

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2013～2015

課題番号：25410176

研究課題名(和文)ヘム要求性歯周病菌の「ヘム取り込み機構の解明」および「生育阻害剤の探索」

研究課題名(英文)Mechanism of heme transfer and metabolism by pathogenic bacteria

研究代表者

小崎 紳一 (Shin-ichi, Ozaki)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：40280581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：生物にとって鉄は必須の金属イオンである。微生物をはじめとする生物は鉄獲得のために様々なシステムを持っており、シデロフォアを介した機構もその一つである。しかし、動物体内での遊離の鉄濃度は極めて低い。そこで、病原性細菌の中には宿主に豊富に存在する血液中のヘムを鉄源として活用しているものもある。本研究では、ヘムを鉄源として生育する3種類の病原性細菌(Pseudomonas aeruginosa, Yersinia pseudotuberculosis, Eikenella corrodens)について、ヘムが菌体内に取り込まれる仕組み、ヘムから鉄が遊離する仕組みを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Iron is a metal element essential for pathogenic bacteria, but the iron in host cells is tightly bound to proteins such as ferritin or transferrin. Under such circumstances, host heme could be a major source of iron. Some Gram-negative pathogens utilize an extracellular heme-binding protein called hemophore to satisfy their needs for iron. We elucidated heme transport in Pseudomonas aeruginosa, Yersinia pseudotuberculosis, and Eikenella corrodens by spectroscopic and crystallographic methods.

研究分野：生物無機化学

キーワード：ヘム 鉄 構造解析 機能解析

1. 研究開始当初の背景

鉄は生物にとって必須の金属イオンである。タンパクと結合し、呼吸や代謝など生命活動に不可欠なプロセスで重要な役割を果たしているからである。従って、生物は生存に必須の鉄獲得のために多様なシステムを有している。

病原性細菌が、感染先の宿主から遊離の鉄を獲得するために活用しているシデロフォアを介した仕組みもその一つである。しかし、遊離の鉄は、活性酸素種の発生を促進する触媒となりうるので、それを防ぐために、生体内ではトランスフェリンやフェリチンなどのタンパクと強く結合している。結果として、動物体内での遊離の鉄濃度は極めて低く保たれている。

そこで、病原性細菌は、宿主(人畜)に豊富に存在する血液中のヘムを鉄源として活用する仕組みも持ち合わせている。鉄源としてのヘムの取り込み、ならびに、ヘムからの鉄引き抜き過程は、病原性細菌の生存戦略にとって極めて重要なプロセスである。

2. 研究の目的

病原性細菌の生存戦略に重要なヘムの取り込み、ならびに、ヘムからの鉄引き抜きプロセスを解明し、その機構を阻害する化合物を病原性細菌の生育を抑制するために活用することを目指して本研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

Pseudomonas aeruginosa, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Eikenella corrodens* の3種類の病原性細菌から、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。

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* を用いて実施した。

ヘムの分解反応で得られる生成物の同定は、LC、LC/MS などを用いて検証した。

4. 研究成果

(1) *Y. pseudotuberculosis* は、グラム陰性通性嫌気性桿菌の一種で、腸やリンパ節など酸素濃度が低い環境で感染症を引き起こす。我々は、溶血した宿主のヘモグロビンからヘムを奪い、細菌の外膜に存在する受容体

にまで運ぶ役割を担っている、*Y. pseudotuberculosis* の分泌タンパク、ヘモフォア HasA が、

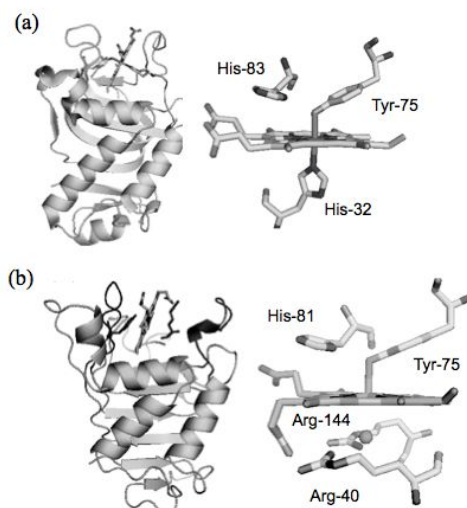
サブユニットあたり一分子のヘムと結合できること

ヘムとの結合にはチロシンのヘム鉄への配位とアルギニンとヘムとの相互作用、具体的には、グアニジン基とヘムのカルボキシル基との電子的相互作用、ヘム平面とのスタッキング、ヘム近傍に存在する水分子との水素結合が重要であること

