

「病原菌の鉄源としてのヘムの濃度を感知するタンパク質の分子機構解析」
 兵庫県立大学大学院生命理学研究科 澤井 仁美

1 研究の背景と目的

ヘム (鉄-ポルフィリン錯体) は、生体内で様々な機能を担っている。その代表的な機能は、ヘムが補欠分子族としてタンパク質に結合し、酸素の運搬貯蔵・電子伝達・各種基質の酸化還元・気体分子の感知のための活性中心となることである。ヘムは生命維持に必須の分子であるが、細胞内でタンパク質に結合していない遊離のヘムは、活性酸素種を発生させ、細胞毒性を示す。その毒性を回避するために、生物は細胞内のヘム濃度を厳密に制御するシステムを有しているが、細胞内のヘム濃度をどのように感知しているのかは、すべての生物において詳細が未解明である。ある種の病原菌の場合、菌体内でヘムを生合成できないため、宿主動物の細胞からヘムを奪い取って分解することにより菌体増殖や宿主動物への感染のための鉄源としてヘムを獲得する。その際、菌体内に余剰な遊離ヘムが流入するため、病原菌はそれを感知して細胞外へ排出するためのタンパク質システムを発現させて細胞毒性を回避することが明らかになっている [Fernandez, A. *et al.* **PLoS Pathogens** 6, e1000860 (2010)]。したがって、病原菌が菌体内に余剰になった遊離ヘムの濃度を感知できなくなると、細胞毒となるヘムを捨てることができず死滅に至るため、菌体内のヘム濃度を感知するヘムセンサータンパク質は新たな抗菌剤開発のターゲットとなる。本研究では、新生児の肺炎や髄膜炎の起炎菌 *Streptococcus agalactiae* (アガラクチア菌) 由来のヘムセンサータンパク質 PefR を研究対象とし、その構造機能解析によりヘム濃度の感知とそれに伴う機能制御機構を原子レベルの分解能で解明することを目的とした。

2 研究方法・研究内容

本研究を開始する前に、PefR は遊離ヘムに応答して標的 DNA との結合を制御し、ヘムを排出するためのタンパク質をコードする遺伝子の発現を制御するリプレッサー型の転写調節因子であることを明らかにできていた。つまり、PefR は遊離ヘムを感知 (結合) すると標的 DNA から解離してヘム排出タンパク質の発現を誘導することを突き止めていた (図 1)。そこで本研究では、はじめに、ヘムを結合せず標的 DNA に結合している状態「DNA 結合型 PefR」ならびにヘムを結合し標的 DNA に結合できない状態「ヘム結合型 PefR」の単結晶を調製し、X 線結晶構造解析により立体構造を明らかにした。

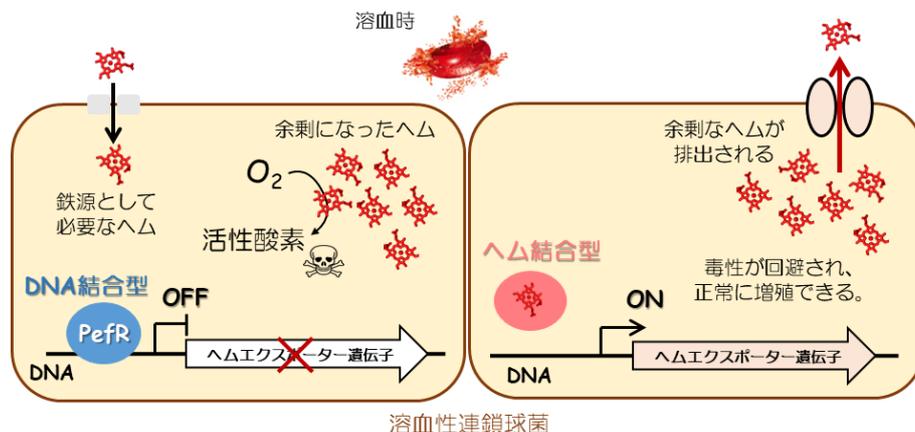


図 1: 溶血性連鎖球菌におけるヘムの毒性回避システム

大型放射光施設 SPring-8 の BL41XU で X 線回折データを収集し、DNA 結合型 PefR の立体構造を分解能 2.5Å、ヘム結合型 PefR は分解能 1.7 Å で決定した。これらの立体構造を比較することにより、遊離ヘムの結合（感知）に伴う構造変化を見出すことができた。PefR は二量体を形成しており、遊離ヘムの中心鉄を His114 ともう一方のサブユニットのアミノ末端にある Met1 の主鎖窒素を用いて結合させ、ヘムの周りには疎水性ポケットが形成されていた。これに伴い、二量体間をまたぐ位置にある $\alpha 1$ ヘリックスの配向が変化し、それに続く DNA 結合部位 ($\alpha 2-4$ と $\beta 1-2$) 間の距離が 20 Å くらい離れることを明らかにした (図 2)。この結果は、ヘムの結合を引き金としてタンパク質の大きな構造変化が誘起されることを示した初めての例である。

