

黄色ブドウ球菌の鉄取り込み機構：Isd システム

Caaveiro Jose M.M.^{1,2,3}, 津本 浩平^{1,2}

黄色ブドウ球菌が持つ鉄取り込み機構 Isd 系は、きわめて微弱な相互作用を利用する絶妙なタンパク質-タンパク質間認識、複数の担体によるヘムの細胞壁中でのリレー輸送、新規なヘム結合環境、そして新規な化学作用を有する異化酵素など、数多くの興味深い特性を包含している一連のタンパク質群によって担われる。本稿では Isd システムの構造・物性解析に関する報告から明らかになった、Isd および他の同族体のヘム輸送系に関する分子機構をまとめ、本系を治療標的とする可能性等、今後の展開を議論したい。

1. はじめに

鉄は、ヒトの生存に不可欠な栄養素の一つであり、最も重要なリザーバーとしてのヘムがヘモグロビンやシトクロム酵素などによる多数の酸化還元反応に関与する¹⁾。鉄過剰（高血圧）および欠乏（低酸素症）に起因する有害作用のために、その代謝は厳密に制御されている。平均的なヒトは約4gの鉄を体内に持っているが、この鉄のプールは主に細胞内に維持されており、したがって、ヒトに常在する、あるいは感染する細菌のほとんどには利用できるものではない。すなわち、栄養免疫学の分野で研究されているような侵入病原体に対する体内の鉄源へのアクセスを制限するためのシンプルな戦略、すなわち固有のメカニズムをヒトが持っているのである^{1,2)}。この保護層の重要性は、ヒトの最も一般的な鉄関連遺伝疾患の二つであるサラセミアおよび原発性ヘモクロマトーシスにおける鉄過剰症の場合、細菌感染に対する感受性が顕著に増大されることから

も示される³⁾。病原性細菌による必須鉄の捕捉を回避するために、ヒトは高度に進化した。にもかかわらず、ヒト感染微生物は、その鉄要求を満足させるために洗練されたシステムを進化させてきた。

これらのシステムは、その性質に関連して二つの主要なグループに分けられる。第一に、 Fe^{3+} イオンに対して非常に高い親和性を示すシデロフォア (<2kDa) と呼ばれる二次代謝産物の利用がある。シデロフォアは、トランスフェリン⁴⁾などの細胞内キャリアタンパク質からでも鉄イオンを抽出することができる。細菌によって回収され、細胞質に輸送され、続いて分解されて、それに含まれる鉄イオンを抽出する。第二に、細胞外および循環ヘム（遊離またはヘモグロビンなどの他のタンパク質に結合した）を獲得するタンパク質系がある。これらのタンパク質系は、*Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pyogenes*などのグラム陽性菌、*Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*などのグラム陰性菌に存在する。これらに関してはいくつかの優れた総説がすでに発表されており⁵⁻¹⁰⁾。その獲得システムとして、一般的にヘモグロビン (Hb) からヘムを抽出（獲得）して細胞質に輸送する一連のトランスポーター分子により、細胞質にヘムが輸送され、さらに、ヘムを分解するヘムオキシゲナーゼによってヘムから鉄イオンが分離されることが想定されている。重要なことに、これまでの報告例から、これらのヘム獲得システムが、特に鉄飢餓の状況において細菌の病原性を高めることが示されている¹¹⁻¹³⁾。

ここでは、ヒト病原菌である黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の鉄制御表面決定因子 (Isd) システムについて述べる。臨床環境（院内感染）において、細菌、特に黄色ブドウ球菌が導く感染症^{14, 15)}における抗生物質耐性

¹ 東京大学大学院工学系研究科 (〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

² 東京大学医科学研究所 (〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1)

³ 九州大学大学院薬学研究院 (〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1)

Heme-acquisition in *Staphylococcus aureus* by the iron-regulated surface determinant (Isd) system

Jose M.M. Caaveiro^{1,2,3} and Kouhei Tsumoto^{1,2} (¹ School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan, ² Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan, ³ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900279

© 2018 公益社団法人日本生化学会

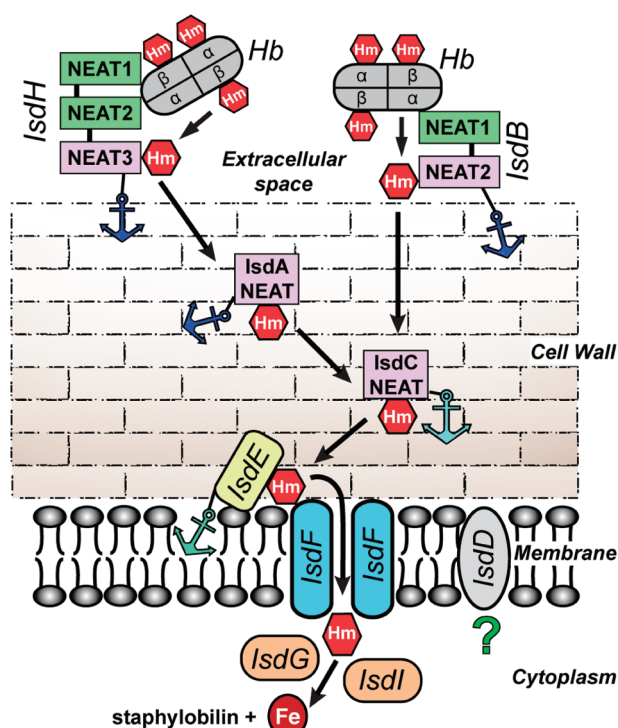


図1 Isdシステムの全体図

細胞壁に固定された細胞外タンパク質 IsdH および IsdB は、ドメイン NEAT1~2 (IsdH) または NEAT1 (IsdB) を有するヘモグロビン (Hb) に結合する。その結合は、ヘム部分の抽出を促進する Hb (四量体または二量体形態) の構造的不安定化を誘発する。ヘム抽出は、IsdH のドメイン NEAT3 または IsdB の NEAT2 によって行われ、両方とも Hb のヘム結合ポケットの前に位置する。細胞外受容体がヘム部分を取り出すと、それは細胞壁アンカー型中間体トランスポーター IsdA および IsdC に順次移される。これらには同一種のトランスポーターへの自己運搬が含まれる。最終的な運搬は、膜輸送体 IsdF にヘム分子を供給する膜に固着した IsdE に対して、IsdC によって行われる。IsdD の役割はまだわかっていない。ヘムが細胞質に到達すると、ヘムオキシゲナーゼ IsdG および IsdI によって処理され、その結果、スタフィロビリンを産生することで、ポルフィリン環から鉄原子が分離される。

が急増していることから、この疾患に対処する新たな治療手段の開発が喫緊の課題になっている。このような状況下において、Isd は有力な標的候補の一つであり、ヘム獲得プロセスについて分子レベルで特徴づけられた最初のファミリーである。このシステムは、きわめて微弱な相互作用を利用する絶妙なタンパク質-タンパク質間の認識、さまざまな環境および複数の担体による代謝物の輸送、さまざまなヘム結合環境、それに新規な化学作用を有する異化酵素など、数多くの興味深い特性を包含している。本稿では、多数の結晶および NMR 構造の最近の報告に基づいて、Isd および他の同族体のヘム輸送系に関する詳細を議論し、本系を治療標的とする可能性も含め、今後の展開を議論したい。

グラム陽性細菌に存在する厚いペプチド-グリカン層 (約 50nm) は、ヘムの透過には強力な障壁であり、この理由から、このクラスの細菌は、宿主生物からヘムを獲得す

