

論文の内容の要旨

論文題目 黄色ブドウ球菌由来 Isd 蛋白質のへム鉄輸送機能の 解析

氏 名 安部 良太

本論文は黄色ブドウ球菌がへム取得の際に用いる Isd 蛋白質のへム鉄輸送機能について、主に物理化学的な蛋白質間相互作用解析手法によって解析した結果を報告する。

黄色ブドウ球菌はグラム陽性の常在菌の一種である。健常者に対しては病原性が低いものの、免疫力の弱い幼児や老人に感染した場合には各種の毒素、免疫錯乱物質などを産生し、心内膜炎、骨髄炎、敗血症など重篤化する場合がある。さらに、黄色ブドウ球菌は容易に薬剤耐性を獲得するという特徴を有しており、院内感染の原因として深刻視されている。このため黄色ブドウ球菌に対する新たな薬剤の創出が求められている。

2003 年に Mazmanian らによって発見された Iron-regulated surface determinant (Isd) 蛋白質群は、変異によって黄色ブドウ球菌の生育が阻害されることから、分子標的薬のターゲットとして注目されている。Isd 蛋白質群は鉄欠乏下において黄色ブドウ球菌の細胞表層から細胞壁、細胞膜、細胞内にかけて発現し、宿主から鉄を奪取するために機能する。まず、細胞表層に発現した IsdH や IsdB が宿主のヘモグロビンあるいはハプトグロビンに結合し、へムを奪取する。このへムは細胞壁に発現した IsdA を介して、または直接的に IsdC に輸送され、細胞膜の IsdE に輸送される。その後へムは細胞膜トランスポーター IsdF によって膜透過され、細胞内において IsdG, IsdI によって分解されて鉄原子が取り出される。

Isd 蛋白質は黄色ブドウ球菌に対する新たな薬剤の標的として注目され、その機能評価が進められている。とくに薬剤の標的となる、細胞膜外におけるへム輸送、取り込みについては、へム輸送の順序、輸送速度、蛋白質構造など *in vitro* の解析から明らかになりつつある。その一方、細胞膜外におけるへム取り込みについて解析が困難な部分については未知の部分が存在している。その部分とは、①IsdC-IsdE 間のへム輸送相互作用解析、②同一蛋白質間のへム輸送相互作用解析、③へム膜透過機構の相互作用解析、である。①については、Isd 蛋白質はほとんどが NEAT ドメインであるため、NEAT ドメイン間の相互作用解析が優先され、異なる構造を持つ IsdE へのへム輸送解析が後回しになっていたことが理由として挙げられる。また、IsdC と IsdE は安定な複合体を形成しないため相互作用解析が困難である。②については、今まで見落とされていた部分である。しかしながら、同一蛋白質間の輸送がなければ長い細胞壁をへムが通り抜けることができない。同一蛋白質間のへム輸送の場合には、吸光スペクトルの形状が同一であるため、解析には工夫が必要である。③については、Isd 蛋白質に限らず膜蛋白質一般の発現、解析が困難であるため、可溶性蛋白質と比較して解析

が後回しになっていたと思われる。

そこで、我々は主に物理化学的な蛋白質相互作用解析法を用い、これら解析が困難な相互作用の解析を試みた。現在までに解析されていないヘム輸送における相互作用について物理化学的な蛋白質相互作用解析法を用いて解析した。

第1章において研究の緒言を記し、第2章において説明を要する研究手法を紹介した。

第3章において IsdC-IsdE 間のヘム輸送について反応論的理解を目指した。変異体解析、および金属置換ポルフィリンを用いた解析により、ヘム輸送の駆動力はヘムに対する親和性の違いであることがわかった。さらに、ヘム輸送反応における律速段階が IsdC-IsdE 複合体形成であったことから、IsdC-IsdE 相互作用がヘム輸送を加速していることがわかった。一方、Ga ポルフィリンを用いた解析により、黄色ブドウ球菌に有害な Ga ポルフィリンがヘムと同様に輸送されることがわかった。これより、Ga ポルフィリンが黄色ブドウ球菌の生育を阻害する理由が、Ga ポルフィリン溶液が Isd システムによって黄色ブドウ球菌体内に取り込まれることであると示唆された。

第4章において、IsdC-IsdE 間のヘム輸送反応における律速段階とされる IsdC-IsdE 複合体形成について解析した。フォトクロスリンクにより、IsdC の結合ヘム周辺の残基、特に B7/B8 ループが IsdE と相互作用していることが示唆された。さらに B7/B8 ループを IsdA に導入することで IsdE へのヘム輸送速度が増加したことから、このループ領域がヘム輸送において寄与していることが示された。この結果と既報の構造を照らし合わせることで、IsdC と IsdE は互いのくぼみを合わせるような相互作用を介してヘム輸送することが示唆された。この際、ヘムが囲まれることによって疎水的環境が形成され、ヘムの解離が促進されたものと思われる。

第5章において、同一蛋白質間のヘム輸送について解析した。その結果、IsdA, IsdC はそれぞれ同一蛋白質間のヘム輸送をし、さらにその輸送は蛋白質間の相互作用によって加速されていることが示唆された。フォトクロスリンクによって IsdC のダイマーの相互作用部位がヘリックス H1 および B7/B8 ループに集まっていたことから、同一蛋白質における NEAT ドメイン間相互作用も既報の IsdA-IsdC 間相互作用同様に Shake hands model の相互作用を介していることが示唆された。

第6章において、ヘム膜透過を担うとされる、IsdD, IsdF, FhuC の大量発現を試みたが、FhuC は発現せず、IsdD, IsdF は精製できたものの不活性であり、さらなる条件検討が必要であることがわかった。

最後に第7章において本研究の結論を記述した。

結論として、Isd システムが巧妙なヘム輸送機構を持つことがわかった。Isd システムにおいてはヘムに対する親和性が低い蛋白質が細胞表層側へ、親和性が高い蛋白質が細胞膜側へ配置され、エネルギー依存的に細胞膜へ向かってヘムが輸送されていく。長い細胞壁においては、同一蛋白質を多数配置することによって、同一蛋白質間でヘム輸送されていく。これらのヘム輸送では、獲得したヘムと解離しないよう、蛋白質は強固にヘムと結合しつつ直接的な蛋白質間相互作用を介してバケツリレー方式でヘムが確実かつ効率的に輸送されていく。その相互作用においては、NEAT ドメイン間の Shake hands model や、IsdC-IsdE 間の互いのくぼみを合わせる相互作用を使った、非常に弱いが特異的な相互作用が使われている。これにより適度な蛋白質数で効率的にヘムを取り込むことを可能にしている。本研究の結果の

創薬への展開を志向した場合には、NEAT ドメイン間の相互作用が普遍的であることが示唆されたので、その相互作用を阻害する物質が生育阻害に効果的であると考えられた。また、黄色ブドウ球菌にとって有害である Ga を含むポルフィリンは通常ヘム同様に輸送されることが示唆されたので、Isd システムによって Ga ポルフィリンを取り込ませることによる生育阻害も考えられた。