2 価のヘムともこの HasA が結合可能であること

などを明らかにした。

Y. pseudotuberculosis 由来の HasA のヘム近傍構造は、チロシンとヒスチジンを鉄の配位子として利用することでヘムを保持している *P. aeruginosa* 由来の HasA とは異なっていた。アニオン性ヒスチジン(即ち、イミダゾレート)と鉄との配位かわりに、*Y. pseudotuberculosis* の HasA は、アルギニン-ヘム相互作用をヘム分子の保持に用いることでヘム鉄が2 価であっても、ヘムをタンパク内に取り込むことが可能にしていることがわかった。*P. aeruginosa* が、グラム陰性好気性細菌で、呼吸器や皮膚など比較的酸素濃度が高い環境で感染症を引き起こすのに対して、*Y. pseudotuberculosis* は、腸やリンパ節など酸素濃度が低い環境で感染症を引き起こすことを考慮すると、ヘモフォア HasA のこうした違いは、嫌気的環境に生きる *Y. pseudotuberculosis* の生存戦略において着目すべき相違であると考えられる。



(a) *P. aeruginosa* と (b) *Y. pseudotuberculosis* の HasA の結晶構造 左：全体構造 右：ヘム結合部位

(2) *Y. pseudotuberculosis* には、*P. aeruginosa* が持つ典型的なヘムオキシゲナーゼ (HO)

は存在しない。かわりに、病原性大腸菌の ChuS と類似するアミノ酸配列を持つタンパクがヘムから鉄を引き抜く役割を担っている可能性があることを明らかにした。具体的には、本タンパクは、

サブユニットあたり一分子のヘムと結合できること

ヒスチジンがヘム鉄の配位子であること

酸素分子とヘム鉄を還元するための還元当量、具体的にはアスコルビン酸、存在下でヘムのポルフィリン環を酸化的に分解し、分解生成物はビリベルジンと同じ分子量、クロモフォアを持っていること

などを明らかにした。

さらに、本分解反応では、ビリベルジンとは異なる色の分解生成物も生成されることを確認した。進化の過程で、細菌はヘムから生存に必須の鉄を得るために、典型的な HO 以外のヘム分解系を獲得したのかもしれないと考えられる。

(3) *P. aeruginosa*, *Y. pseudotuberculosis*, *E. corrodens* の Fur (Fe uptake regulator) 結合領域の下流に存在する遺伝子群を大腸菌を宿主として発現、精製し、その機能を検証している過程で、Dye-type peroxidase (Dyp) と相溶性の高いタンパクを大腸菌に大量発現させると、菌体内にプロトポルフィリン IX が大量に蓄積する組替体ができることを突き止めた。

P. aeruginosa, *Y. pseudotuberculosis*, *E. corrodens* 由来の Dyp (i.e. Dyp_{pa}, Dyp_{yp}, Dyp_{ec}) は、何れも、

サブユニットあたり一分子のヘムと結合できること

ヒスチジンがヘム鉄の配位子であること

軸配位子であるヒスチジンに変異を施すと、野生型とは異なり、プロトポルフィリン IX の蓄積が観察されなくなること

などを明らかにした。

P. aeruginosa と *E. corrodens* は典型的な HO を有しており、HO による酸化的なポルフィリン環の分解過程で鉄がヘムから引き抜かれていると考えられる。一方、*Y. pseudotuberculosis* には典型的な HO は無いが、ChuS と類似するタンパクが、HO と類似する酸化的なポルフィリン環の分解プロセスを担い、ヘムからの鉄の獲得に寄与している。今回の我々の観察結果は、ポルフィリン環の酸化的分解を伴わないプロセスも、ヘムからの鉄の引き抜きのために病原性細菌は持ち合わせている可能性を示している。

(4) ヘムを鉄源として活用する仕組みは、生存に必須の鉄を獲得するために病原性細

菌が有する固有の生存戦略であり、こうした仕組みは宿主には存在しない。従って、菌体内へのヘムの取り込みやヘムからの鉄の引き抜きを阻害することで、病原性細菌の生育を抑制し、感染症を抑えられる可能性がある。

P. aeruginosa では、フタロシアニンの鉄作体が HasA から外膜受容体 (i.e. HasR) へのヘムの移動を阻害するため、生育を抑制できることがわかった。一方、*Y. pseudotuberculosis* では、同様の方法で生育を抑制できなかった。