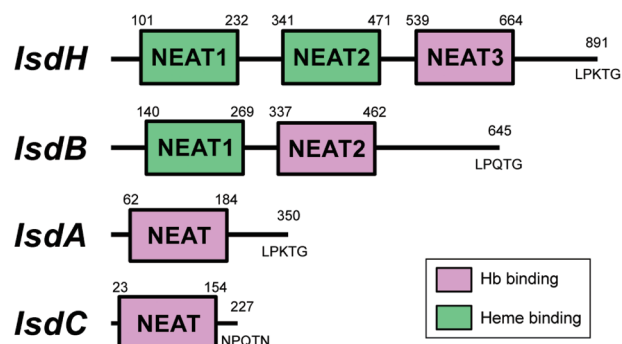


図2 細胞壁アンカー型タンパク質 IsdH, IsdB, IsdA および IsdC のドメイン構成

残基番号および細胞壁へのアンカーリングに用いられる配列が示してある。

るための専用の洗練された受容体系を有している。黄色ブドウ球菌における鉄調節表面決定基 (Isd) 系は、ヘムの獲得および分解に直接関与する9種のタンパク質 (IsdA~IsdI) からなる (図1)^{12, 16, 17}。タンパク質 IsdA, IsdB, および IsdH は、ソルターゼ A によって細胞壁に固定され、IsdC は、専用のソルターゼ B¹⁸ によって細胞膜の近くに固定される。これらのタンパク質はすべて、Hb への結合とその構造的不安定化、ヘムの抽出、および細胞外空間から細胞膜近傍へのヘムの輸送に関与することができる、特徴的で汎用性のある近トランスポーター (near-transporter: NEAT) ドメインを有している (図2)。この驚くべき一連のイベントが ATP のようなエネルギー源を必要としないことは注目に値する。Hb に結合する NEAT ドメインファミリーである、IsdH の NEAT1 ドメイン、NEAT2 ドメインと、IsdB の NEAT1 ドメインには高い配列相同性がある (それぞれ 42, 64% が同一残基である)。一方、IsdH の NEAT3 ドメインと IsdB の NEAT2 ドメインを比較した場合を除いて (57% が同一残基)、ヘムに結合する NEAT ドメイン間の配列相同性ははるかに低い (20% 未満)。Hb に結合する NEAT ドメインとヘムに結合する NEAT ドメインの間の配列相同性も、同じようにきわめて低い。ヘムは NEAT ドメイン IsdC から膜固定トランスポーター IsdE に移され、続いて ATP によって駆動される膜貫通タンパク質である IsdF を介して細胞膜を横切って移動する。もう一つの膜タンパク質、IsdD の役割はまだ明らかになっていない。細胞質に到達すると、ヘムは、ヘムオキシゲナーゼ IsdG または IsdI によって、黄色ブドウ球菌にとって貴重な鉄原子がポルフィリン部分から分離される。以下では、これらの段階のそれぞれについて、構造的、エネルギー的および分子的側面に重点を置いて、より詳細に説明する。

2. ヘモグロビン (Hb) からのヘム抽出

細胞外の細胞壁固定型 IsdH および IsdB タンパク質は、宿主生物の主要なヘムキャリアである Hb からのヘム抽出に関与している。IsdH および IsdB は、それぞれ三つおよ

表1 Isd系でPDB登録されている立体構造

構造	PDB コード	分解能 (Å)	文献
h-Hb (alpha-chain) + IsdH-NEAT1	3S48	3.06	22
h-metHb + IsdH NEAT1	3SZK	3.01	20
h-metHb + IsdH-NEAT2	4FC3	2.26	21
h-metHb + IsdH-NEAT23	4IJ2	4.24	21
h-Hb + Hp + Hp receptor + IsdH-NEAT1	4WJG	3.01	23
h-metHb + IsdH-NEAT23	4XS0	2.55	24
IsdH-NEAT1	2H3K	NMR	68
IsdH linker	2LHR	NMR	27
IsdH-NEAT3	2E7D	2.20	33
IsdH-NEAT3 + heme	2Z6F	1.90	33
IsdH-NEAT3 + Ga(III) PPIX	3QUG	1.70	40
IsdH-NEAT3 + Mn(III) PPIX	3QUH	2.70	40
IsdH-NEAT3 + In(III) PPIX	3VTM	2.80	42
h-oxyHb + IsdB-NEAT12	5VMM	3.60	26
IsdB-NEAT1	2MOQ	NMR	69
IsdB-NEAT2 + heme	3RTL	1.45	36
IsdB-NEAT2 + Fab D2-06 + Fab P5	5D1Q	3.22	31
IsdB-NEAT2 + Fab D4-30 + Fab P5	5D1X	3.21	31
IsdB-NEAT1 + Fab D4-10 + Fab Y10	5D1Z	3.17	31
IsdA-NEAT	2ITE	1.60	34
IsdA-NEAT + heme	2ITF	1.90	34
IsdA-NEAT K75A + heme	3QZL	1.30	38
IsdA-NEAT H83A + heme	3QZM	1.25	38
IsdA-NEAT Y166A + heme	3QZN	2.00	38
IsdA-NEAT + Co(III)-PPIX	3QZP	1.90	38
IsdA-NEAT + reduced heme	3QZO	1.95	38
IsdC + heme	2O6P	1.50	35
IsdC + Zn(II)-PPIX	2K78	NMR	43
IsdE (SeMet) + heme	2Q8P	1.95	54
IsdE + heme	2Q8Q	2.15	54
IsdG	1XBW	1.90	62
IsdG + Heme	2ZDO	1.80	61
IsdI	1SQE	1.50	62
IsdI + Co-PPOX	2ZDP	1.50	61
IsdI + reduced heme	3LGM	1.88	63
IsdI + heme	3LGN	1.50	63
IsdI + heme + cyanide	3QGP	1.80	64
IsdI W66Y + heme	4FNH	1.90	65
IsdI W66Y + heme + cyanide	4FNI	1.80	65
Sortase B + MTSET	1QWZ	1.75	70
Sortase B + inhibitor E-64	1QX6	2.70	70
Sortase B + Gly3	1QXA	2.50	70
Sortase B + substrate	4FLD	2.49	71

び二つのNEATドメインを含むマルチドメインタンパク質である(図2)。IsdHはNEAT1, NEAT2およびNEAT3ドメインを含み, 最初の二つのNEATドメインはHbへの結合に関与し, NEAT3はHbに含まれるヘム部分に結合する¹⁹⁾。IsdBの場合, NEAT1およびNEAT2はそれぞれHbおよびヘムに結合する役割を担う。最近報告されている結晶およびNMR構造によって, Hb認識の分子的基础が明らかにされ, ヘムの抽出を説明するメカニズムの詳細が明らかになりつつある。現在までに報告されている立体構造を表1に示す。

IsdH-NEAT1²⁰⁾, IsdH-NEAT2²¹⁾のHbとの複合体の結晶構造は, これら二つのNEATドメインがHbの α 鎖の同じ領域に結合し, よく似た結合様式で相互作用することを示している[二乗平均二乗偏差(RMSD)=0.99Å](図3)。この事実は, 驚くべきことであった。というのは, ヘム抽出中に両方のドメイン(IsdHにおけるNEAT1とIsdBにおけるNEAT2)が同じ領域(Hbの α 鎖)に同時に結合することは不可能であるためである(図3c)。Hbに結合した状態のIsdH全長タンパク質の高次構造情報がまだ明らかになっておらず, Hbからのヘム抽出時におけるNEAT1ドメインの機能はいまだにわかっていないものの, Hbの α 鎖の二量体とIsdH-NEAT1との複合体の結晶構造によって, このNEAT1ドメインがHbの α 鎖に特異的に結合することは確認された²²⁾。さらに, Hbに対するNEAT1の結合特性は, 血漿タンパク質であるハプトグロビン(Hp), HbとNEAT1との三者複合体の結晶構造, および寄生虫である*Trypanosoma brucei*由来のHb-Hp複合体特異的受容体の結晶構造²³⁾など, Hbが関与する他の複合体の結晶構造によって確かめられている。

対照的に, 低分解能(4.2Å)で解かれたHb四量体に結合したIsdH NEAT2-リンカー-NEAT3の構造からは, NEAT2の構造的柔軟性がより増すことが示唆された。なぜなら, このドメインは, Hbに対する親和性が低下しているにもかかわらず, Hbの α 鎖だけでなくその β 鎖にも結合するからである²¹⁾。NEAT2-リンカー-NEAT3のHbとの結晶構造は他にも報告されており, NEAT2における β 鎖との相互作用がなくなることで, 結果として結晶化能と分解能が向上している(2.55Å, 図3)²⁴⁾。これらの二つの構造から, NEAT2-リンカー-NEAT3がダンベル形状のコンホメーションを持つことが明らかになった。リンカーは, NEAT3ドメインをHbのヘム結合ポケットの前に位置させてカーゴであるヘムを受け入れる準備ができていように思われる(図3d, e)。Hbとの相互作用は, NEAT3の3₁₀ヘリックスおよび7/8 β 鎖を含む領域に集中している。Tyr642がNEAT3においてヘム配位に重要な軸配位子であることから, NEAT3へY642Aという変異を導入することで, 結晶化中にHbからIsdHへのヘム部分の輸送反応が起きないようにして, Hb-IsdH複合体を調製した。

同様に, IsdB NEAT1-リンカー-NEAT2は, 最近の構造解析結果²⁵⁾から推測されるように, IsdHについて提案されたものと同様の機構を用いてHbに高親和性で結合する

