

# 論文審査の結果の要旨

氏名 安部 良太

本研究は、黄色ブドウ球菌に対する薬剤標的とされている Isd システムのヘム取り込み機構を解析した。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章は、黄色ブドウ球菌が引き起こす諸問題とその対策、創薬の進行状況について近年の動向をまとめ、本研究が取り扱う Isd システムの重要性について述べている。さらに、Isd システム研究の現状についてまとめ、本研究の目的と意義について述べている。

第2章において、本研究で用いた手法、原理について簡単に解説している。

第3章において IsdC-IsdE 間のヘム輸送について反応論的解析をした。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、その律速段階とされる IsdC-IsdE 複合体について解析した。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、同一蛋白質種間、ホモのヘム輸送について解析した。その結果、IsdA、IsdC はそれぞれホモのヘム輸送をし、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 3<sub>10</sub> ヘリックスおよび B7/B8 ループに集まっていたことから、ホモの NEAT 間相互作用においても、点対称に蛋白質が向かい合う 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。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を明らかにした。

第7章においては以上のことを総括し、Isdシステムの更新されたモデルを提唱した。IsdHおよびIsdBによって取り出されたヘムはIsdAへと輸送される。第5章における考察より、IsdAはさらに別のIsdAへとヘムを輸送し、細胞壁間をヘムが移動していく。細胞壁の内側において、IsdAがIsdCへとヘムが輸送する。IsdCはさらに別のIsdCへとヘムを輸送し、細胞膜近傍においてIsdEへとヘム輸送される。この間、NEATドメイン間のヘム輸送はhandclasp modelの相互作用様式であり、IsdC-IsdE間のヘム輸送は第3,4章で提唱したC-E間の相互作用である。最終的には未確認ではあるがIsdE, IsdF, FhuCで構成されるABCトランスポーターによって細胞膜内へとヘム輸送される。IsdA間およびIsdC間のホモヘム輸送の方向は親和性が同じであるのである程度ランダムウォーク様である。しかしながら、IsdCの近傍のIsdAは常にIsdCへとヘム輸送し、IsdE近傍のIsdCは常にIsdEへとヘム輸送し、その親和性の差によって逆方向の輸送はほぼ起こらないため、次第にヘムは細胞内へと輸送されていく。

これらの結果を分子標的創薬に生かすことを考える。ヘム輸送における相互作用はhandclasp modelと我々が同定した互いのくぼみを合わせる相互作用によって、細胞壁から細胞膜へと輸送されている。このいずれの相互作用においても、NEATドメインのB7/B8ループが機能していることがわかっている。一らがB7/B8ループに変異を加えた場合にNEATドメイン間のヘム輸送は阻害され、一方、我々もB7/B8ループがIsdC-IsdE間の相互作用に重要であることを示している。したがって、このB7/B8ループを阻害する物質が存在すればおそらく鉄取り込みの阻害による黄色ブドウ球菌の生育阻害ができる可能性がある。

本研究は、以上のような*in vitro*における物理化学的な蛋白質解析から黄色ブドウ球菌内におけるIsdシステムの機能について*in vitro*の手法では解明が困難な領域を明らかにしている。特に、未知であったIsdC-IsdE間の蛋白質間相互作用を明らかにし、また、ホモのヘム輸送を報告した、という2点において新規性があり、黄色ブドウ球菌研究に指針を与えている。また、第4章で用いた、フォトクロスリンクとMS/MSを組み合わせて非常に弱い相互作用を解析する手法もまた新規であり、近年ますます重要になっている弱い相互作用を解析する場合の新たな選択肢として意義深い。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。