

化膿連鎖球菌の鉄獲得蛋白質 Shr とヒトヘモグロビンの相互作用に関する 構造基盤

Structural basis for the interaction between the heme-acquisition protein Shr from *Streptococcus pyogenes* and human hemoglobin

妹尾暁暢^{1,2}, 星野将人³, カアベイロホセ^{1,3*}, 津本浩平^{2,3,4*}

¹九州大学大学院薬学研究院蛋白質創薬学分野

〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1

²東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻

〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1

³東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻

〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1

⁴東京大学医科学研究所

〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1

Akinobu SENOO^{1,2}, Masato HOSHINO³, Jose M.M. CAAVEIRO^{1,3*}, Kouhei TSUMOTO^{2,3,4*}

¹Laboratory of Protein Drug Discovery, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8582, Japan

²Department of Chemistry and Biotechnology, School of Engineering, The University of
Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

³Department of Bioengineering, School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1
Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

⁴The Institute of Medical Sciences, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku,
Tokyo 108-8629, Japan.

1 はじめに

宿主に感染する病原性細菌は、細菌の生存や増殖に必須な栄養素を宿主から効率的に奪取する分子システムを備えている。数ある栄養素の中でも鉄はあらゆる生物の生存に必須であり、病原性細菌も宿主から鉄を奪取するタンパク質群を発達させてきた。例えば、院内感染菌としても知られているグラム陽性細菌の黄色ブドウ球菌や化膿連鎖球菌はヒトのヘモグロビン(Hb)からヘム鉄を奪取し、ヘム鉄に配位している鉄イオンを菌体内に取り込む分子システムを膜表層に発達させていることが分かっている。この内、よく研究されているのは黄色ブドウ球菌の iron-regulated surface determinant (Isd) システムである。黄色ブドウ球菌はヒトに感染する際、9種のタンパク質(IsdA~IsdI)によって Hb への結合およびそこからヘム鉄の奪取、分解を行うことで菌体内へ鉄を取り込む[1]。

化膿連鎖球菌においては Isd システムの代わりに Streptococcal hemoprotein receptor (Shr) と呼ばれる鉄獲得タンパク質が発達していることが分かっている。Shr は 1275 アミノ酸からなる多ドメインタンパク質であり、Hb との相互作用を司る hemoglobin-interacting domain (HID) や、ヘム鉄との相互作用を司ると予想されている near-transporter (NEAT) ドメ

インから構成されていることが配列解析や機能解析によって明らかになっている[2]。しかしながら、これらのドメインがどのように連携して Hb からのヘム鉄奪取を達成しているのかは明らかになっていない。本研究では、HID および Hb の複合体構造を取得することによってヘム奪取メカニズムの起点とも言える Shr が Hb を捕捉する描像を明らかにした他[3]、Shr によるヘム鉄獲得メカニズムを Isd と比較することによって考察する。

2 実験

2.1 HID の調製

Shr の HID(アミノ酸番号 169-294)は大腸菌 BL21 (DE3)株を用いて発現させた。His₆-tag および TEV プロテアーゼサイトに続けて HID をコードする遺伝子配列を組み込み発現プラスミドとした。発現させたタンパク質は、可溶性画分より Ni²⁺イオンアフィニティクロマトグラフィによる粗精製とサイズ排除クロマトグラフィによる 2 次精製を経て純度よく精製した。

2.2 HID-Hb 複合体の調製

ヒト Hb はヘパリン処理されたヒト血液より調製した。精製方法に関しては東京大学医科学研究所の該当する委員会の承認を得ている。HID とモノマー換算した Hb を 1.1 : 1 の比率で混合したのち 10 min

