

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成 23 年度博士課程 入学  
氏 名 森脇 由隆  
指導教員名 清水 謙多郎

### 論文題目

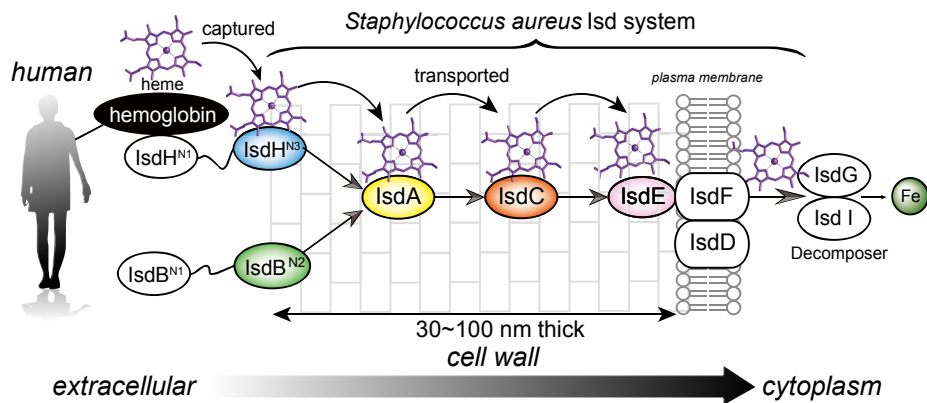
実験と計算両側面から考察した、黄色ブドウ球菌の細胞壁上の高速ヘム輸送機構の解明

#### 【研究背景】

黄色ブドウ球菌は通性嫌気性のグラム陽性菌であり、人体の皮膚表面上、特に鼻腔内に存在することの多い常在菌である。常在菌のブドウ球菌の中では比較的毒性が高く、免疫力が低下した状態のヒトにおいて増殖し、肺炎や敗血症、骨髄炎などの重篤な病を引き起こすこともある。その最も厄介な性質は抗生物質耐性獲得の速さであり、メチシリン耐性・バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌の出現が相次いで報告され、黄色ブドウ球菌の抗生物質による封じ込めは現状極めて困難となってしまうている。

一方、黄色ブドウ球菌を含む細菌は生育に鉄原子を必要としている。自然界においては土壌などから十分に獲得が可能であるが、動物体内では、その 99.9%が小分子またはヘモグロビンなどの生体分子によってキレートされており、細菌は通常これらの鉄を獲得することは不可能である。それにも関わらず黄色ブドウ球菌は上記の通り宿主動物体内でも増殖可能であることから、何らかの方法で鉄分を獲得していると考えられてきた。

2002 年に、Mazmanian らによって同定された Iron-regulated surface determinant (Isd) system はその後の研究により、ヘモグロビンに結合したヘムから鉄原子を奪取して栄養素とする蛋白質群であることが判明した。これをノックアウトすると生体内での菌の生存率が大きく下がることから、Isd system による鉄獲得機構が黄色ブドウ球菌の生体内での生育に必須である可能性が強く示さ



**Figure 1.** 黄色ブドウ球菌 Isd system の配置。IsdA, IsdB, IsdC と IsdH は細胞壁と共有結合している。IsdF は IsdE とともに働く ABC transporter である。IsdD の機能は未知である。IsdG/IsdI はヘムを分解し、鉄原子を取り出す。

れた。この発見以降、Isd system をターゲットとしたワクチンや鉄獲得阻害剤の研究が *in vivo*, *in vitro* で精力的に続けられている。

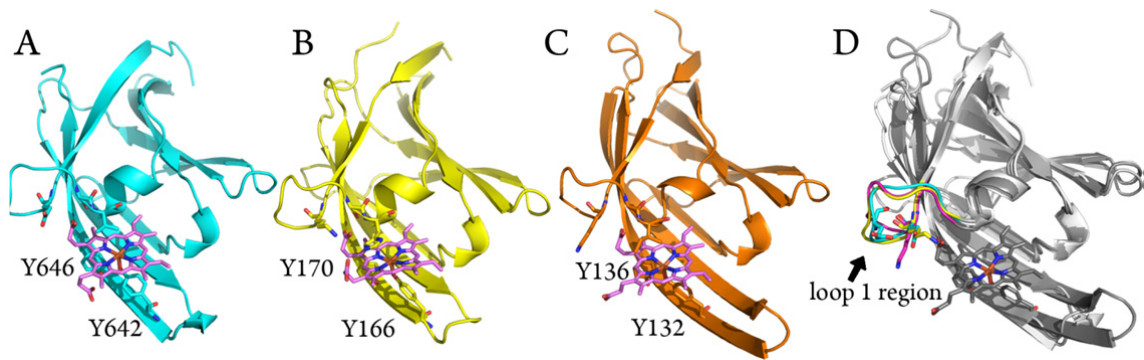
Isd system は鉄分不足の環境下で発現する、9つの蛋白質で構成されている。Isd system の配置を **Figure 1** に示した。ここで、細胞壁に存在する IsdH, IsdB, IsdA, IsdC にはそれぞれ1コピー以上の Near Transporter (NEAT) ドメインと呼ばれる、およそ120アミノ酸からなる構造ドメインが存在している。IsdH-NEAT1 と -NEAT2 ドメインおよび IsdB-NEAT1 ドメインはヘモグロビンからヘムを遊離させる機能を持つ一方で、IsdH-NEAT3, IsdB-NEAT2, IsdA-NEAT, IsdC-NEAT はそのヘムと結合し、細胞膜内へと輸送する機能を持つ。これらの NEAT ドメインは、この10年のX線結晶構造解析によって、1つのチロシンとセリン残基でヘムと結合する共通の三次元構造を有していることが判明した (**Figure 2**)。しかしながら結晶構造だけでは、ヘムが IsdH-NEAT3→IsdA→IsdC の順に厳密に輸送される機構を明らかにするのは困難である。また、輸送中間体の構造は2011年にNMRを用いた報告が存在するが、その構造は依然として不明な点が多く、ヘム輸送機構の推察に直接つながるものではなかった。そこで本研究では、実験室における *in vitro* の解析だけでなく、この研究分野で世界初の試みとなる分子動力学に基づいた蛋白質の *in silico* 解析の両側面から、このヘム輸送についての解析を行った。