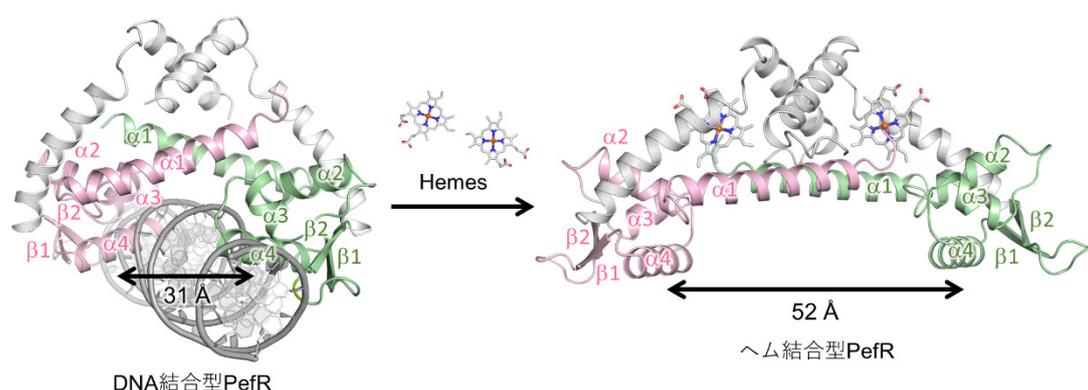


図 2: PefR の X 線結晶構造とヘムの感知（結合）に伴う大きな構造変化

さらに、等温滴定カロリーメトリーならびにヘミン滴定による PefR のヘム結合特性の解析により、PefR はヘムを強く安定に結合できることを明らかにした (K_d 610 nM)。つまり、ヘムを結合して標的 DNA から解離したヘム結合型 PefR は、生理的条件下ではヘムを結合したままの状態が存在していることになる。したがって、ヘム結合型 PefR には、一般的なヘムタンパク質に類似する性質があるのではないかと考え、分光学的解析や一酸化炭素 (CO) などの外因性リガンドがヘム鉄に結合した PefR の X 線結晶構造解析を行った。その結果、ヘム結合型 PefR はミオグロビンに類似する一酸化炭素 (CO) 結合能を有することを明らかにした (表 1)。これは、ヘムに応答するセンサータンパク質が CO などの外因性リガンドを安定に結合する性質を持つことを示した初めての例である。

表 1: CO 結合解離の速度定数 (k_{on} , k_{off}) と結合親和性 (K_d)

Protein	k_{on} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_d (μM)
PefR	0.41	0.014	0.033
Sperm whale myoglobin	0.51	0.019	0.037
Human hemoglobin α -chain	2.9	0.0046	0.0016 ^a
Human hemoglobin β -chain	7.1	0.0072	0.0010 ^a
Human cytoglobin	5.6	0.0030	n.d.
Human neuroglobin	50/65	0.014	0.00021
Rat heme oxygenase-1	1.3/0.31	0.0090	0.0067 ^a / 0.029 ^a
CooA + DNA	32 ^b	0.021	0.00066
CooA - DNA	24 ^b	0.023	0.00096
RcoM-2	0.016	0.000064	0.004 ^a
K ⁺ channel (SUR2A)	0.17	0.05	0.6

^a Values were not described in reference and computed by dividing k_{off} into k_{on} value.

^b Values for fastest and most abundant phase in three phases were taken.

