが分かった。

表 1: B834 における TM の発現条件検討

ID	Temp.	IPTG	Medium	Strain
1	16°C	0.3 mM	Min	B834
2	25°C	0.3 mM	Min	B834
3	30°C	0.3 mM	Min	B834
4	16°C	1.0 mM	Min	B834
5	25°C	1.0 mM	Min	B834
6	30°C	1.0 mM	Min	B834
7	16°C	0.3 mM	LB	B834
8	16°C	0.3 mM	LB	C41
9	25°C	1.0 mM	Min	B834
10	16°C	1.0 mM	Min	C41
11	16°C	0.3 mM	LB	C41

※ Min は最小培地、B834 は B834 (DE3) 株、C41 は C41 (DE3) 株をそれぞれ意味する。

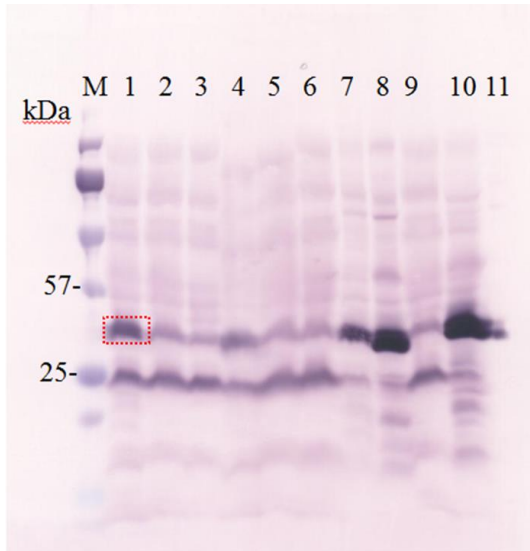


図 5: B834 (DE3) におけるヘムトランスポーターの発現条件検討。TM についている His-tag へのウェスタンブロッティングの結果。M は分子量マーカーを意味し、レーンの上にかかれた各数字は表 1 の ID にそれぞれ対応している。TM-His の計算分子量は約 38.8 kDa であり、レーン 1 の条件での発現量が多いことが分かる(赤の破線)。

(3)ヘムトランスポーターの一部でヘムを捕獲する可溶性のタンパク質 PP 単体での結晶化も行った。その結果、4°C, 17% PEG3350, 230 mM Calcium Acetate と 4°C, 2.0 M Ammonium Sulfate, 100 mM Acetic acid pH4.6 ~ 4.8 の条件でそれぞれ結晶が得られた。それぞれの回折強度データを収集し、現在解析中であるが、以下のことが分かった。前者の結晶化条件では PP は 2 つのヘムと結合しているのに対し、後者の結晶化条件では 1 つのヘムと結合していた。PP はヘムを 2 つ結合する場合には、Tyr88 と His193 を使うのに対し、ヘムを 1 つ結合する場合には、Tyr88 のみを使っていることが分かった (図 6 a-b)。このことは PP はヘムを結合する際に、Tyr88 と His193 を等価に用いているのではなく最初に Tyr88 で 1 つ目のヘムを認識した後に 2 つめのヘムを His193 で認識している可能性を示唆している。これらの結果をうけ、PP の Y88F, H193A, Y88F と H193A のダブルミュータントのコンストラクトを作成した。今後はこれら PP の変異体を用いたヘム輸送実験を行い、PP に結合したヘムの数とヘム輸送機構への影響について調べる必要がある。

最近、ヘムと結合していない Apo PP の結晶を得ることに成功した。結晶化条件は、4°C, 8% v/v Tacsimate pH 5.0, 20% PEG 3350 であった。