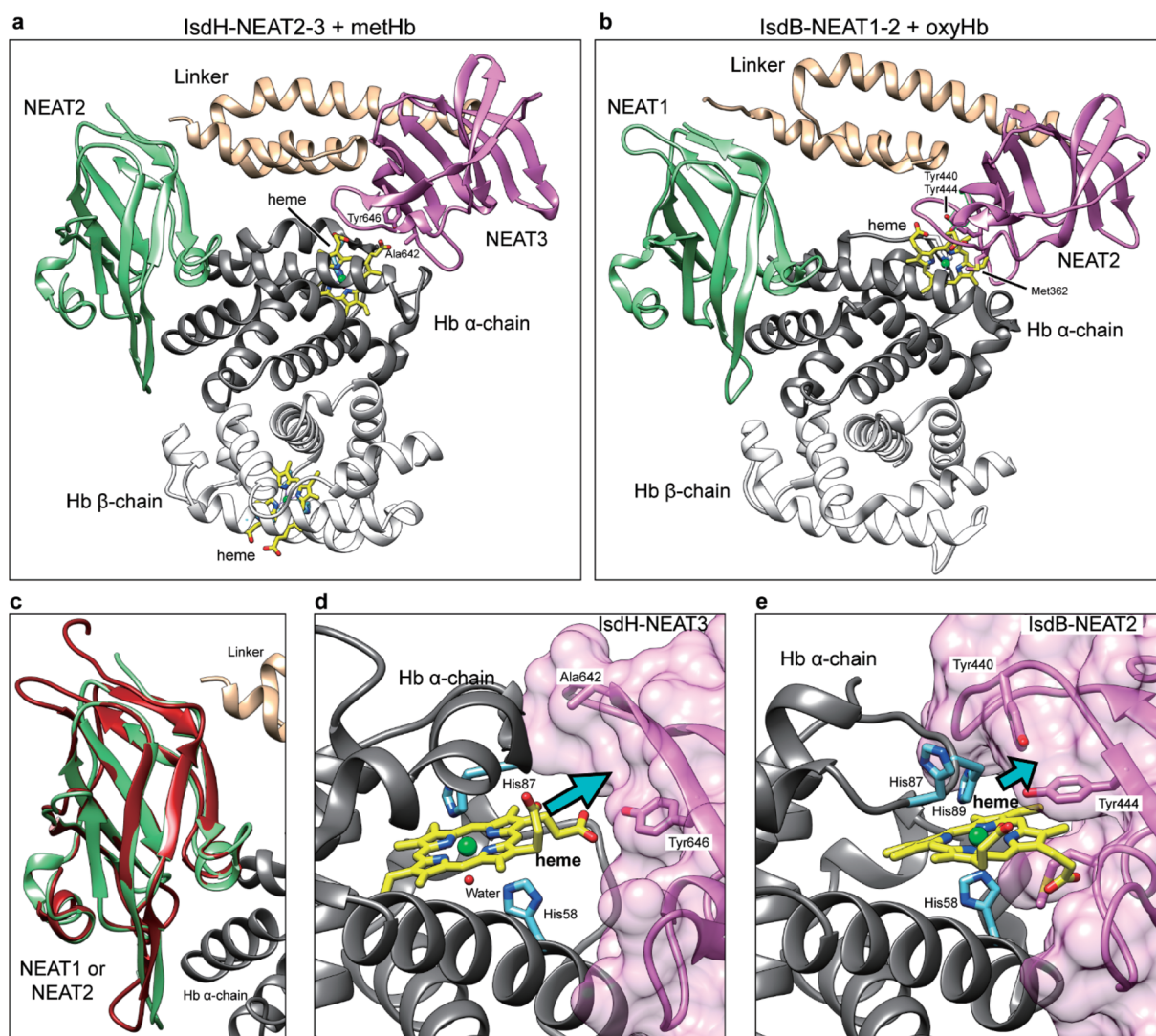


図3 IsdHおよびIsdBによるヒトHbの認識

(a) IsdHでは、ドメインNEAT1 (図示していない) およびNEAT2 (緑) がHbの α 鎖 (濃い灰色) を認識し、構造を不安定化する。NEAT2-リンカー-NEAT3の中で比較的三次構造が固定されている骨格部分は、Hbのヘムポケットの前面にNEAT3 (紫) を配置するのに適している。NEAT3を正確に配置することでHbの構造が不安定化し、Hbからのヘムの抽出が容易になる。ここに示した結晶構造は、NEAT3へのヘムの結合が阻害される変異Y642Aの導入により得られた。(b) IsdBのヘム結合および抽出機構は、IsdHのそれと同様であると提案されている。この構造では、IsdBには変異を導入しておらず、かわりにオキシヘモグロビンを用いている。また、ヘムは、NEAT2ドメインのより近傍にあることからIsdBへの輸送と一致するように、ヘム結合ポケットの外側に位置している。Hbの β 鎖に結合したヘムは見いだされなかった。構造は、PDBコード4XS0²⁴⁾ および5VMM²⁶⁾ に対応している。(c) IsdHのNEAT1とNEAT2ドメインのHb α 鎖への結合。Hbに結合したIsdH-NEAT1の座標はPDBコード3SZKによる。上の(a)にある、Hbに結合したIsdH-NEAT23の座標を重ねて表示した。(d) HbとIsdH-NEAT3間のヘム輸送領域を拡大した図。水分子を介してHis58が配位している。(e) HbとIsdB-NEAT2間のヘム輸送領域を拡大した図。(d)とまったく同じ配置にしてある。His58, His87, His89の配位構造がIsdHと異なることに注意。

と考えられる²⁶⁾。IsdBはオキシヘモグロビンからヘムを抽出することができないので、この状態のHbを複合体の結晶化に用いている。ドメインNEAT1, リンカーおよびNEAT2は、各々低いRMSD値 ($<1\text{Å}$) が示すように、Hbに対して等価な相互作用表面を提示することにより、IsdHについて観察されたものと同様の相互作用様式を示すことができる。それでもなお、いくつかの局所的な相違があり、それはヘム結合ポケットに存在する。IsdB-Hb複合体構造からは、Hbのヘム近傍の残基であるHis58および

His89に対して、HbのヘリックスC, D, FおよびHが変化することによってIsdB-NEAT2のヘム配位残基 (Tyr444およびMet362) が配位する6配位のヘムが形成されることが示唆される²⁵⁾。Hbのヘム部分の結合を弱めるために、これらの一連の構造変化が引き起こされ、IsdBによるヘム抽出が容易になると考えられる²⁵⁾。

Hbから酸素分子が解離したT状態に似た状態へとHb四次構造が変化することにより、Isdタンパク質によるHb結合およびヘム抽出プロセスの特徴がある²⁵⁾。このメカニズム

によって、ATPまたはプロトン勾配のような追加のエネルギー源が存在しなくても、ヘムがより高い親和性を有するタンパク質（Hb）からより低い親和性を有するタンパク質（IsdB-NEAT2）に移動することを説明できる。IsdBとの相互作用によってHbに誘導されるコンホメーション変化は、ヘムのすぐ近傍のアミノ酸残基およびHbの α 鎖のHヘリックス²⁴⁾の残基に限定されている。これと類似のメカニズムがIsdHで生じる可能性が提案されており、IsdHとHbの相互作用によって、Hb四量体の解離をもたらすような立体的ゆがみが生じるらしい²⁷⁾。

IsdHとIsdBの重要な違いは、Hpの存在に対する応答である。Hpは、溶血および組織損傷の間に血漿中に放出されたHbに非常に高い親和性で結合し、細胞受容体CD163による迅速なクリアランス（除去）に寄与する²⁸⁾。上に述べたように、IsdHとIsdBは構造的・機能的に類似しているにもかかわらず、IsdBではなくIsdHのみが、Hpの生理学的濃度の存在下でHbからヘムを抽出することができる。同様に、IsdHのみが細胞受容体CD163によるHbの血漿クリアランスを効果的に阻害する²⁹⁾。これは、IsdBが高い親和性でHb-Hp複合体に結合すること³⁰⁾、Hb-Hp-IsdB複合体²⁵⁾においてHpとIsdBの間には立体的衝突が観察されないことを考慮すると、さらに驚くべきことである。NEAT1を欠いているものの、NEAT2-リンカー-NEAT3部分がIsdHに非常に類似したIsdBの場合は、三つのIsdHドメインを持つコンストラクトより活性は弱いものの、ヘムに結合して抽出し、細胞アッセイにおいて受容体CD163によるHbのクリアランスを阻害することができる²⁹⁾。現在のところ、この差異の理由はまだわかっていない。

IsdBおよびIsdHは、黄色ブドウ球菌にとって宿主内の希少な鉄の状態でのヘム獲得にとって重要であるため、その新しい抗菌治療戦略の開発標的の一つになる。特異的な低分子阻害剤はまだ報告されていないが、最近ファイザー社のグループは、黄色ブドウ球菌に対する免疫学的反応を増強するアプローチを構築し、健康なドナーに由来するヒト抗体レパートリーからの抗IsdB中和抗体の同定を報告している³¹⁾。