3 研究成果

上記の研究により、新生児の肺炎や髄膜炎の起炎菌である溶血性連鎖球菌 *S. agalactiae* が有するセンサータンパク質 PefR は、宿主動物の赤血球の溶血時に菌体内に余剰になったヘムを結合することで、構造変化が誘起され、標的 DNA から解離できるコンフォメーションに変化することを明らかにした。これにより、ヘム排出タンパク質の発現が促進し、余剰なヘムが菌体外へと排出され *S. agalactiae* は遊離ヘムによる細胞毒性を回避できる。さらに、ヘムを結合し標的 DNA から解離した状態の PefR は、宿主動物におけるヘムの分解により放出された CO が菌体内に侵入した時、その細胞毒性を回避するための「CO 捕捉体」として機能できる可能性を初めて提唱した。本研究により、宿主動物と溶血性細菌間の鉄源の獲得機構において、PefR は複数の生理機能（ヘムセンサー・転写調節因子・CO 捕捉体）を担う珍しいタンパク質であることを初めて明らかにできた（図 4）。今後は、本研究で明らかにした様々な状態における PefR の立体構造を鋳型にして、PefR による細胞毒性回避を阻害するような薬剤を見つかることで、新規な抗菌薬の開発に貢献できると考えられる。

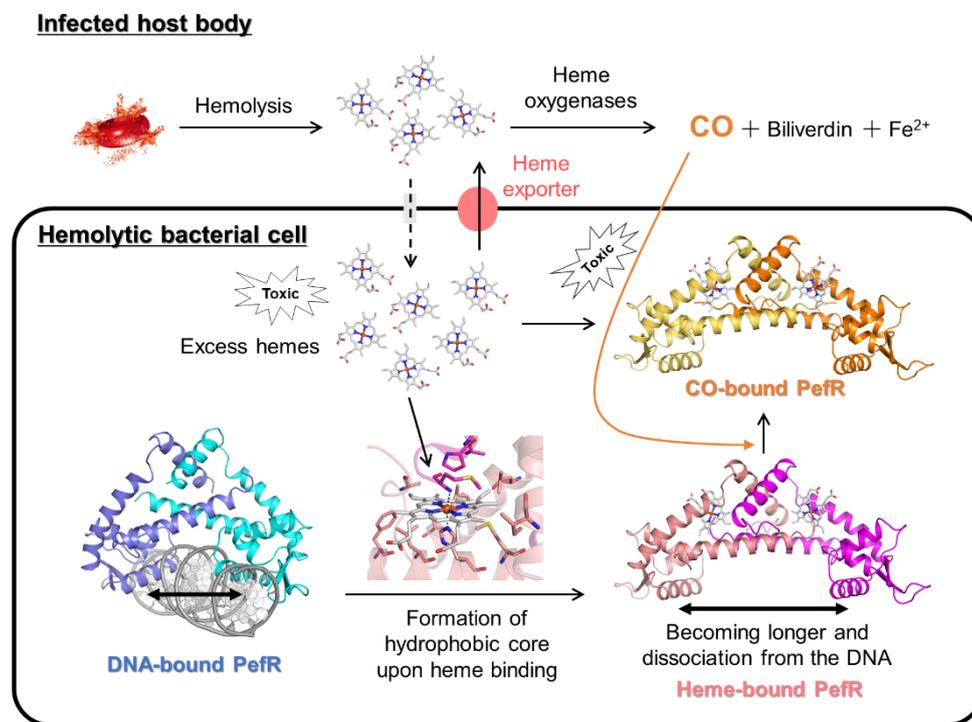


図 4：溶血性連鎖球菌が菌体内のヘム鉄や CO による細胞毒性を回避するメカニズム

本研究成果について、2020 年度に開催されている国際会議 3 件（11th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines [米国ニューヨーク]、Gordon Research Conference: Chemistry and Biology of Tetrapyrroles [米国ニューポート]、The 2020 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies [米国ハワイ]）にて招待講演を行う予定である。

4 生活や産業への貢献および波及効果

近年、薬剤耐性菌が蔓延し、将来的には抗菌薬が効かなくなることが世界的にも深刻な問題となっている。世界保健機関 WHO は、2050 年には年間 1,000 万人が細菌感染によって死亡すると予測している。一方で、抗菌薬の開発は停滞しており、アメ

リカでもここ 10 年間で 2 つの抗菌薬が承認されただけである。その原因の 1 つとして、新たな抗菌薬の開発シーズがなかなか見つからないことがあげられる。既存の抗菌薬の多くは、病原菌の細胞膜・核酸・タンパク質などの合成を阻害する薬剤である。本研究により、病原菌がどのようにしてヘムや CO の毒性を回避するのかを原子レベルで明らかにできたことから、これらの毒性回避機構をターゲットとした新たな抗菌薬の開発シーズになることが期待できる。