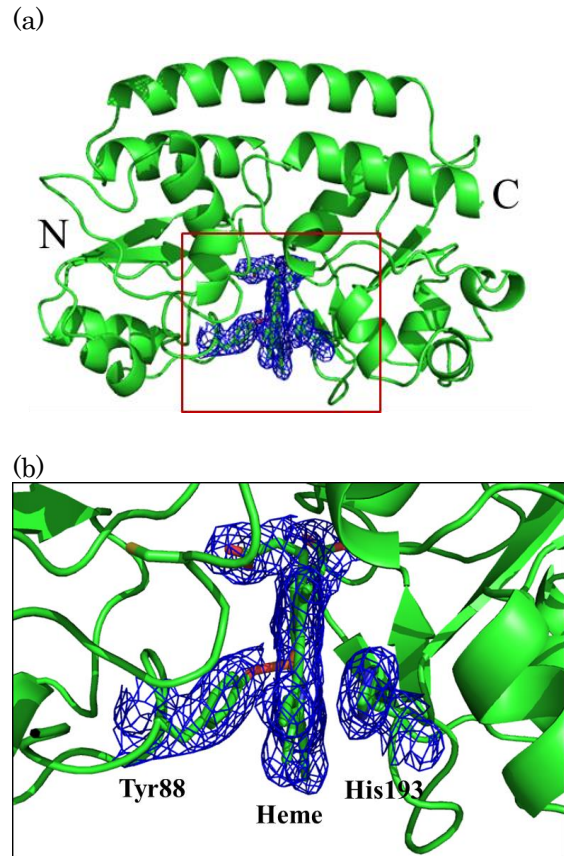


図 6: ヘムを 1 つ結合した状態の PP の結晶構造。(a) が全体構造で、Tyr88 と His193 とヘムのみ電子密度を表示してある。四角で囲ってある部分を拡大したのが (b) となる。

(4)ヘムトランスポーターの機能解析について。精製したヘムトランスポーターをリボソームに取り込み、プロテオリポソームの系の確立に成功した。プロテオリポソーム中のヘムトランスポーターに ATP の加水分解活性があることも確認できた。このとき、過剰量のヘムはヘムトランスポーターの ATP 加水分解活性を阻害することを発見した。

さらにヘムトランスポーターからヘムを受け取る細胞内タンパク質である HmuS の発現と精製を試みた。HmuS の精製はヘム輸送活性測定に必須である。GST 結合 HmuS を発現させた大腸菌をフレンチプレスで破碎し、その上清を GS4B レジンに流し、PreScission 処理して溶出してきたモノをゲルろ過カラム Superdex 200 に流した (図 7)。ゲルろ過の後半のフラクションを採り、精製 HmuS とした。SDS-PAGE を見る限り、精製された HmuS のバンドは計算分子量よりもやや低分子量側に位置していると同時に、3 つくらいバンドが重なって見えていた。このことから、この HmuS は

末端側のいくつかのアミノ酸残基が分解されていると考えられる。今後は質量分析等を行い、分解されているアミノ酸残基を正確に見積もり、HmuS コンストラクトを再設計する必要があると思われる。

(2)研究分担者  
無し

(3)連携研究者  
無し

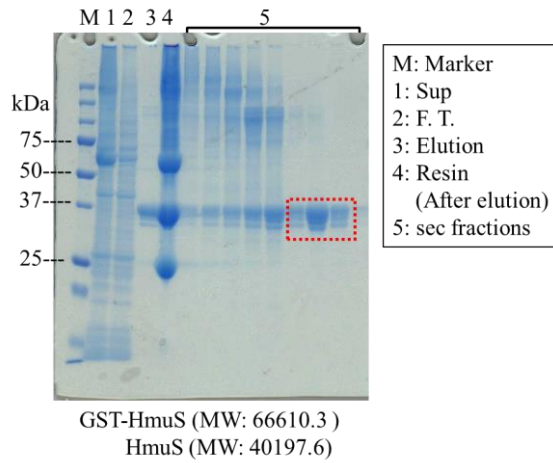


図 7: HmuS の精製過程の SDS-PAGE。赤の破線で囲った部分を採取し、精製 HmuS とした。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

1. 直江 洋一、沢辺 美亜、杉本 宏、城 宜嗣  
Crystal structure of novel periplasmic heme binding protein.  
2012年 12月 2~6日、アジア結晶学会、アデレードコンベンションセンター (オーストラリア アデレード)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 無し

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

直江 洋一 (NAOE, Youichi)

独立行政法人理化学研究所 加藤分子物性研究室 特別研究員

研究者番号: 70464146