3. ヘムの結合および細胞壁を横切る輸送

黄色ブドウ球菌は、細胞壁に固定された四つのタンパク質（IsdH, IsdB, IsdA, およびIsdC）によって、Hbから抽出されたヘムを細胞膜近傍へ輸送できる。これらのタンパク質は、Isd¹⁸⁾の遺伝子座にも存在する特定のソルターゼBを必要とするIsdCを除いて、ソルターゼA¹²⁾によってペプチドグリカンに固定されている（図1）。

ヘムが細胞壁をうまく通過するためには、ヘム結合性NEATドメインがヘムを十分に高い親和性で保持して、カーゴであるヘムを解離させないようにしなければならない。しかし同時に、ATPのようなエネルギー源がない状態で、トランスポーター間のヘム移動が十分に速い速度で起

こせるような特徴的な構造を有している必要がある。すべてのヘム結合NEATドメインの構造は、タンパク質あたり1分子のヘムを結合できる、構造的に非常に類似したフレーム上に構築されており、RMSD値は1Å未満ときわめて低い。しかしながら、IsdH-NEAT3/IsdB-NEAT2の場合を除くと、全体の配列相同性は低い（20%未満）にもかかわらず、ヘムに対する親和性は高く、解離定数はnMのオーダー³²⁾である。ヘム結合ポケットは、3₁₀ヘリックスおよび7/8 β 鎖を含む疎水性ポケット内に位置する。興味深いことに、このポケットがIsdHのNEAT1, NEAT2とIsdBのNEAT1がHbに結合するために使用されることは、このドメインがさまざまな機能を達成するために細菌でどのように進化したかという興味深い問題を提起するとともに、NEATドメインは配列相同性が低いことから推測されるように、変異に対して耐性の高い頑強な構造を有していることを示唆している。

8 β 鎖に位置するよく保存されたTyr残基は、ヘム結合ポケットにおいて重要な位置を占めている。Tyr642は近位側の鉄原子に配位し、Tyr646は近位側の鉄原子の水素結合距離内にあり、ポルフィリン環に平行である（図4）。遠位の位置は、IsdH³³⁾、IsdA³⁴⁾、およびIsdC³⁵⁾のヘム結合NEATドメインではアミノ酸残基が存在せず、IsdBではその一部がMetによって占められているものの、このMetへの変異導入はヘム結合に影響しなかった³⁶⁾。おそらくこのTyr642はチロシネート³⁷⁾の状態、酸化状態（Fe³⁺）の鉄原子を含むヘムと結合する。というのは、Tyr残基は通常、負にチャージしたチロシネートの状態でFe²⁺ではなくFe³⁺のリガンドとなるからである。遠位領域で構造的に柔軟なHis残基を特徴とするIsdAのNEATドメインは、鉄（Fe²⁺）ポルフィリンにも結合することが報告されている^{38, 39)}。一方、同等のHis残基はIsdC-NEATおよびIsdH-NEAT3には存在しない。このことがIsdC-NEATおよびIsdH-NEAT3がFe²⁺ポルフィリンには結合しない理由であろう^{40, 41)}。ヘムの配位において用いられているTyr残基（チロシネート）の特性から、Fe³⁺、Co³⁺、Ga³⁺、Mn³⁺、またはIn³⁺のような酸化状態IIIの金属^{19, 38, 40, 42, 43)}と比較して、第一鉄Fe²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、およびMg²⁺などの酸化状態IIの金属を結合しているポルフィリンへの親和性が低い（または結合しない）ことが説明できる。Isdシステムは、Ga³⁺またはIn³⁺などを持つ非鉄金属ポルフィリンが、ヘムに対する親和性^{40, 42)}と同程度でNEATドメインに結合することから、細菌の細胞質への抗菌性金属ポルフィリンの取り込みを促進する媒体として作用し、病原体の正常な代謝を邪魔するような⁴⁴⁾、またヘム輸送を直接的にブロックするような、望ましくない金属を導入するのである⁴⁵⁾。これは「トロイの木馬」戦略とも呼ばれ、病原性微生物感染の対処法への応用が期待されている。

ヘムの輸送は、ヘム結合NEATドメイン⁴⁶⁻⁴⁸⁾を含むあらゆる二つのタンパク質の任意の対の間で弱いNEAT-NEAT相互作用によって媒介される、いわゆる高速リレー機構

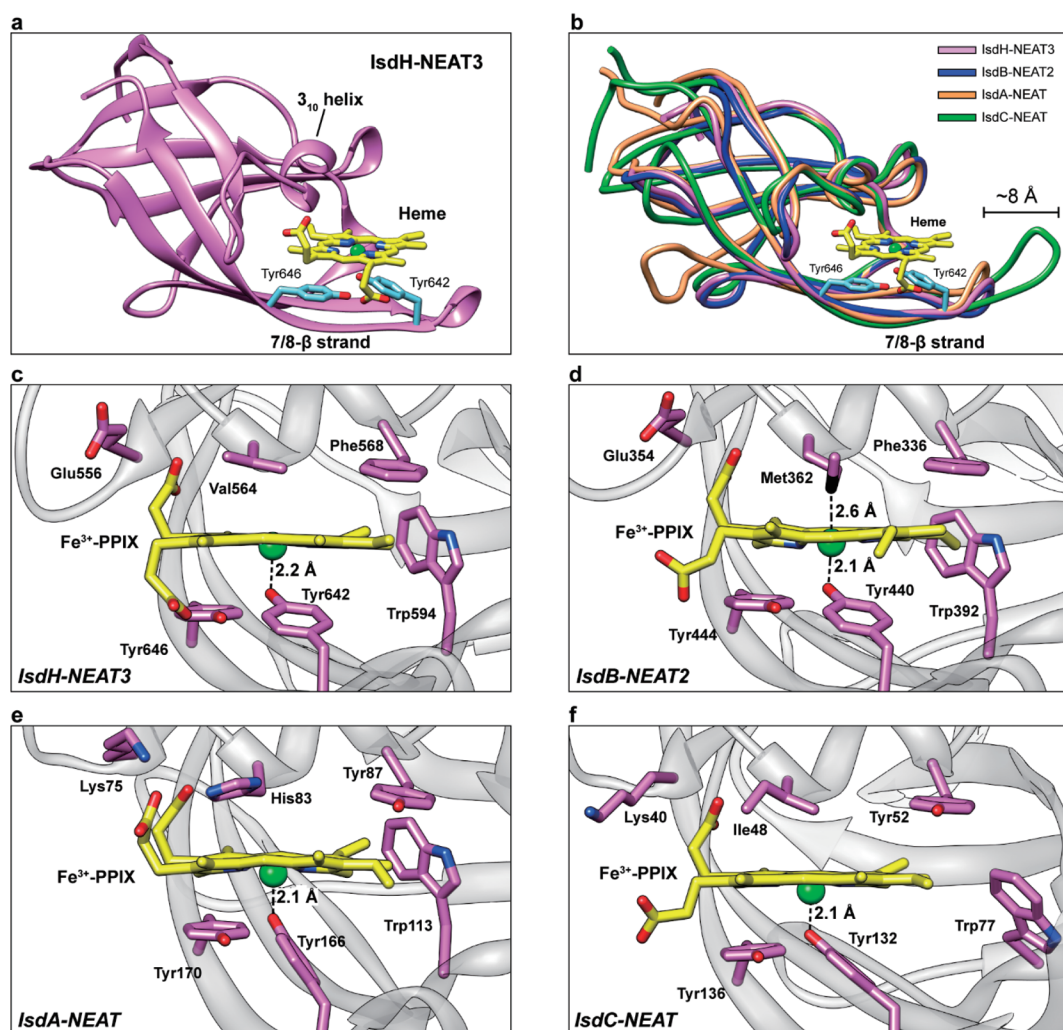


図4 NEATドメインによるヘムの結合

(a) IsdH-NEAT3の全体構造。(b) Isdのヘムを結合するNEATドメイン間の構造比較。(c~f) Tyr残基との配位結合を特徴とする疎水性ポケットの拡大図。(c)~(f)はそれぞれIsdA-NEAT³³⁾、IsdB-NEAT²³⁶⁾、IsdA-NEAT³⁴⁾およびIsdC-NEAT³⁵⁾に対応している。ヘムおよびタンパク質残基は、それぞれ、黄色および紫色のスティックで描いた。鉄原子は緑色の球として示した。