病原性細菌の生存戦略に打ち勝つには、細菌ごとに固有の阻害システムを見つけなければならないと考えられる。

まとめ

腸やリンパ節などで感染を起こすグラム陰性通性嫌気性細菌 *Y. pseudotuberculosis*、呼吸器や皮膚などで感染を起こすグラム陰性通好気性細菌 *P. aeruginosa*、歯茎などで歯周病の原因細菌となるグラム陰性通性嫌気性細菌 *E. corrodens* について、鉄源としてのヘム取り込み、ヘムからの鉄引き抜きのプロセスを検証した。その結果、感染場所の違いにより、ヘム取り込み [(1)を参照] や鉄引き抜き [(2)を参照] の仕組みが異なることを示した。また、ヘムからの鉄引き抜きには、HO や ChuS によるヘムの酸化的分解のみならず [(2)を参照]、ポルフィリン環の分解を伴わないプロセス [(3)を参照] も関与していることがわかった。鉄獲得は重要なプロセスであるため、病原性細菌は多様な仕組みを持ちあわせている。従って、それらを阻害するプロセスも [(4)を参照]、病原性細菌種ごとに精密に検討する必要がある。

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 3 件)

本研究に関連ある主な発表論文を記載

Masahiro Kanedani, Takehiro Sato, Tomoya Hino, Shingo Nagano, Shin-ichi Ozaki, The Crystal Structure of Heme Acquisition System A from *Yersinia pseudotuberculosis* (HasA_{Ypt}): Roles of the Axial Ligand Tyr75 and Two Distal Arginines in Heme Binding, *J Inorg Biochem*, 査読有, 2015, 151, 26-33. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2015.07.007

Chikako Shirataki, Osami Shoji, Mitsuyoshi Terada, Shin-ichi Ozaki, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, Yoshihito Watanabe, Inhibition of Heme Uptake in *Pseudomonas aeruginosa* by

its Hemophore (HasA(p)) Bound to Synthetic Metal Complexes, *Angewandte Chemie*, 査読有, 2014, 53 (11), 2862-2866.
DOI: 10.1002/anie.201307889

Shin-ichi Ozaki, Takehiro Sato, Yukari Sekine, Catharina T. Migita, Takeshi Uchida, Koichiro Ishimori, Spectroscopic studies on HasA from *Yersinia pseudotuberculosis*, 査読有 *J Inorg Biochem*, 2014, 138, 31-38.
doi:10.1016/j.jinorgbio.2014.04.013

[学会発表](計7件)
本研究に関連ある主な学会発表を記載

Masahiro Kanedani, Takehiro Sato, Tomoya Hino, Shingo Nagano, Shin-ichi Ozaki, Heme transport and metabolism in *Yersinia pseudotuberculosis*, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December 15~20, 2015, Honolulu (USA)

Shin-ichi Ozaki, Mariko Matsuguchi, Kaho Yoshimi, Takehiro Sato, Ryo Yasukawa, Roles of distal arginine residues for heme uptake by HasA from *Y. pseudotuberculosis*, 65回 錯体討論会, 2015年9月21日~23日, 奈良女子大学(奈良県、奈良市)

小崎紳一, 佐藤豪洋, 安川諒, 金谷雅弘, 金谷雅弘, 日野智也, 永野真吾, 病原性細菌由来のヘム結合タンパクによるヘム認識, 64回 錯体討論会, 2014年9月18日~20日, 中央大学(東京都、文京区)

Shin-ichi Ozaki, Takehiro Sato, Masahiro Kanedani, Tomoya Hino, Shingo Nagano, Heme acquisition system in pathogenic bacteria, International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, June 22~27, 2014, Istanbul (Turkey)

小崎紳一, 佐藤豪洋, 安川諒, 金谷雅弘, 日野智也, 永野真吾, 病原性細菌由来のHasAによるヘム獲得プロセス, 第7回バイオ関連シンポジウム, 2013年9月27日~29日, 名古屋大学(愛知県、名古屋市)

益子玲生奈, 安川諒, 小崎紳一, *Yersinia pseudotuberculosis* 由来 dye-type peroxidase の機能, 第13回日本蛋白質科学会, 2013年6月12日~14日, とりぎん会館(鳥取県、鳥取市)

永野真吾, 日野智也, 金谷雅弘, 佐藤豪洋, 小崎紳一, *Yersinia pseudotuberculosis* 由来ヘム獲得蛋白質 HasA の結晶構造が示すユニークなヘム結合様式, 第13回日本蛋白質科学会, 2013年6月12日~14日, とりぎん会館(鳥取県、鳥取市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小崎 紳一 (Shin-ichi Ozaki)
山口大学・農学部・教授
研究者番号: 40280581

(2) 研究分担者

阿座上 弘行 (Hiroyuki Azakami)
山口大学・農学部・教授
研究者番号: 40263850

永野 真吾 (Shingo Nagano)
鳥取大学・工学研究科・教授
研究者番号: 60286440

右田 たい子 (Catharina T Migita)
山口大学・農学部・教授
研究者番号: 90159161