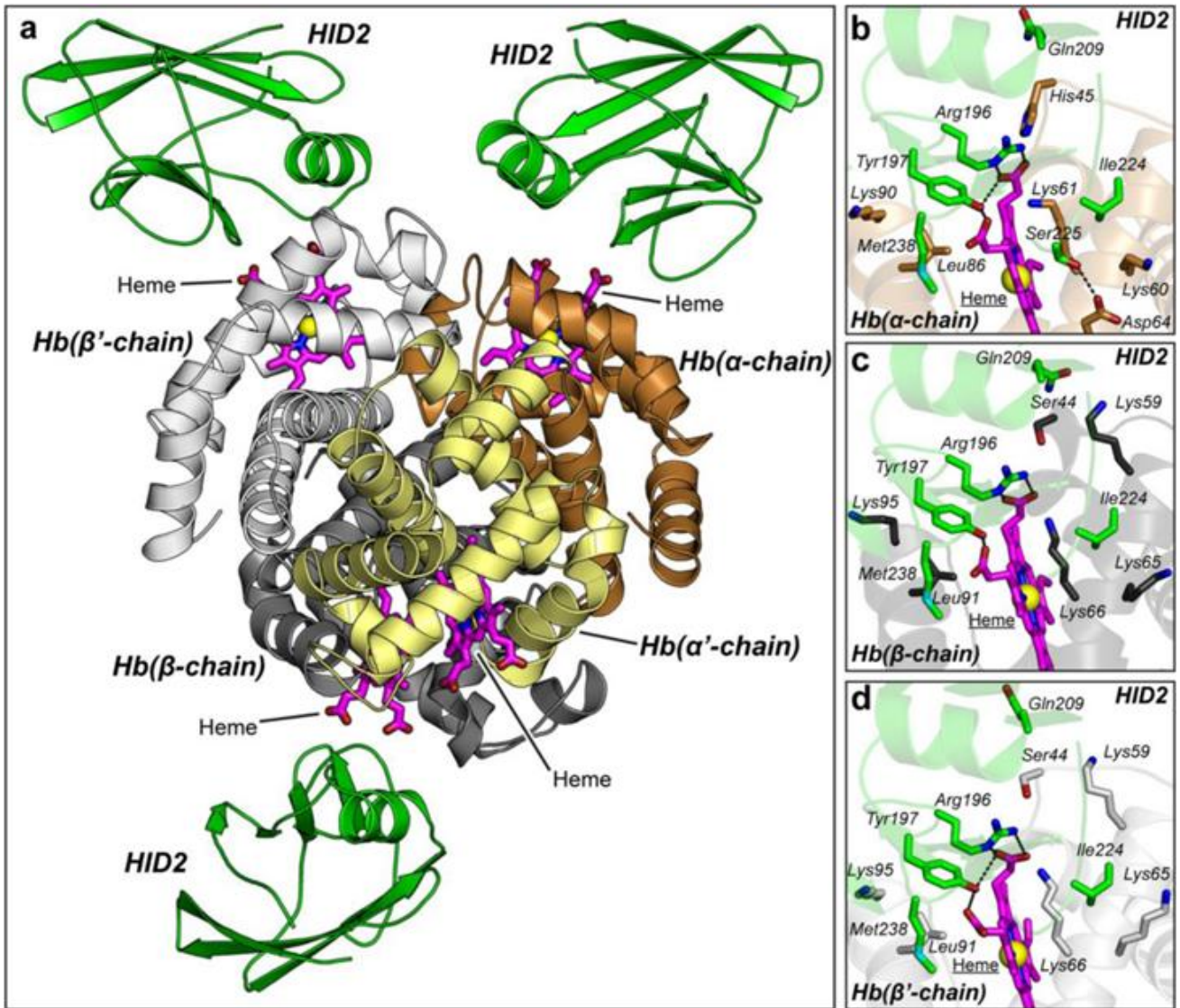


Figure 1 | HID-Hb の複合体構造. (a) 全体構造. Hb のテトラマーに対して 3 分子の HID が相互作用している. (b)-(d) 3 分子の HID の Hb との相互作用界面の拡大図. HID の Arg196 や Tyr197 がヘム鉄のプロピオン酸基と相互作用している他、種々のアミノ酸が相互作用に関わっている. 文献[3]より引用.