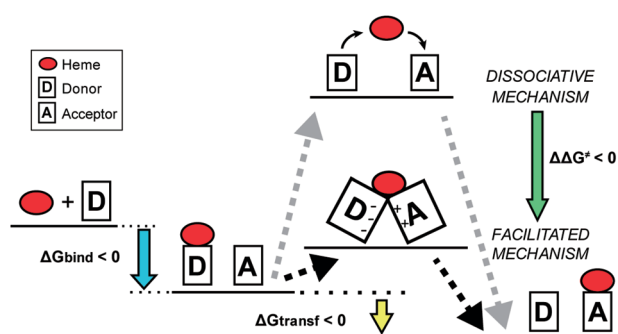


図5 二つのNEATドメイン（ここではドナーとアクセプターと呼ぶ）間のヘム伝達機構を説明するエネルギーモデル。ドナーとアクセプターの間の直接の相互作用は、遷移状態で必要とされるエネルギー (ΔG°) を減少させ、ヘムの移動速度を加速する。

(同種のタンパク質どうしのNEATドメイン間の移動を含む) による⁴⁹⁾。ヘムポケットの残基と7/8β鎖の先端との間の弱い非共有結合によるタンパク質-タンパク質相互作用

用は、まさにヘムが移動する際にヘム部分の溶媒への露出を最小限に抑え、遷移状態におけるエネルギーを減少させることによってヘム受け渡しを加速する(図5)^{49, 50)}。現在、二つのモデルがヘム受け渡しを説明すると考えられている。その一つはハンドクランプモデルとよばれ、ヘムがドナーとアクセプターの間を約18Å滑る必要があると提案されており、その受け渡しにはTyr軸配位子(図4参照のこと)のいずれかが関わっているらしい⁵⁰⁾。MDおよびドッキングシミュレーションから、ヘム受け渡し時に、ドナーおよびアクセプターが同時にヘム部分に配位するモデル(ハンドクラッシュと呼ばれる)が提案されており^{37, 38)}、これらのモデルに関する実験的検証が進められている。

親和性が徐々に増すことにより誘導されるヘムの移動(熱力学的制御と定義する)は、外部受容体IsdHおよびIsdBからIsdAへ、そして最後にIsdCへと起こる。IsdCは、ヘム結合NEATドメインの中で最も高いヘム親和性を示

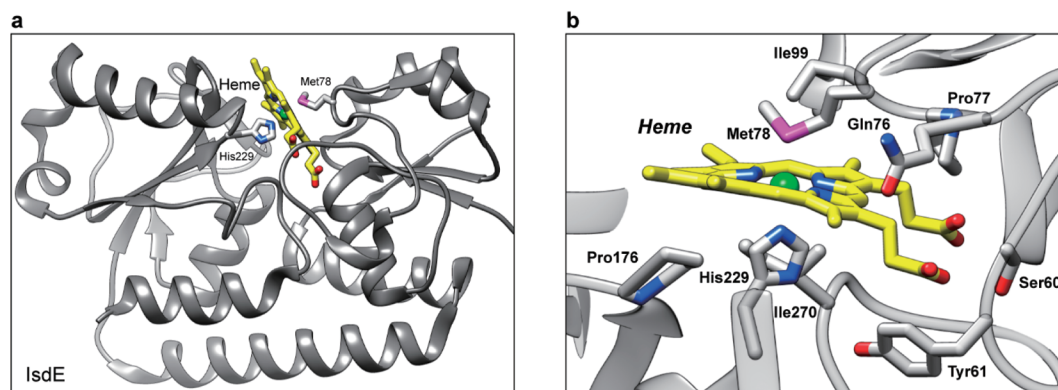


図6 膜固定IsdEによるヘムの結合様式

(a)二つの大きな葉（ローブ）構造が観察されるIsdEの全体像。ヘムとその軸配位子であるアミノ酸残基His229およびMet78はスティックで描いた。ヘムとIsdEとの間の相互作用表面は、タンパク質の二つのローブが向かい合う面に位置している。(b)ヘム結合ポケットの拡大図。鉄原子と軸配位子との間の距離は、2.0 Å (His229) および 2.3 Å (Met78) である。座標はPDBコード2Q8Q⁵⁴⁾ による。

し、IsdC特異的ソルターゼB^{32, 51)} の働きにより細胞膜に最も近いところに位置する。

4. 細胞膜を横切るヘムの輸送

ヘム部分は、細胞壁を横切った後、細胞膜を通して細菌の細胞質に運搬される必要がある。この重要な段階に関与するタンパク質の性質は、膜に固定された基質結合タンパク質IsdE、膜貫通型ABC透過酵素／トランスポーター(IsdF)、および膜タンパク質、そして今なおその機能が明らかでない第三のタンパク質(IsdD) からなると予測される。これらはNEATドメインを持つ一連のトランスポーター分子群とは異なっている。

IsdEは、N末端にN-パルミトイルシステインを介して膜に固定されると予測される33kDaのタンパク質である⁵²⁾。IsdEは、すでに知られている膜貫通型ABC透過酵素／トランスポーターの場合と同様に、ATP駆動の膜貫通パーミターゼが機能する基質であるヘム結合タンパク質の役割を果たす⁵³⁾。ヘムが結合したIsdEの結晶構造⁵⁴⁾ から、同様のヘム結合タンパク質ファミリーにおいて観察されるような、基質が中心位置を占める共通2葉（ローブ）配座を有することが明らかになった（図6⁵⁵⁾）。IsdEとヘム結合NEATドメインはまったく異なるファミリーに属していることから想定されていたように、IsdEが採用した三次構造が、ヘム結合NEATドメインのものとはまったく異なることがわかる。すなわち、相違点として、ヘム結合ポケットの残基組成、タンパク質に対するヘムの配向（プロピオン酸はタンパク質の内部を向いている）、およびIsdEでは二つの軸方向リガンド（His229およびMet78）からなる鉄の配位をあげることができる^{54, 56)}。おそらくこの軸配位子の組み合わせのために、IsdEは鉄ポルフィリン（III）よりも鉄ポルフィリン（II）に適しているのであろう⁵⁶⁾。ヘムはIsdCのみからIsdEに移されるが、IsdAからは移されず⁵¹⁾、IsdCは鉄ポルフィリン（II）に結合しないことから、細胞

壁におけるIsdCからIsdEへのヘム輸送時に鉄2価状態であることが重要であるかどうかは不明である。IsdCからIsdEへのヘムの選択的運搬は、IsdCのNEATドメインの3₁₀ヘリックスおよび7/8β鎖およびIsdEのヘム結合ポケットの近傍の構造要素を含むきわめて弱い非共有結合相互作用に依存する⁴⁹⁾。NEATドメインと同様に、IsdEにおける伝達方向もまた、ヘムのドナーとアクセプターの間の親和性の差に依存する⁵⁷⁾。さらに、このようなヘム運搬は、IsdCの7/8β鎖の先端の配列を含む相互作用に決定的に依存し、その結果、IsdCは、IsdAよりもIsdEへのヘム輸送タンパク質として機能するのである。この仮説を立証するために、IsdCの7/8β鎖の先端の残基を有するIsdAのヘム結合ドメインのキメラタンパク質を調製したところ、このキメラタンパク質はIsdEに対してより速くヘムを運搬した⁴⁹⁾。

IsdEとは対照的に、他の二つのタンパク質であるIsdFおよびIsdDについての生化学的特徴に関する報告例はない。IsdFの機能は、配列アラインメント¹²⁾ から膜貫通パーミターゼとして作用することが提案されており、たとえば、大腸菌由来のビタミンB12トランスポーターBtuCとは22%の相同性を有している⁵³⁾。IsdFはATPアーゼ活性を有していないが、すでに報告されているシデロフォア輸送体HtsABC⁵⁸⁾ およびSirABC⁵⁹⁾ に加えて、多能性タンパク質FhuCが、細胞内へのヘム輸送におけるATPアーゼとして機能する可能性が提案されている。IsdDの構造・機能に関しては現時点では報告がないものの、膜貫通タンパク質として、IsdEおよびIsdFと相互作用すると推測されている¹⁷⁾。

5. IsdGおよびIsdIによるヘム分解

細胞にとって細胞質へのヘムの蓄積は潜在的に毒性となる可能性があるため、ヘムが細胞質に到達したら迅速に移動させなければならない。ヘム分子は、細菌タンパク質の補因子として直接利用することができ、また鉄原子をボル

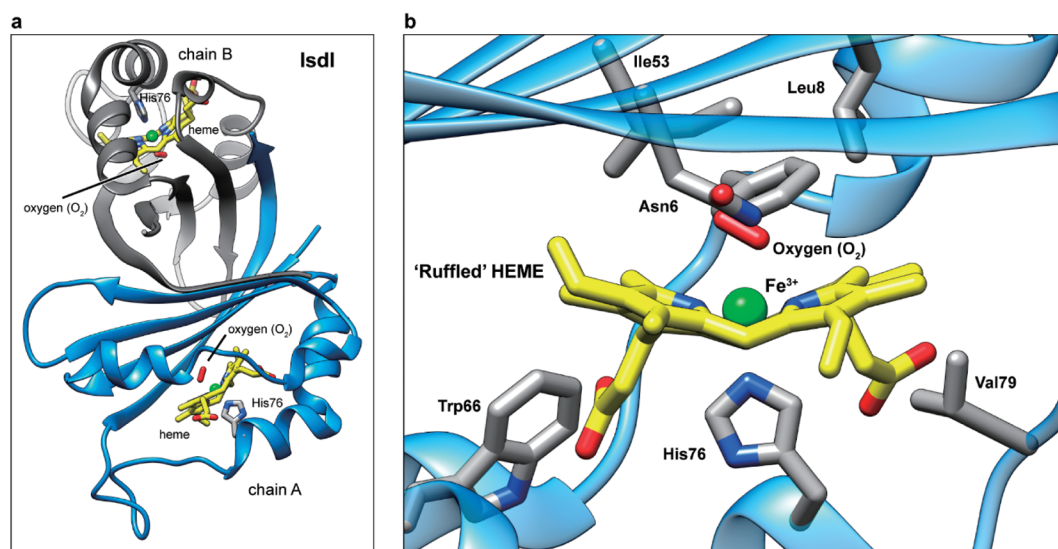


図7 ヘム結合したヘムオキシゲナーゼ IsdI

(a) IsdIの二量体の結晶構造。鎖Aおよび鎖Bはそれぞれ青色および濃い灰色で示した。ヘムおよび軸配位子 His76 および酸素 (O_2) はスティックで描いてある。(b)非常にゆがんだヘム部分を示すヘム結合ポケットの拡大図。鉄原子と軸配位子との間の距離は、2.1 Å (His76) および 2.1 Å (O_2) である。ヘムは、平面状態から大きくゆがんでいることがわかる (ヘム・ラフリング)。活性部位にヘムを結合させたままで結晶化させるために、結晶を4°Cで成長させた。座標は、PDBコード3LGN(63)に対応する。

フィリン環から解離させるために分解される。Isd遺伝子座から発現される二つのヘムオキシゲナーゼは、IsdGおよびIsdIと呼ばれ、アミノ酸残基レベル^{12, 17, 60)}で高い相同性(64%)を持つ独特なファミリーを構成している。IsdGおよびIsdIの基質はヘムに限定されており、 Ga^{3+} 、 Co^{3+} 、 Mn^{3+} 、または Zn^{2+} を含む金属ポルフィリンに関する活性は現在までに報告されていない⁶¹⁾。

IsdGとIsdIの結晶構造によれば、これらの二つのヘムオキシゲナーゼは互いに構造的に非常に類似しており、安定な二量体(IsdGの構造を図7に示した)⁶¹⁻⁶⁴⁾を形成している。原子座標の比較から両者のRMSD値は~1.2 Åと低く、これらの間には高い収束進化があることがわかる。活性部位が二量体界面から遠いので、酵素活性は二量体化に関連していないようである。

これらの構造の特徴は、ヘムが、酸化部位のメソ炭素が結合酸素に向かって位置させられるように、平面性からはるかにゆがんだコンホメーション(ヘム・ラフリング)をとっていることである(図7b)。このゆがみは、結合部位である溝⁶¹⁾における広範な立体的相互作用によって生じる。ヘム・ラフリングは、古典的なヘムオキシゲナーゼの活性に必須である遠位ヘムポケットの水クラスターの必要性を排除し、酵素活性に重要な役割を果たすことが示されている⁶⁴⁾。このような仮説は、IsdIにおけるTrp66の一連の変異体において、66位のアミノ酸側鎖の大きさが、ヘムのゆがみの程度に直接関連していることから確認された⁶⁵⁾。同様に、Trp66の部位により側鎖体積の大きな残基を持つ変異体は、酵素活性がより高いことが示され、ひずみとヘム分解活性との間の関係も示されている。通常はヘムオキシゲナーゼによってCOおよびビリベルジンが産生

されるのに対し、IsdIのヘムオキシゲナーゼにおいては、このような過去に報告がないメカニズムに基づいて、ホルムアルデヒドおよびスタフィロピリンが生成される^{66, 67)}。

6. おわりに

本稿では、黄色ブドウ球菌において、ヘムがヘモグロビンからの細胞外受容体IsdBおよびIsdHによって捕獲された瞬間から、細胞質酵素IsdGおよびIsdIによって処理されるまでの新規なIsdプロセスを概説した。その洗練されたプロセスはただ驚くばかりである。構造的な観点から、ヘムは、最終的な目的地である細胞膜内への輸送中に、さまざまなヘム結合ドメイン、中心鉄原子による多様な配位を特徴とした、いくつかの固有の物理化学的環境を経験する。

Isdシステムについては、以下の二つの重要な側面がまだ理解されておらず、今後の研究の進展が待たれるところである。第一に、細胞壁のNEATドメイン間、すなわちあるタンパク質から別のタンパク質への移行におけるヘムリレーのメカニズムを原子レベルで解明することが必要である。第二に、細胞膜におけるヘムの挙動は推測の域を出ていないことから、その詳細な記述には、まだ多くの研究が必要である。細菌の病原性発現において、鉄要求性の分子機構を解明することは重要であり、Isdシステムの統合的理解はそのための大きな方向性を与えると考えられる。これらの知見が、今後、新規抗生物質および革新的抗菌戦略の開発の基礎になることはいうまでもない。

謝辞

本稿は、日本学術振興会科学研究費補助金によるサポー

トをもとに展開されている，東京大学大学院工学系研究科／医科学研究所津本研究室所属のスタッフ，学生による研究成果を中心にまとめたものであり，皆の不断の努力の賜物である．ここに深く感謝したい．齋藤正男先生（東北大名誉教授，AMED顧問）には，本システム研究の魅力を最大限に引き出して下さっただけでなく，研究推進を大きくサポートいただいております，この場を借りて心よりお礼申し上げます。

文 献

- Cassat, J.E. & Skaar, E.P. (2013) Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe*, **13**, 510–520.
- Skaar, E.P. (2010) The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog.*, **6**, e1000949.
- Ganz, T. & Nemeth, E. (2006) Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochim. Biophys. Acta*, **1763**, 690–699.
- Wandersman, C. & Delepeleire, P. (2012) Haemophore functions revisited. *Mol. Microbiol.*, **85**, 618–631.
- Hare, S.A. (2017) Diverse structural approaches to haem appropriation by pathogenic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1865**, 422–433.
- Sheldon, J.R. & Heinrichs, D.E. (2015) Recent developments in understanding the iron acquisition strategies of gram positive pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.*, **39**, 592–630.
- Sheldon, J.R., Laakso, H.A., & Heinrichs, D.E. (2016) Iron acquisition strategies of bacterial pathogens. *Microbiol. Spectr.*, **4**, 1–32.
- Choby, J.E. & Skaar, E.P. (2016) Heme synthesis and acquisition in bacterial pathogens. *J. Mol. Biol.*, **428**, 3408–3428.
- Braun, V. & Hantke, K. (2011) Recent insights into iron import by bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **15**, 328–334.
- Contreras, H., Chim, N., Credali, A., & Goulding, C.W. (2014) Heme uptake in bacterial pathogens. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **19**, 34–41.
- Hempel, K., Herbst, F.A., Moche, M., Hecker, M., & Becher, D. (2011) Quantitative proteomic view on secreted, cell surface-associated, and cytoplasmic proteins of the methicillin-resistant human pathogen *Staphylococcus aureus* under iron-limited conditions. *J. Proteome Res.*, **10**, 1657–1666.
- Mazmanian, S.K., Skaar, E.P., Gaspar, A.H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D.M., & Schneewind, O. (2003) Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science*, **299**, 906–909.
- Torres, V.J., Attia, A.S., Mason, W.J., Hood, M.I., Corbin, B.D., Beasley, F.C., Anderson, K.L., Stauff, D.L., McDonald, W.H., Zimmerman, L.J., et al. (2010) *Staphylococcus aureus* Fur regulates the expression of virulence factors that contribute to the pathogenesis of pneumonia. *Infect. Immun.*, **78**, 1618–1628.
- Lowy, F.D. (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.*, **339**, 520–532.
- Lowy, F.D. (2011) How *Staphylococcus aureus* adapts to its host. *N. Engl. J. Med.*, **364**, 1987–1990.
- Dryla, A., Gelbmann, D., von Gabain, A., & Nagy, E. (2003) Identification of a novel iron regulated staphylococcal surface protein with haptoglobin-haemoglobin binding activity. *Mol. Microbiol.*, **49**, 37–53.
- Grigg, J.C., Ukpabi, G., Gaudin, C.F., & Murphy, M.E. (2010) Structural biology of heme binding in the *Staphylococcus aureus* Isd system. *J. Inorg. Biochem.*, **104**, 341–348.
- Mazmanian, S.K., Ton-That, H., Su, K., & Schneewind, O. (2002) An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2293–2298.
- Pilpa, R.M., Robson, S.A., Villareal, V.A., Wong, M.L., Phillips, M., & Clubb, R.T. (2009) Functionally distinct NEAT (NEAR Transporter) domains within the *Staphylococcus aureus* IsdH/HarA protein extract heme from methemoglobin. *J. Biol. Chem.*, **284**, 1166–1176.
- Kumar, K.K., Jacques, D.A., Pishchany, G., Caradoc-Davies, T., Spirig, T., Malmirchegini, G.R., Langley, D.B., Dickson, C.F., Mackay, J.P., Clubb, R.T., et al. (2011) Structural basis for hemoglobin capture by *Staphylococcus aureus* cell-surface protein, IsdH. *J. Biol. Chem.*, **286**, 38439–38447.
- Dickson, C.F., Kumar, K.K., Jacques, D.A., Malmirchegini, G.R., Spirig, T., Mackay, J.P., Clubb, R.T., Guss, J.M., & Gell, D.A. (2014) Structure of the hemoglobin-IsdH complex reveals the molecular basis of iron capture by *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, **289**, 6728–6738.
- Kumar, K.K., Jacques, D.A., Guss, J.M., & Gell, D.A. (2014) The structure of alpha-haemoglobin in complex with a haemoglobin-binding domain from *Staphylococcus aureus* reveals the elusive alpha-haemoglobin dimerization interface. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.*, **70**, 1032–1037.
- Stodkilde, K., Torvund-Jensen, M., Moestrup, S.K., & Andersen, C.B.F. (2014) Structural basis for trypanosomal haem acquisition and susceptibility to the host innate immune system. *Nat. Commun.*, **5**, 5487.
- Dickson, C.F., Jacques, D.A., Clubb, R.T., Guss, J.M., & Gell, D.A. (2015) The structure of haemoglobin bound to the haemoglobin receptor IsdH from *Staphylococcus aureus* shows disruption of the native alpha-globin haem pocket. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.*, **71**, 1295–1306.
- Bowden, C.F.M., Verstraete, M.M., Eltis, L.D., & Murphy, M.E.P. (2014) Hemoglobin binding and catalytic heme extraction by IsdB near iron transporter domains. *Biochemistry*, **53**, 2286–2294.
- Bowden, C.F.M., Chan, A.C.K., Li, E.J.W., Arrieta, A.L., Eltis, L.D., & Murphy, M.E.P. (2018) Structure-function analyses reveal key features in *Staphylococcus aureus* IsdB-associated unfolding of the heme-binding pocket of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, **293**, 177–190.
- Spirig, T., Malmirchegini, G.R., Zhang, J., Robson, S.A., Sjødt, M., Liu, M.Y., Kumar, K.K., Dickson, C.F., Gell, D.A., Lei, B.F., et al. (2013) *Staphylococcus aureus* uses a novel multidomain receptor to break apart human hemoglobin and steal its heme. *J. Biol. Chem.*, **288**, 1065–1078.
- Andersen, C.B.F., Torvund-Jensen, M., Nielsen, M.J., de Oliveira, C.L.P., Hersleth, H.P., Andersen, N.H., Pedersen, J.S., Andersen, G.R., & Moestrup, S.K. (2012) Structure of the haptoglobin-haemoglobin complex. *Nature*, **489**, 456–459.
- Saederup, K.L., Stodkilde, K., Graversen, J.H., Dickson, C.F., Etzerodt, A., Hansen, S.W.K., Fago, A., Gell, D., Andersen, C.B.F., & Moestrup, S.K. (2016) The *Staphylococcus aureus* protein IsdH inhibits host hemoglobin scavenging to promote heme acquisition by the Pathogen. *J. Biol. Chem.*, **291**, 23989–23998.
- Dryla, A., Hoffmann, B., Gelbmann, D., Giefing, C., Hanner, M., Meinke, A., Anderson, A.S., Koppensteiner, W., Konrat, R., von Gabain, A., et al. (2007) High-affinity binding of the staphylococcal HarA protein to haptoglobin and hemoglobin involves a domain with an antiparallel eight-stranded beta-barrel fold. *J.*

- Bacteriol.*, **189**, 254–264.
- 31) Yeung, Y.A., Foletti, D., Deng, X.D., Abdiche, Y., Strop, P., Glanville, J., Pitts, S., Lindquist, K., Sundar, P.D., Sirota, M., et al. (2016) Germline-encoded neutralization of a *Staphylococcus aureus* virulence factor by the human antibody repertoire. *Nat. Commun.*, **7**, 13376.
 - 32) Moriwaki, Y., Terada, T., Caaveiro, J.M.M., Takaoka, Y., Hamachi, I., Tsumoto, K., & Shimizu, K. (2013) Heme binding mechanism of structurally similar iron-regulated surface determinant near transporter domains of *Staphylococcus aureus* exhibiting different affinities for heme. *Biochemistry*, **52**, 8866–8877.
 - 33) Watanabe, M., Tanaka, Y., Suenaga, A., Kuroda, M., Yao, M., Watanabe, N., Arisaka, F., Ohta, T., Tanaka, I., & Tsumoto, K. (2008) Structural basis for multimeric heme complexation through a specific protein-heme interaction: The case of the third neat domain of IsdH from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, **283**, 28649–28659.
 - 34) Grigg, J.C., Vermeiren, C.L., Heinrichs, D.E., & Murphy, M.E. (2007) Haem recognition by a *Staphylococcus aureus* NEAT domain. *Mol. Microbiol.*, **63**, 139–149.
 - 35) Sharp, K.H., Schneider, S., Cockayne, A., & Paoli, M. (2007) Crystal structure of the heme-IsdC complex, the central conduit of the Isd iron/heme uptake system in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, **282**, 10625–10631.
 - 36) Gaudin, C.F., Grigg, J.C., Arrieta, A.L., & Murphy, M.E. (2011) Unique heme-iron coordination by the hemoglobin receptor IsdB of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, **50**, 5443–5452.
 - 37) Moriwaki, Y., Terada, T., Tsumoto, K., & Shimizu, K. (2015) Rapid heme transfer reactions between NEAT transporter domains of *Staphylococcus aureus*: A theoretical study using QM/MM and MD simulations. *PLoS ONE*, **10**, 145125.
 - 38) Grigg, J.C., Mao, C.X., & Murphy, M.E. (2011) Iron-coordinating tyrosine is a key determinant of NEAT domain heme transfer. *J. Mol. Biol.*, **413**, 684–698.
 - 39) Vermeiren, C.L., Pluym, M., Mack, J., Heinrichs, D.E., & Stillman, M.J. (2006) Characterization of the heme binding properties of *Staphylococcus aureus* IsdA. *Biochemistry*, **45**, 12867–12875.
 - 40) Moriwaki, Y., Caaveiro, J.M.M., Tanaka, Y., Tsutsumi, H., Hamachi, I., & Tsumoto, K. (2011) Molecular basis of recognition of antibacterial porphyrins by heme-transporter IsdH-NEAT3 of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, **50**, 7311–7320.
 - 41) Pluym, M., Muryoi, N., Heinrichs, D.E., & Stillman, M.J. (2008) Heme binding in the NEAT domains of IsdA and IsdC of *Staphylococcus aureus*. *J. Inorg. Biochem.*, **102**, 480–488.
 - 42) Vu, N.T., Moriwaki, Y., Caaveiro, J.M.M., Terada, T., Tsutsumi, H., Hamachi, I., Shimizu, K., & Tsumoto, K. (2013) Selective binding of antimicrobial porphyrins to the heme-receptor IsdH-NEAT3 of *Staphylococcus aureus*. *Protein Sci.*, **22**, 942–953.
 - 43) Villareal, V.A., Pilpa, R.M., Robson, S.A., Fadeev, E.A., & Clubb, R.T. (2008) The IsdC protein from *Staphylococcus aureus* uses a flexible binding pocket to capture heme. *J. Biol. Chem.*, **283**, 31591–31600.
 - 44) Stojiljkovic, I., Kumar, V., & Srinivasan, N. (1999) Non-iron metalloporphyrins: Potent antibacterial compounds that exploit haem/Hb uptake systems of pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.*, **31**, 429–442.
 - 45) Tiedemann, M.T., Pinter, T.B.J., & Stillman, M.J. (2012) Insight into blocking heme transfer by exploiting molecular interactions in the core Isd heme transporters IsdA-NEAT, IsdC-NEAT, and IsdE of *Staphylococcus aureus*. *Metallomics*, **4**, 751–760.
 - 46) Muryoi, N., Tiedemann, M.T., Pluym, M., Cheung, J., Heinrichs, D.E., & Stillman, M.J. (2008) Demonstration of the iron-regulated surface determinant (Isd) heme transfer pathway in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, **283**, 28125–28136.
 - 47) Tiedemann, M.T., Muryoi, N., Heinrichs, D.E., & Stillman, M.J. (2008) Iron acquisition by the haem-binding Isd proteins in *Staphylococcus aureus*: Studies of the mechanism using magnetic circular dichroism. *Biochem. Soc. Trans.*, **36**, 1138–1143.
 - 48) Zhu, H., Xie, G., Liu, M.Y., Olson, J.S., Fabian, M., Dooley, D.M., & Lei, B.F. (2008) Pathway for heme uptake from human methemoglobin by the iron-regulated surface determinants system of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, **283**, 18450–18460.
 - 49) Abe, R., Caaveiro, J.M., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., & Tsumoto, K. (2012) Mapping ultra-weak protein-protein interactions between heme transporters of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, **287**, 16477–16487.
 - 50) Villareal, V.A., Spirig, T., Robson, S.A., Liu, M., Lei, B., & Clubb, R.T. (2011) Transient weak protein-protein complexes transfer heme across the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 14176–14179.
 - 51) Tiedemann, M.T., Heinrichs, D.E., & Stillman, M.J. (2012) Multiprotein heme shuttle pathway in *Staphylococcus aureus*: Iron-regulated surface determinant cog-wheel kinetics. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 16578–16585.
 - 52) van Wely, K.H.M., Swaving, J., Freudl, R., & Driessen, A.J.M. (2001) Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**, 437–454.
 - 53) Korkhov, V.M., Mireku, S.A., Veprintsev, D.B., & Locher, K.P. (2014) Structure of AMP-PNP-bound BtuCD and mechanism of ATP-powered vitamin B12 transport by BtuCD-F. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 1097–1099.
 - 54) Grigg, J.C., Vermeiren, C.L., Heinrichs, D.E., & Murphy, M.E. (2007) Heme coordination by *Staphylococcus aureus* IsdE. *J. Biol. Chem.*, **282**, 28815–28822.
 - 55) Dwyer, M.A. & Hellinga, H.W. (2004) Periplasmic binding proteins: A versatile superfamily for protein engineering. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **14**, 495–504.
 - 56) Pluym, M., Vermeiren, C.L., Mack, J., Heinrichs, D.E., & Stillman, M.J. (2007) Heme binding properties of *Staphylococcus aureus* IsdE. *Biochemistry*, **46**, 12777–12787.
 - 57) Tiedemann, M.T. & Stillman, M.J. (2012) Heme binding to the IsdE(M78A; H229A) double mutant: Challenging unidirectional heme transfer in the iron-regulated surface determinant protein heme transfer pathway of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **17**, 995–1007.
 - 58) Speziali, C.D., Dale, S.E., Henderson, J.A., Vines, E.D., & Heinrichs, D.E. (2006) Requirement of *Staphylococcus aureus* ATP-binding cassette-ATPase FhuC for iron-restricted growth and evidence that it functions with more than one iron transporter. *J. Bacteriol.*, **188**, 2048–2055.
 - 59) Dale, S.E., Sebulsky, M.T., & Heinrichs, D.E. (2004) Involvement of SirABC in iron-siderophore import in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **186**, 8356–8362.
 - 60) Reniere, M.L., Torres, V.J., & Skaar, E.P. (2007) Intracellular metalloporphyrin metabolism in *Staphylococcus aureus*. *Biometals*, **20**, 333–345.
 - 61) Lee, W.C., Reniere, M.L., Skaar, E.P., & Murphy, M.E.P. (2008) Ruffling of metalloporphyrins bound to IsdG and IsdI, two heme-degrading enzymes in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, **283**, 30957–30963.
 - 62) Wu, R.Y., Skaar, E.P., Zhang, R.G., Joachimiak, G., Gornicki, P., Schneewind, O., & Joachimiak, A. (2005) *Staphylococcus aureus* IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes with structural similarity to monooxygenases. *J. Biol. Chem.*, **280**, 2840–2846.