#### 【研究目的】

本研究の目的は細胞壁に提示されている Isd-NEAT ドメイン間のヘム輸送機構の解析である。はじめに我々は、構造的によく類似している3種の Isd 蛋白質がヘムに対して少しずつ異なる親和性を提示している原因を分子動力学 (MD) シミュレーションに基づいて予測し、実験により検証した。次に、*in silico* において、NEAT ドメインがヘムを輸送する構造モデルを予想し、その理論的な検証を行った。

#### 【研究手法】

本研究は等温滴定型熱量測定 (ITC) と UV スペクトル測定といった *in vitro* 解析と、分子動力学ソフトウェア AMBER と Gromacs を用いた *in silico* での蛋白質-リガンド相互作用解析を中心に展開した。また、ヘムのアナログとして様々な金属元素で置換された各種金属ポルフィリンを利用して親和性の金属原子依存性を考察した。理論的な側面からは、まずそれぞれの蛋白質およびヘムについて 300 K、1 気圧の条件下で 200 ナノ秒の MD シミュレーションを行なった。ヘムとの複合体については、結合しているチロシンとヘムを真空中で構造最適化し、RESP 電荷を算出し



**Figure 2.** Isd-NEAT ドメインの蛋白質構造。(A) IsdH-NEAT3, (B) IsdA-NEAT, (C) IsdC-NEAT。棒で示している分子はヘムである。(D) 各 NEAT ドメインの重ねあわせ図。loop 1 領域を色付きで示す。

て決定した電荷パラメータおよび基準振動解析による力の定数を採用した。これらのトラジェクトリに基づいて、リガンド（ヘム）結合に伴うエンタルピー変化と自由エネルギー変化を見積もることのできる MM-PB/SA 法を用いて、NEAT ドメインそれぞれについて各アミノ酸の親和性への寄与を計算した。この結果親和性への寄与が大きいと推定された残基について、*in vitro* で変異体解析を行い、その影響を検証した。また、MD シミュレーションを用いて 2 種類の Isd-NEAT ドメインのドッキングを行ない、RMSD 値に基づいてその複合体構造の妥当性を評価した。

## 【結果と考察】

### 1. NEAT ドメインの構造類似性と異なる親和性についての解析

まずマンガン(Mn)・ガリウム(Ga)が含まれる金属ポルフィリンとヘムを用いて、IsdH-NEAT3, IsdA-NEAT, IsdC-NEAT について、ITC による親和性測定を行った。その結果、ヘムに対する結合定数  $K_d$  は IsdH-NEAT3, IsdA, IsdC に対してそれぞれ  $34 \pm 8$  nM,  $14 \pm 4$  nM,  $6.5 \pm 1.4$  nM と決定された。また、他の金属ポルフィリンについても同様に IsdH-NEAT3 > IsdA > IsdC の順に低い結合定数を示していた。このことからリガンドの金属原子周辺における蛋白質残基の影響は小さいことが示唆された。そこで MM-PB/SA 法を用いてそれぞれの NEAT ドメインについて結合エンタルピーの各アミノ酸の寄与を計算したところ、ヘムのプロピオン酸基と結合する保存されたセリン残基周辺の 9 つのアミノ酸で構成されるループ構造 (以降 loop 1 領域とする) に大きく影響を受けていることが示された。特に IsdH-NEAT3 の loop 1 領域にはグルタミン酸基が 4 つ含まれており、これらがヘムのプロピオン酸基に対して静電相互作用的に不利である一方 ( $\Delta E_{EEL} = 172.08$  kcal/mol)、IsdC では 2 つのリジン残基と中性残基によって負電荷が中和されて有利に働いていた ( $\Delta E_{EEL} = -133.83$  kcal/mol)。この構成アミノ酸の違いが NEAT ドメイン間の親和性の差を生み出しているものと推定された。また、計算機内で loop 1 領域の組成アミノ酸を IsdH-NEAT3 のものに置き換えた IsdC キメラ体 (IsdC-loop 1H) が、wild-type の IsdH-NEAT3 の値に大きく近付いたことから ( $\Delta E_{EEL} = 26.95$  kcal/mol,  $\Delta \Delta G = +6.9$  kcal/mol)、loop 1 領域のアミノ酸組成が親和性の差を生み出す原因の 1 つであることが示唆された。この結果をもとに、*in vitro* にて IsdC-loop 1H キメラ体を構築して測定したところ親和性の低下が確認された ( $K_d = 6.5 \pm 1.4$  nM  $\rightarrow 21 \pm 7$  nM)。これは wild-type の IsdA よりも親和性が弱いことを意味する結果であった。

