



Title	Regulation of Iron Metabolism in Pathogenic <i>Vibrio cholerae</i> by Heme Utilization Proteins [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	関根, 由可里
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第12320号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61655
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yukari_Sekine_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 関根 由可里

学 位 論 文 題 名

Regulation of Iron Metabolism in Pathogenic *Vibrio cholerae* by Heme Utilization Proteins
(ヘム獲得系蛋白質によるコレラ菌鉄代謝の制御)

第一章では、本学位論文の背景として、コレラ菌ヘム獲得系の細胞質に存在する蛋白質に着目した理由について述べる。コレラの原因菌であるコレラ菌は、宿主から鉄ポルフィリン錯体であるヘムを獲得する一連の蛋白質群 Hut (Heme Utilization) 系を利用することで生存に必要な不可欠な鉄を得ている。そのため、この Hut 系の機能阻害は有効なコレラ治療薬としての可能性が示されているが、Hut 系を構成する蛋白質の多くはその構造や機能が明らかにされていない。特に、ヘムから鉄を取り出す過程は、Hut 系において重要な過程であるにもかかわらず、ヘムを分解する酵素については十分検討されていなかった。そこで、本学位論文では Hut 系蛋白質のひとつである HutZ がピロリ菌由来のヘム分解酵素である HugZ と 31%の相同性があることに注目し、この HutZ が Hut 系でのヘム分解酵素として機能すると推定した。

第二章では、HutZ の単離・精製に取り組み、精製した HutZ におけるヘム分解能、および活性中心であるヘム周辺の構造を分光学的手法により明らかにした。まず、HutZ のヘム分解酵素としての機能を検討するため、すでに他の生物種で報告されているヘム分解酵素と同様な条件 (Fig. 1) で HutZ のヘム分解反応を紫外可視吸収スペクトルにより追跡した。その結果、過酸化水素を添加する (Fig. 1 a-d) と、ヒト由来のヘム分解酵素である HO-1 によるヘム分解産物である verdoheme (Fig.

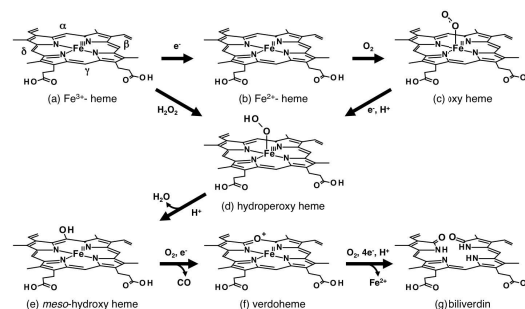


Fig.1. HO によるヘム分解反応機構

1, f) に特徴的な 645 nm の吸収極大が観測され、さらに質量分析から、HutZ によるヘムの分解産物は biliverdin (Fig. 1, g) であることが明らかとなった。このことから、HutZ は HO-1 と同様なヘム分解機構を示すことが明らかとなった。しかし、細胞内で実際に起こっている経路 (Fig. 1 a-b-c-d) であるヘム鉄の還元を経由するヘム分解反応は、pH 6 で進行する一方、pH 8 ではほとんど進行しなかった。そこで、HutZ によるヘム分解反応を分子レベルで明らかにするため、活性部位であるヘム周辺構造を共鳴ラマン分光法により測定した。その結果、pH 8 では、ヘムに配位した酸素が近傍のアミノ酸残基と水素結合し、さらヘムの軸配位子である His もアミノ酸残基と水素結合することで、oxy heme (Fig. 1. c) から Fe³⁺-heme (Fig. 1. a) の自動酸化が引き起こされ、空気中の酸素によるヘム分解反応が進行しないことが考えられた。この水素結合を形成しているアミノ酸残基を特定するため、相同性が高いピロリ菌由来のヘム分解酵素 HugZ の構造と比較した結果、HutZ では Arg92 が水を介してヘムに配位した酸素分子と、また、軸配位子の His170 が Asp132 と水素結合していると予測された。以上のことから、HO-1 にはないこれらの水素結合が HutZ のヘム分解活性制御を制御していることが示唆された。

第三章では、第二章で明らかにされた HutZ に特徴的なヘム近傍の水素結合の構造的、機能的意義を明らかにす

るため、ヘムに配位した酸素分子と水素結合を形成していると想定されるArg92をAlaに変異し、水素結合を切断させ、そのヘム分解活性を追跡した。その結果、野生型HutZでは吸収スペクトルがほとんど変化しないpH 8, アスコルビン酸還元条件下で、Arg92変異体では、ヘム蛋白質に特徴的な404 nmのSoret帯の吸収が減少し、ヘム分解反応が進行していることが示された。さらにヘム分解に伴い、Arg92変異体の吸収スペクトルでは、二価鉄ヘムに由来する430 nmへのピークの移動も観測されたことから、この水素結合が切断されることで、ヘム鉄の還元が進行することが示された。その原因を明らかにするために、ヘム鉄の酸化還元電位を測定した結果、野生型HutZでは-180 mV (vs. SHE)であったのに対し、Arg92変異体では-150 mVに上昇し、還元されやすくなったことが示された。このようなヘム鉄の酸化還元電位の変化には、軸配子の配位構造が大きな影響を与えることから、Arg92変異体ではヘム軸配位子側の構造が変化していると考え、共鳴ラマンスペクトルの測定を行った。Fe-COおよびC-O伸縮振動の波数の相対プロットから、野生型HutZではアニオン化したHisがヘムに配位するのに対し、Arg92変異体では中性のHis配位に変化していることが示された。このことから、ヘムに配位した酸素との水素結合が切断されることで、ヘムの軸配位子であるHis170とAsp132間に存在していた水素結合も切断されることが示された。以上のことから、HutZはヘム周辺に存在する水素結合の形成および切断により、酸化還元電位を変化させており、このHutZの酸化還元電位の変化を通して、HutZはヘム分解活性を制御している可能性が示された。さらに、菌体内の条件に近いpH 8でヘム鉄の還元状態を経由したヘム分解反応が進行しないことを考慮すると、HutZがヘム分解反応を進行させるために、HutZのヘム周辺構造を変化させる蛋白質の存在が示唆された。

第四章では、第二、三章でそのヘム分解機構が明らかになったHutZに対して、どのようにヘムが供給されるかを明らかにするため、hutZとオペロンを形成する、hutXに着目した。遺伝子解析によりHutXはヘム結合ドメインを有することが予測されたことから、HutXからHutZへのヘム輸送能を分光学的手法とX線結晶構造解析により明らかにした。HutXのヘム結合様式を検討するため、ヘム滴定を行ったところ、HutXとヘムは1:1で結合し、ヘム結合体の共鳴ラマン分光法とヘムを結合していないHutXのX線結晶構造解析の結果から、ヘムの軸配位子としてTyr90が示唆され、HutXは赤痢菌由来ヘム輸送蛋白質のShuTと同様なヘム結合様式を示すことが明らかとなった。しかし、HutXのヘム解離定数 K_d は7.4 nMと見積もられ、これはHutZの K_d と同程度であることから、 K_d の値の比較からはHutXがHitZへのヘム輸送体であるとは断定できなかった。そこで、HutXのヘム結合体とHutZを混合させ、その紫外可視吸収スペクトルの変化を追跡したところ、極大吸収波長がHutXのヘム由来の390 nmからHutZのヘム由来の412 nmに変化し、ヘムがHutXからHutZへ輸送されることが示された。さらに、このヘム輸送がHutXとHutZの特異的な相互作用によることを確認するため、HutXとHutZの相互作用を表面プラズモン共鳴により測定した結果、HutXはHutZと複合体を形成することが明らかとなった。このような複合体形成を通じたHutXからHutZへのヘムの輸送により、HutZでのヘム分解が進行するかどうかを明らかにするため、HutXのヘム結合体とヘムを結合していないHutZを混合させ、HutZにヘムを輸送させたのち、過酸化水素添加によるHutZのヘム分解活性を測定すると、ヘムの分解が確認された。以上のことから、HutXはHutZと相互作用し、複合体を形成することでヘムを受け渡すヘム輸送蛋白質であることが明らかとなり、細胞質におけるヘム輸送能を示す初めての蛋白質の例となった。

第五章では、本学位論文において明らかになった点や今後の展望をまとめた。これまでの研究では、細菌がヘムを獲得し、鉄源として利用することは明らかになっているものの、細胞質内に輸送されたヘムの挙動が明らかにされている例はなかった。本学位論文では、コレラ菌のヘム獲得系において、HutXからHutZへヘムが輸送されることで、ヘムの分解反応が進行することが示され、これは細菌内において、複数の蛋白質のネットワークを介して進行するヘム代謝系の分子機構解明の端緒となった。さらに本学位論文で得られた知見は、明確な治療薬が提示されていない細菌性感染症に対し、鉄代謝という新たな側面からの創薬の開発につながると期待される。