- 63) Reniere, M.L., Ukpabi, G.N., Harry, S.R., Stec, D.F., Krull, R., Wright, D.W., Bachmann, B.O., Murphy, M.E., & Skaar, E.P. (2010) The IsdG-family of haem oxygenases degrades haem to a novel chromophore. *Mol. Microbiol.*, **75**, 1529–1538.
- 64) Takayama, S.J., Ukpabi, G., Murphy, M.E.P., & Mauk, A.G. (2011) Electronic properties of the highly ruffled heme bound to the heme degrading enzyme IsdI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 13071–13076.
- 65) Ukpabi, G., Takayama, S.J., Mauk, A.G., & Murphy, M.E.P. (2012) Inactivation of the heme degrading enzyme IsdI by an active site substitution that diminishes heme ruffling. *J. Biol. Chem.*, **287**, 34179–34188.
- 66) Matsui, T., Nambu, S., Ono, Y., Goulding, C.W., Tsumoto, K., & Ikeda-Saito, M. (2013) Heme degradation by *Staphylococcus aureus* IsdG and IsdI liberates formaldehyde rather than carbon monoxide. *Biochemistry*, **52**, 3025–3027.
- 67) Wilks, A. & Ikeda-Saito, M. (2014) Heme utilization by pathogenic bacteria: Not all pathways lead to biliverdin. *Acc. Chem. Res.*, **47**, 2291–2298.
- 68) Pilpa, R.M., Fadeev, E.A., Villareal, V.A., Wong, M.L., Phillips, M., & Clubb, R.T. (2006) Solution structure of the NEAT (NEAr Transporter) domain from IsdH/HarA: The human hemoglobin receptor in *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.*, **360**, 435–447.
- 69) Fonner, B.A., Tripet, B.P., Eilers, B.J., Stanisich, J., Sullivan-Springhetti, R.K., Moore, R., Liu, M.Y., Lei, B.F., & Copie, V. (2014) Solution structure and molecular determinants of hemoglobin binding of the first NEAT domain of IsdB in *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, **53**, 3922–3933.
- 70) Zong, Y.N., Mazmanian, S.K., Schneewind, O., & Narayana, S.V.L. (2004) The structure of sortase B, a cysteine transpeptidase that tethers surface protein to the *Staphylococcus aureus* cell wall. *Structure*, **12**, 105–112.
- 71) Jacobitz, A.W., Wereszczynski, J., Yi, S.W., Amer, B.R., Huang, G.L., Nguyen, A.V., Sawaya, M.R., Jung, M.E., McCammon, J.A., & Clubb, R.T. (2014) Structural and computational studies of the *Staphylococcus aureus* sortase B-substrate complex reveal a substrate-stabilized oxyanion hole. *J. Biol. Chem.*, **289**, 8891–8902.

著者寸描

● Caaveiro Jose (カアベイロ ホセ)



九州大学大学院薬学研究院准教授。博士(理学)。

■略歴 Ph.D. in Science from UPV/EHU in Spain, postdocs at MIT and Brandeis University (USA), various positions at the University of Tokyo, and since February 2017 Associate Professor at Kyushu University.

■研究テーマと抱負 To establish novel therapeutic solutions in global healthcare,

such as microbial infections, neurological disorders, and chronic pain, based on their molecular mechanism of action.

■ウェブサイト <http://global.phar.kyushu-u.ac.jp/>

■趣味 Family, reading.

●津本 浩平 (つもと こうへい)



東京大学大学院工学系研究科教授。博士(工学) (東京大学)。

■略歴 1991年東京大学工学部工業化学科卒業(三浦謹一郎教授), 同大学院進学(渡辺公綱教授)。95年東北大学大学院工学系研究科助手(熊谷泉教授)。同大学講師, 助教授, 東京大学大学院新領域創成科学研究科准教授を経て, 2010年東京大学医科学研究所教授(現在に至る)。

13年同大学院工学系研究科教授(現在に至る), 16年医薬基盤・健康・栄養研究所プロジェクトリーダー兼務。02年日本生化学会奨励賞, 12年日本学術振興会賞等受賞。

■研究テーマと抱負 生命現象を司る分子間相互作用に関する精密解析と制御分子の創出, 抗体を中心とした分子医工学研究全般, 創薬展開を指向した生命金属科学研究。相互作用の定量的理解が生命科学全般に広がりつつある状況に, 多方面からのアプローチにより引き続き貢献したいと考えています。

■ウェブサイト <http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/phys-biochem/>

■趣味 観劇, 音楽鑑賞, 読書。