また、IsdC にはこの領域以外にヘムとの親和性を上げるための特徴的な機構があることが同様にシミュレーションから示唆された。IsdC の内部にある Glu-88/Arg-100 の塩橋はヘムの結合ポケ

ットから離れており、これまでヘム結合自体には寄与しないように考えられていた。しかし、ヘムが結合していない状態のシミュレーションではこの塩橋が外れている一方で、結合時には塩橋を形成していることから、ヘム結合時に蛋白質内の結合エンタルピーを大きく低下させる働きを持っていることが示唆された。これについても同様に IsdC-E88A 変異体を *in vitro* で構築して親和性を測定したところ、親和性の低下が確認された ( $K_d = 6.5$

$\pm 1.4$  nM  $\rightarrow 23 \pm 9$  nM)。また、先述の loop 1 領域を置換したキメラ体における E88A 変異体でも同様に効果が加算的に働き、結合エンタルピーへの寄与が低下していたことが確認された ( $\Delta\Delta H^\circ = +2.1$  kcal/mol)。しかしながら  $K_d$  値においては enthalpy-entropy 補償則が働き、大きな親和性の低下は確認されなかった ( $K_d = 23 \pm 4$  nM)。

これらの親和性を低下させた変異体を含めて Isd 蛋白質間のヘム輸送解析を行ったところ、IsdC の変異体から IsdA へのヘム輸送の逆流が確認された。さらに、IsdH-NEAT3 の loop 1 領域に IsdC の loop 1 領域を構成するアミノ酸で置換したキメラ体 (IsdH-N3-loop 1C) では、親和性が IsdA のそれを上回り ( $K_d = 5.4 \pm 2.2$  nM)、IsdA 方向への輸送が発生しなくなった。これらの実験結果から、金属ポルフィリン輸送の駆動力は、親和性の差であることが証明された。

## 2. Isd-NEATドメインのヘム輸送複合体

各種 NEAT ドメイン内と結合しているヘムは、結合状態であってもおよそ 35~40%ほどが溶媒に露出しており、ヘムの片側の面は共通する 2 つのチロシン残基によって配位結合している

(Figure 2)。このヘムの溶媒に露出している面に向かって他の Isd 蛋白質が近付くよう設定したシミュレーションを行ったところ、蛋白質構造をほとんど変えることなく (RMSD < 5 Å) ドッキングすることが可能であることが示された (Figure 3)。このときヘムの 2 つのプロピオン酸基はそれぞれの Isd 蛋白質のセリン残基と結合し、鉄原子の周辺にはヘムの両側の面からそれぞれのチロシンが接近可能であることが判明した。

## 3. 結論

1. において、各 Isd 蛋白質のヘムへの親和性の差は主に IsdC 内に存在する特有の塩橋および loop 1 領域の構成アミノ酸によって生じていることが判明した。この知見は近年ゲノム解析によって発見された他のグラム陽性菌 (炭疽菌など) に発見された異種の NEAT ドメインについても応用が期待される。2. で NEAT ドメインによるヘム輸送複合体構造を推定した。この構造はヘムを挟んで対称的となることから、ヘムはこの複合体を形成した後、1. の考察に従い、親和性の強い側の蛋白質に輸送されるのではないかと結論づけた。

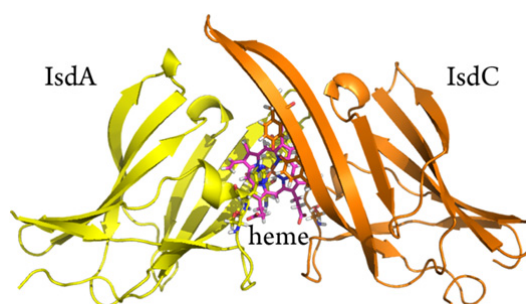


Figure 3. IsdA-ヘム-IsdC の三者複合体モデル。ヘムおよびチロシンとセリン残基は棒で示している。