

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 森脇 由隆

本論文は、2002年に発見された黄色ブドウ球菌の細胞壁上での蛋白質間へム輸送の詳細な分子機構解明についての論文である。黄色ブドウ球菌は通性嫌気性のグラム陽性菌であり、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。また抗生物質への耐性獲得が非常に速いことが古来知られており、医療現場での黄色ブドウ球菌封じ込めは今なお大きな課題となっている。本論文ではその黄色ブドウ球菌の株間でほぼ100%保存されている、細胞外からの直接的なへム分子の獲得機構“Iron-regulated surface determinant (Isd) system”について、研究を遂行してきている。

本研究の目的は、この Isd system のうち細胞壁上での輸送を担当する IsdH-NEAT3, IsdA, IsdC における輸送機構の解明とその輸送阻害剤の開発である。また研究手法として、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用いた。申請者は *in silico* での予測結果をもとに *in vitro* において実物の蛋白質に人工的な変異を加え、その予測を検証するといったフィードバックも含めて本研究を完成させている。

第1章では序論として黄色ブドウ球菌の鉄・へム獲得機構およびこれまでに知られている Isd system についての知見をまとめている。第2章と第3章ではそれぞれ分子動力学と量子化学についての計算原理を記している。第4章では *in vitro* 実験において使用した実験手法、第5章では *in silico* におけるリガンドとの結合自由エネルギー変化 ( $\Delta G^\circ$ ) または親和性を推定するための計算手法について記している。続く第6章から結果について述べている。まず第6章では、これまで Protein Data Bank (PDB) に登録されている3種類の Isd 蛋白質 IsdH-NEAT3, IsdA, IsdC について、なぜ3者の構造が非常に類似しているにも関わらず、へムが決まって IsdH-NEAT3→IsdA→IsdC の順に輸送されるのかということについての機構解明を行っている。これら3者の蛋白質は構成する二次構造や、へムに対する配位形式は酷似している一方で、構成するアミノ酸の配列相同性は互いに20%以下であり、極めて珍しい構造類似蛋白質である。まず実験的に等温滴定型熱量測定 (ITC) を用いてこれら3つの蛋白質とへムとの親和性を決定したところ、IsdH-NEAT3 が最も弱く、IsdC が最も強いことが示された。分子動力学 (MD) シミュレーションにおいて同様に親和性を決定したところ、やはり同様の傾向が見られた。そこで、MD の結果から一残基単位で  $\Delta G^\circ$  への寄与を分解することのできる MM-PB/SA 法を用いて親和性の差を生み出している領域を調べたとこ

ろ、ヘムのプロピオン酸基の結合位置に近い“loop 1 region”と IsdC 特有の内部の塩橋の影響が大きいことを発見した。実際に変異体蛋白質を発現させて調べたところ、確かにその影響が認められた。そして変異の影響で親和性が大きく低下した IsdC の変異体を用いて IsdA とのヘム輸送を調べたところ、IsdC 変異体側から IsdA へとヘムが多く輸送されることが判明した。このことは、Isd 間でのヘム輸送が本来的には IsdH-NEAT3→IsdA→IsdC の一方向輸送というわけではなく、結合定数に対する平衡論の輸送であることを指し示したと言える。

第 7 章については、このヘム輸送が高速に（数分以内に）完了する分子機構の有力な知見として指摘されている輸送中間体の存在についての考察を行っている。距離高速を用いた MD シミュレーションによって IsdH-NEAT3, IsdA または IsdA, IsdC の組み合わせでドッキングシミュレーションを行ったところ、互いの RMSD が 4 Å 以下と小さい値でありながらドッキングすることが可能であることを示している。さらに、ヘム周辺の金属と蛋白質の配位結合を詳細に検討するべく、量子化学計算と分子動力学のハイブリッドである ONIOM 法を用いて最適化構造を計算したところ、2 つの Isd 蛋白質が同時にヘム分子に結合する構造を取れることを証明した。この中間体構造は現実の系ではおそらく非常に短い時間でしか存在できないため、計算によって存在を示すことができたことは大きな知見であると言える。

第 8 章では、第 6 章と第 7 章で得られた知見を元に有機合成したヘム輸送の輸送阻害剤について述べている。これは IsdC までの蛋白質にはヘムと同等の結合力を有する一方で、IsdC の後にヘムを受け取る IsdE には輸送されなかったことが *in vitro* における試験で確認された。これは Isd system によるヘム輸送を妨げることができ、黄色ブドウ球菌の鉄獲得に悪影響を及ぼす可能性が極めて高い。

以上、本研究は得られた黄色ブドウ球菌のヘム輸送解明やその輸送阻害剤について、一原子レベルでの詳細な考察に基づいて数多くの成果を産み出した。また本研究は黄色ブドウ球菌に限らず、共通する分子機構を保有するグラム陽性菌（炭疽菌）などについても応用が期待されるため、学術的な意義・重要性は非常に高いものであると認める。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。