インキュベーションし、サイズ排除クロマトグラフィによって複合体画分を回収した。

2.3 結晶化サンプルの調製とデータコレクション

HID の結晶は 20% PEG-MME 2000 (w/v), 150 mM KBr, 20 mM TRIS-HCl (pH 8.0) の母液条件で、HID-Hb 複合体は 23% PEG3350 (w/v), 100 mM ammonium sulfate, 100 mM BIS-TRIS (pH 5.5) の母液条件で結晶を得た。それぞれの結晶は、液体窒素による保存時に 15% もしくは 25% の glycerol を添加した結晶母液に液浸した。回折像は PF のビームライン AR-NE3A もしくは AR-NW12A において 100 K で取得した。HID および複合体の構造は、PDB ID: 6DKQ および 4NI0 の構造を用いて分子置換法によって決定した。

3 結果および考察

構造解析の結果、HID-Hb の複合体構造を 2.75 Å の分解能で決定することができた。Hb のテトラマ

ーに対して 3 分子の HID が結合している構造が得られた(Fig. 1a)。PISA software によって HID と Hb の相互作用界面を解析すると、HID の相互作用界面に位置する Arg196 や Tyr197 を始めとする複数のアミノ酸がヘム鉄のプロピオン酸基との水素結合や塩橋を形成することが主な相互作用の駆動力になっていることが分かった(Fig. 1b-1d)。実際、ヘム鉄が配位していない Hb には HID は相互作用しないことが報告されており[2]、本構造からもそのことが改めて確認された。この相互作用様式を採用することによって、Shr はヘム鉄と結合している Hb へ選択的に結合することができるため、効率的にヘム鉄を奪取することができると考えられる。包括的な変異体解析によって Arg196, Tyr197 に加えて Q209, I224, S225, M238 といったアミノ酸が Hb との相互作用におけるホットスポットであることが明らかとなった[3]。この結果より、HID-Hb 間相互作用は変異による局所的な

環境変化の影響を受けやすい性質を持っていることが確認された。

黄色ブドウ球菌において報告されている **Isd** システムでは、**Hb** との相互作用に用いられるドメイン **NEAT1** が **Hb** からのヘム鉄奪取を妨げない位置に結合し、ヘム鉄の奪取そのものは **NEAT2** と呼ばれる別ドメインが行う[1]。これに対して、**Shr**では**Hb**を認識する **HID** が、さもヘム鉄の奪取を妨げるかのようにヘム結合ポケットを塞ぐ位置に結合していることが分かる(Fig. 1a)。このことは、**Shr**が**Isd**システムとは全くことなるヘム鉄奪取メカニズムを有していることを強く示唆している。実際、他グループの研究からも **Shr**が**Isd**システムとは異なるメカニズムでヘム鉄を奪取しているモデルが提唱され始めている[4]。**Shr**によるヘム奪取メカニズムの解明のためには、**HID**のみならず他のドメインも含めた組換えタンパク質を調製し、構造生物学的解析や種々の機能解析を行う必要があることが明らかになった。

4 まとめ

化膿連鎖球菌の鉄獲得タンパク質である **Shr** の内、**Hb** との相互作用を司るドメインである **HID** と **Hb** との複合体構造を取得した。その結果、黄色ブドウ球菌に見られる **Isd** システムとは全く異なるヘム奪取メカニズムの存在が強く示唆された。関連する構造情報は PDB ID: 7CUD, 7CUE に登録されている。また、本研究に関する論文は *Scientific Reports* 誌に報告した。

謝辞

X線回折実験をサポートして下さった PF スタッフのみなさまに心より感謝申し上げます。この研究は東京大学津本研究室ならびに九州大学薬学研究院蛋白質創薬学分野において行われたものです。実験を担当した学生諸氏や共同研究者に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- [1] J. M. M. Caaveiro *et al.*, *Seikagaku*, 90, 3, 279-289 (2018).
- [2] R. Macdonald *et al.*, *J. Biol., Chem.*, 293, 18365-18377 (2018).
- [3] A. Senoo *et al.*, *Sci. Rep.*, 14, 5374 (2024).
- [4] R. Macdonald *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 120, e2211939120 (2023).

*Correspondences to;

jose@phar.kyushu-u.ac.jp

tsumoto@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp