トピックス

宿主血中で遊離へムを解毒するグラム陽性細菌のヘム 排出ポンプの機能と構造

中村寛夫

国立研究開発法人 理化学研究所生命機能科学研究センター タンパク質機能・構造研究チーム 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

要旨

グラム陽性病原性細菌は宿主血中でヘモグロビン由来のヘムを取り込み、鉄源として利用する。一方、その際に生 じる過剰な遊離ヘムが有毒であるため、ABC トランスポーターの一種であるヘム排出ポンプ HrtBA を用いて細胞 に侵入した遊離ヘムを排出し解毒する。今回,我々はHrtBAの生化学的機能解析を行うとともに、アポ型、ヘム結 合型, ヌクレオチド結合型の立体構造をX線結晶構造解析によって決定した。HrtBAは4回膜貫通サブユニットで ある HrtB 2 つと ATPase サブユニットである HrtA 2 つからなる。ヘムは HrtB ダイマーの膜貫通ドメインの会 合面にあるグルタミン酸残基に配位しており、細胞質膜脂質二重層の外層の親水性基部分に相当する位置にあっ た。ヌクレオチド結合型ではこのヘム結合部位を構成する4本のヘリックスが狭窄しており、ヘムが結合できない 状態になっていた。一方、アポ型ではこれら4本のヘリックスのバンドル構造が崩れ、グルタミン酸残基が脂質膜 に露出する配置となっていた。これらの構造解析および機能解析の結果から、HrtBA は脂質膜外層に侵入したヘム をグルタミン酸による配位を伴いながらトランスポーター内に引き込み,ATP の結合が引き起こす構造変化によっ てヘムを細胞膜の外へと転移させるという排出機構が明らかとなった。

1. はじめに

ヘム(鉄プロトポルフィリン錯体)は多くの生物が自ら 合成して利用する疎水性のタンパク質補因子であり、ミト コンドリアの電子伝達系シトクロムやヘモグロビン、シト クロム P450など多くのヘムタンパク質において活性中心 として働いている¹⁾。一方,タンパク質に強固には結合し ていない、いわゆる「遊離ヘム」は細胞内シグナル因子や 調節因子として働いているが,過剰になると強い細胞毒性 を発揮することが知られている1)。遊離へムは無制御に活 性酸素 (Reactive Oxygen Species, ROS) を生成し, 脂 質やタンパク質を損傷させること(酸化的ダメージ)や脂 質膜に結合して膜流動性やイオン透過性を変えることで毒 性を発揮するとされている。

ヒトは病原性細菌に血液中での増殖を許すと敗血症や髄 膜炎を発症し、死に至ることもある。細菌にとって宿主か ら炭素、窒素、リンなどの主要元素を奪うことが増殖に必 須であるのはもちろんであるが、鉄獲得も重要であること は、多くの病原菌でヘム鉄・非ヘム鉄をそれぞれ取り込む 輸送装置をもっていること、細胞内の鉄濃度が輸送装置だ けでなく、毒素や他の病原因子の産生も制御していること から理解できる¹⁾。ヒトにはおよそ4gの鉄が含まれ,血 中へモグロビンのヘム鉄はその60%以上を占めており2), 病原菌と宿主のあいだにはヘム鉄を奪う、奪われまいとす るせめぎあいが繰りひろげられている1)。

病原菌のヘム取り込み装置はグラム陽性、陰性細菌を問

わず、複数の分泌型可溶性へム結合タンパク質、ATPbinding cassette (ABC) タイプのインポーターとそれに 付随するへム結合タンパク質からなる¹⁾(Fig. 1左)。細菌 感染によって破壊された赤血球から漏出したヘモグロビン のヘムは順次捕捉されたのち、インポーターのもつAT-Pase 活性 (ATP 加水分解活性: ATP→ADP+Pi) を駆 動力として菌体内に輸送される。取り込まれたヘムはその まま利用されるか、ヘムオキシゲナーゼによってポルフィ



Fig. 1 (Color online) Heme acquisition and detoxification in grampositive bacteria. EM, external milieu; PG, peptidoglycan layer; CM, cytoplasmic membrane; ROS, reactive oxygen species. The structures of heme importer (PDB, 5B58) and heme oxygenase (PDB, 1IW0) have been determined.

リンが開裂され,遊離した鉄がコファクターとして利用さ れる。

グラム陰性細菌は細胞質膜に加えて疎水性物質を遮蔽す る外膜をもち、ヘムの流入は外膜のヘム受容タンパク質を 介するため細胞質膜が高濃度のヘムに暴露される恐れは少 ない。一方、外膜をもたないグラム陽性細菌やグラム染色 陽性ではあるがヘム透過性の高い特異な外膜をもつジフテ リア菌やマイコバクテリアは血中で常に細胞質膜がヘムに 晒される。2006年,米国 Vanderbilt 大の Skaar 博士のグ ループはヘムを培地に添加することによって高発現する ABC トランスポーターの遺伝子(hrt)を黄色ブドウ球菌 から発見した³⁾。その後, hrt 遺伝子は ATPase をコード する hrtA と膜タンパク質をコードする hrtB からなるこ とや hrt 遺伝子欠損株はヘム感受性になることに基づい て、このABCトランスポーターは有毒なヘムを排出する ことで血中での増殖を可能とするポンプタンパク質である と考えられるようになった⁴⁾ (**Fig. 1**右)。*hrtBA* 遺伝子は グラム陽性細菌に広く分布しているが⁴⁾, 我々が研究を開 始するまでにタンパク質レベルでの研究は報告されておら ず、ヘム排出のメカニズムは不明のままであった。そこで 我々は大腸菌から組換え HrtBA タンパク質を可溶化・精 製し、機能解析とともにエックス線結晶構造解析を行っ た。本稿では我々が近年発表した研究5)をかみくだいて解 説する。

大腸菌での異種発現による HrtBA のへム 解毒機能

大腸菌は組換えタンパク質を産生させ、精製タンパク質 を取得するのに有用である。はじめに我々はジフテリア菌 HrtBA タンパク質が大腸菌でヘムを排出し、解毒するか 否かを検討した。グラム陰性細菌である大腸菌の膜構造を イラストで表す(Fig. 2a)。実験室株である K12 株は元来 ヘム特異的取り込み装置をもたず,外膜にヘム受容体タン パク質がない。そのため培地に添加したヘムが細胞内に流 入せず、ヘムに対して抵抗性がある(Fig. 2b上段)。しか し、病原性大腸菌0157の外膜へム受容体タンパク質 ChuAの遺伝子を発現させると培地中のヘム濃度が1-10 μM では生育阻害が認められた(Fig. 2b 中段)。この阻害 は ChuA を介して外膜を透過したヘムがペプチドグリカ ン層に到達し、細胞質膜がヘムに晒され脂質中に蓄積した ためと考えられる(特異的インポーターをもたないため大 量のヘムが細胞質に達したかは不明)(Fig. 2a)。次にこの ヘム感受性となった大腸菌にジフテリア菌 hrtBA 遺伝子 を発現させたところ、元の耐性菌のようにヘムに対して抵 抗性を示した(Fig. 2b 下段)。HrtBA は細胞質膜に局在す ると類推されるので膜中もしくは細胞質のヘムを汲み出し てヘムを解毒していると思われる。この実験結果は大腸菌 内での組換え HrtBA の機能的発現を示しており、タンパ



Fig. 2 (Color online) Heterologous expression of C. diphtheriae HrtBA rescues DNA-engineered heme-sensitive E. coli K12 from heme toxicity. a, a graphical scheme of heme toxicity and the HrtBA-dependent detoxification in the cell envelope of recombinant E. coli. EM, external milieu; LPS, lipopolysaccharides; OM, outer membrane; PG, peptidoglycan layer; CM, cytoplasmic membrane. ChuA is a heme receptor from E. coli O157. b, E. coli cells grown in the presence of heme. Turbid test tubes contain well-grown cells.

ク質レベルの研究の実現性を高めるものであった。

3. HrtBA の生化学的解析

我々はこの組換え大腸菌の膜画分から界面活性剤 Dodecyl maltoside (DDM) とLauryl maltose neopentyl glycol (LMNG)を用いてHrtBAの可溶化・精製を行っ た後,細胞内と同じタンパク質環境にするために脂質ナノ ディスクに再構成した(Fig. 3e 参照)。へムは難溶性であ るため,脂質に結合して特有の紫外可視吸収スペクトルを 示すが(Fig. 3a 緑),HrtBAにはより高い親和性で結合 し、シャープな吸収スペクトルを示した(Fig. 3a 青)。

再構成した HrtBA はヘムに依存した ATPase 活性をも っていた(Fig. 3b-d)。ヘムによる50%効果濃度(EC50) は0.9 µM であった(Fig. 3c)。HrtBA を欠損したジフテリ ア菌では培地のヘム濃度 5 µM で生育できない⁶⁾ことから 再構成タンパク質は生理的条件で解毒する性質を保持して いると考えられる。一方,鉄を含まないプロトポルフィリ ンKでは活性上昇は見られなかったことから活性上昇には アミノ酸残基によるヘム鉄への配位の関与が示唆された (後述)(Fig. 3b)。

次に,セラチア菌由来のヘム結合タンパク質 HasA を ヘムアクセプターとして用いてヘム転移アッセイを行った (Fig. 3e)。ヘムを加えたアポ型 HrtBA はゲルろ過クロマ トグラフィー後もヘムを保持しているが,ATP が存在す るとヘムを解離し,HasA がこれを結合することがわかる (Fig. 3f)。非水解性アナログであるAdenylylimidodiphosphate (AMPPNP)を用いても同様の結果を 得た⁵⁾。これらの結果からアポ型 HrtBA は高いヘム親和 性をもつが,ヌクレオチド結合によってヘム親和性を失う (低下する)ことが明らかとなった。



Fig. 3 (Color online) Biochemical properties of nanodisc-embedded HrtBA. a, UV-visible absorption spectra of heme bound to HrtBA and empty nanodiscs, and in buffer. b, ATPase activities in the presence of 10 uM heme and protoporphyrin IX (PPIX). Basal activity was measured in the presence of dimethyl sulfoxide (DMSO), a solvent for heme and PPIX. c and d, kinetic analyses of the ATPase activity. In panel d, 5 mM heme is present (squares) and absent (circles) in the assay buffer. e, an experimental scheme of heme transfer assay. HrtBA was reconstituted into nanodiscs. Heme-bound HrtBA and HasA (heme acceptor) were mixed in the presence or absence of ATP. The proteins were subjected to protein separation using a gel filtration column chromatography. f. Heme contents bound to HrtBA and HasA in the presence or absence of 2 mM ATP. 100 pmol of heme and 200 pmol of proteins were applied on the column.

4. HrtBA の X 線結晶構造解析

生化学実験ではヘムがどこに結合し、どのように解離す るのかというメカニズムを解明することはできない。そこ で我々はアポ型、ヘム結合型、AMPPNP 結合型の結晶化 スクリーニング及び大型放射光施設 SPring-8 内 BL26B1/ B2、BL32XU、BL41XU においてX 線回折実験を行い、 これらの立体構造を決定することにした。

【AMPPNP 結合型の結晶構造】

はじめに得られた結晶は DDM と LMNG の混合ミセル 下で精製したタンパク質の Mg・AMPPNP-HrtBA 複合体 溶液からであった。位相決定にはマグネシウムの代わりに ATPase 活性においてマグネシウムと代替可能なマンガン を加えたタンパク質複合体溶液から結晶を作成し,単波長 異常散乱法 (SAD,波長1.8924 Å)を用いたことを記し ておく。得られた Mg・AMPPNP タンパク質複合体の構 造モデルを Fig. 4 右に示す。HrtBA は 2 つの A サブユニ ットと 2 つの B サブユニットからなるヘテロ 4 量体であ る。A サブユニットは普遍的な機能・構造をもつ ATPase であり,既知の ABC トランスポーター同様,ヌクレオチ ド結合ドメイン (NBD)に結合した AMPPNP を互いに はさむようにダイマー構造をとっていた。パーミアーゼサ ブユニットである B サブユニットは 4 本の膜貫通へリッ クス (TMD)とカップリングへリックス (CP)からなる



Fig. 4 (Color online) Crystal structures of HrtBA in the apo, heme-bound and nucleotide-bound states. Heme binding site is indicated by an arrow in the middle.

膜貫通ドメイン(TMD)および約170アミノ酸残基の細胞外ドメイン(ECD)からなっており、ABCトランスポー タータイプWIC分類されるマクロライドトランスポーター MacB^{7,8)}のパーミアーゼドメインとよく似ていた。Bサブ ユニットはカップリングへリックス(CP)を介してAサ ブユニットをアンカーしていた。TMD ダイマーは各 B サ ブユニットから供されるヘリックス1,2 どうしが会合し て4本ヘリックスバンドル様構造を作り,ヘリックス3, 4 がその周りを取り巻いていた。なお,この構造解析の結 果からはヘム結合部位がどこにあるかは依然として不明で あった。

【ヘム結合型の結晶構造】

次に我々は LMNG 存在下で精製したタンパク質にヘム またはヘムアナログであるマンガンポルフィリン(MnPP) を加えた試料の結晶化を行い、得られた結晶の回折データ からヌクレオチド結合型をサーチモデルとした分子置換法 によって構造モデルを得た(Fig. 4中央)。これらの複合体 は同じ構造をとっており、ヘム、MnPP ともに同じ部位 に結合していた。1分子のヘムが B サブユニット TMD 二 量体の会合面に結合し、グルタミン酸219がヘム鉄に配位 していた。ポルフィリン環はBサブユニットの保有菌種 間で保存されているロイシン35, 39, 223, ヒスチジン 163によってはさまれていた(Fig. 5)。なお、細胞質膜は 二層のリン脂質層(外界側である外層と細胞質側である内 層)からなるが、トランスポーターを膜中に配置した時に は、グルタミン酸219を含むヘム結合部位は予想した外層 リン脂質の疎水基領域ではなく、親水基部分に相当する位 置にある。NBD である A サブユニットはヌクレオチドが ないため互いに会合していなかった(Fig. 4 中央)。

【アポ型の結晶構造】

ヘム/MnPP 結合型の結晶には非対称単位中に三つのト ランスポーター分子が含まれ、そのうちのひとつは基質が 結合していないアポ型であった。また、DDM 存在下で精 製したアポ型タンパク質から得た結晶では ECD がディス オーダーしていたため、その領域の構造を決定することは できなかったものの、TMD、NBD は前述のアポ型と同様 の構造をとっていた。特筆すべきは TMD の4本へリッ クスバンドル様構造が崩れて一見不安定な会合構造を作り



Fig. 5 (Color online) Close-up of the heme binding site. Conserved amino acids and heme are shown by ball and sticks.

(Fig. 4 左,紙面上,前後),その結果,グルタミン酸219
がTMD 側面から細胞膜に露出していることである(Fig. 6a 左)。A サブユニットはヘム結合型と同様の配置だった。

【構造を比較してヘム排出の仕組みを考える】

生化学的解析はアポ型 HrtBA が自発的にヘムを結合す ること(Fig. 3a),結合したヘムは ATP 結合(加水分解は 不要)によって HrtBA から遊離すること(Fig. 3f および 文献⁵⁾を示している。そこで,機能を理解する際のカギと なる三つの構造を,アポ型 vs ヘム結合型,ヘム結合型 vs スクレオチド結合型で比較することでヘム排出における構 造遷移を考えた。

アポ型ではヘム配位子であるグルタミン酸219が脂質に 露出している(オープン構造)(Fig. 6a 左)。遊離ヘムは水 よりも脂質層にインターカレートしている状態を好み⁹⁾, ヘムは細胞質膜外層から HrtB のヘム結合部位にアクセス できる。ヘムのポルフィリンの下半分は疎水性相互作用, 鉄は配位結合によって TMD に結合し,オープン構造から クローズド構造であるヘム結合型へと変換し安定化する (Fig. 6a 上)。アポ型とヘム結合型のタンパク質分子全体を 重ね合わせると CP の C 末端はほとんど動かないことか ら, CP を軸にしてヘリックス 1-4 がスイングしているよ うに見える (Fig. 6b, TM3, 4 は省略)。CP がほとんど動 かないことからこれに連結する NBD どうしも変化はなく 同じ配置をとっている (Fig. 4)。

ヘム結合型におけるヘムの解離は NBD への ATP 結合 によって誘起される。ATP(または AMPPNP)が A サ ブユニットに結合すると NBD ダイマーが形成され(**Fig. 4**),



Fig. 6 (Color online) Proposed structural transitions of HrtB subunits. a, from the apo to heme-bound states and the heme-bound to nucleotide-bound states. b, superimposition of the apo and heme-bound states; c, superimposition of the heme-bound and nucleotide-bound states. d, superimposition of the ECDs of the heme-bound and nucleotide-bond states. TM, transmembrane helix;, CP, coupling helix. TMs I and II are depicted. Heme and glutame 219 are shown by balls and sticks.

CP とヘリックス2が押し上げられる(Fig. 6c)。ヘムはこの過程で解離すると考えられる。ヘリックス1のN末端はほとんど動きがなく(Fig. 6c),ヘリックス2の押し上げが ECD の旋回という剛体運動(Fig. 6d)を経由することで湾曲したヘリックス1の上半分を直線に引き戻すと思われる(Fig. 6a, c)。結果として両サブユニットのヘリックス1,2どうしの4ヘリックスバンドルを作る(Fig. 6a右)。この安定化したヌクレオチド結合型の4ヘリックスバンドルは NBD における ATP の加水分解とそれに続く ADP,リン酸の解離によって解消され,元のアポ型に変換する。

以上のように今回決定した三つの構造の構造比較はヘム 排出のメカニズムを理解するための情報をたくさん与えて くれた。

一般に膜輸送とは輸送タンパク質による脂質膜を横断し た基質の輸送を意味し、多くのトランスポーターでは基質 結合部位は脂質膜中央、深い位置にあり、開口部を外部・ 細胞質側に交互に転換させて基質の膜透過を行う(交互ア クセスモデル)。ヘム取り込みの場合も TMD 内のヘム結 合状態は不明であるが ABC インポーターがへムを輸送し ている(Fig. 1)。当初,ヘム排出はこれと逆向きの輸送を 想定していたが、本研究で特定された HrtBA のヘム結合 部位は意外にも細胞質膜外層近傍に位置していた。細菌に おけるヘム毒性は細胞質膜にあるメナキノンとヘムが協同 して産生する ROS に起因するという知見^{10,11)}およびへム は難溶性であり、脂質分子の疎水基と親水基の境界付近に 局在しやすいという知見を併せ考えると、特定されたヘム 結合部位の位置は合理的であり、血中から細菌の細胞質膜 に侵入したヘムを細胞外へ排出するという「膜からのくみ 出し」が解毒のメカニズムの分子基盤になっていると言え る。なお,現時点では HrtBA の遷移過程の構造を知るこ とはできないのでタンパク質内でどのような状態でヘムが 解離し、どのような経路でタンパク質から排出されるのか は不明である。ABCトランスポータータイプ7には細胞 質膜外層にアンカーしたリポタンパク質を引き抜いてペリ プラズム空間の受容タンパク質に受け渡す LolCDE も含 まれており⁸⁾,細胞質膜表面に局在する基質を抽出するこ とがタイプ7に共通した仕組みなのかもしれない。

【グルタミン酸219の配位結合の意義を考える】

構造解析ではじめてグルタミン酸219がへムに配位して いることが判明したが、すべての保有菌で保存させている わけではなく、グルタミン酸かグルタミンに二分される (Fig. 7)。なお、グルタミン酸がへムの配位子となってい る既知のヘムタンパク質は細菌のシトクロム bd 複合体¹²⁾ のみである。本研究ではグルタミン酸219の役割を調べる ためにアミノ酸変異を導入して機能解析を行った。

へム配位子とはならないアラニンまたは一部の菌種で保 存されているグルタミンに変異させたタンパク質ではヘム





を加えたときの紫外可視吸収スペクトルが野生型と異なっ ており(Fig. 8a 左), ヘム転移アッセイにより親和性の低 下が示された(Fig. 8a 中央)。また,ヘム添加による AT-Pase 活性の上昇は見られなかった(Fig. 8a 右)。一方,多 くのヘムタンパク質で配位子として働いているヒスチジン に置換したものでは精製標品に等量のヘムを含んでおり, その紫外可視吸収スペクトルは6配位低スピンのヘムタ ンパク質のものと類似していた(Fig. 8a 下段左)。このヘ ムは HrtBA を発現させた組換え大腸菌に由来しており, ヘム転移アッセイにおいてほとんど HasA に転移しない (この変異タンパク質のヘム親和性が高いことを意味して いる)(Fig. 8a 下段中央)。このヒスチジン変異タンパク質 は野生型のヘムを含まない時の活性よりは高かったのも の,新たにヘムを加えても上昇は見られなかった(Fig. 8a 下段右)。

興味深いことに,これらの変異タンパク質のうち,アラ ニン,グルタミン変異タンパク質を発現させた大腸菌株は 1μM ヘム存在下では増殖でき(Fig. 8b),その倍化時間も 野生型並みであった(Fig. 8c)。この解毒実験の結果はヘ ムとの配位結合がなくても ATP の結合・加水分解のサイ クルの連動した TMD の構造変化によってヘムの結合部位 への吸入・排出が起こることを意味している。乳酸菌や腸 球菌などの HrtB ではポジション219に相当するアミノ酸 が生来グルタミンであることから,これら HrtBA のヘム 濃度依存的 ATPase 活性などの機能解析が待たれるとこ ろである。

5. ヘム排出の反応機構のまとめ

周囲のヘム濃度が数 μ M 以上に上昇するとヘムセン サーと情報伝達系の働きによって HrtBA タンパク質が発 現する。細胞質膜に侵入したヘムがグルタミン酸219への 配位結合を伴い TMD に結合すると ATPase 活性が上昇 する (Fig. 3b-d)。この反応サイクルは Fig. 9 に示すように ヘムがあるときには時計回り (state 1→state 2→state 3 →state 1) で進行する。これまでに述べた通り, ATP の 結合に伴う NBD の構造変化は CP を介して TMD ヘリッ



Fig. 8 (Color online) Properties of the HrtB E219 mutants. HrtBA proteins carrying the mutations in the B subunit were purified and analyzed. a, heme absorption spectrum (left), heme transfer (middle) and ATPase (right). b, growth of E. coli cells expressing the wild type and HrtB E219 mutants co-expressed with HrtA in the presence of heme. c, Doubling times of the growth of the E. coli cells in the presence of heme.



Fig. 9 (Color online) Structural transitions of HrtBA in heme efflux cycle. In the absence of heme, the clock-wise direction or the anti clock-wise can proceed (asterisk).

クスの再編を引き起こし、ヘム解離型を安定化する (state 3)。次いで、ATPの加水分解はNBD、TMDとも にリラックスした state 1 への遷移を引き起こすものであ る。なお、ヘムがないときには少量のHrtBAしか細胞質 膜に発現していないが、試験管内での基底(ベーサル)レ ベルの活性ではふたつの*印の経路が考えられる。

6. 今後の展望と課題

本研究ではHrtBAのヘム解毒の仕組みを機能・構造の 観点から明らかにした。タンパク質のエックス線結晶構造 解析には良質で大きな結晶を得ることが望ましいが一般的 に膜タンパク質の場合には困難である。SPring-8を含め 放射光は微小なタンパク質結晶であっても高分解能の構造 解析を可能とし、これまでに多くの成功を収めてきた。ま た、様々な波長のエックス線を取り出すことができるた め、本研究におけるタンパク質複合体中のマンガンの異常 分散効果を用いた位相決定も可能であり、ヌクレオチド結 合型を手始めに、アポ型、ヘム結合型というトランスポー ターとして重要な3つの構造を決定することができた。 しかしながら,既に述べたように中間体構造は捉えられて おらず,へム吸入や排出の分子内経路は解明できていな い。このような課題は分子シミュレーションや動的構造解 析を実施することで解決できると期待している。

世界的に感染症は虚血性心疾患につぐ死亡原因となって おり、その半数はグラム陽性・陰性を問わず黄色ブドウ球 菌、肺炎球菌・桿菌、大腸菌、緑膿菌によるものであ る¹³⁾。これらの病原菌では複数の抗生物質が効かない多 剤耐性菌が出現しており、近年ではわが国も毎年1万人 ほどが死亡している。抗生物質の開発と耐性菌の出現はイ タチごっこであり、新規薬の開発は限界に来ているともさ さやかれている。HrtBA の立体構造に基づく機能阻害剤 が開発されれば血中でのグラム陽性菌の増殖を妨げる効果 が期待でき敗血症などの重症化を防ぐと考えられる。

謝辞

本稿の執筆には理化学研究所播磨事業所と横浜事業所に おいて研究を共に行ってきた久野玉雄博士から多くの助言 をいただいた。原著論文の研究におけるタンパク質結晶 化,データ処理,構造解析,生化学実験は理化学研究所放 射光科学研究センターおよび生命機能科学研究センターに て実施した。X線回折実験は大型放射光施設 SPring-8 で 行い,論文には表しきれない多くの方々の助けがあって実 現した。

参考文献

- 1) J. E. Choby and E. P. Skaar: J. Mol. Biol. 428, 3408 (2016).
- M. E. Conrad and J. N. Umbreit: Blood Cells Mol. Dis. 29, 336 (2002).
- 3) D. B. Friedman et al.: PLoS Pathog. 2, e87 (2006).
- 4) V. J. Torres et al.: Cell Host Microbe 1, 109 (2007).
- H. Nakamura *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 119, e2123385119 (2022).
- 6) L. A. Bibb and M. P. Schmitt: J. Bacteriol. **192**, 4606(2010).
- 7) C. Thomas *et al.*: FEBS Lett. **594**, 3767 (2020).
- U. Okada and S. Murakami: Microbiology (Reading) 168 doi: 10.1099/mic.0.001257 (2022).
- 9) R. P. Giri et al.: J. Phys. Chem. B. 122, 7547 (2018).
- 10) C. A. Wakeman et al.: Mol. Microbiol. 86, 1376 (2012).
- L. Joubert, A. Derré-Bobillot, P. Gaudu, A. Gruss and D. Lechardeur: Mol. Microbiol. 93, 823 (2014).
- T. Friedrich, D. Wohlwend and V. B. Borisov: Int J Mol Sci. 23, 3166 (2022).
- GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators: Lancet 400, 2221 (2022).

著者紹介

中村寛夫



国立研究開発法人理化学研究所 生命機能 科学研究センター 特別嘱託研究員 E-mail: hironaka@riken.jp 専門:生体膜生化学 [略歴] 1990年 東京大学大学院理学系研究科博 士課程修了。理学博士。1994年 特殊法 人理化学研究所入所。2021年より現職。

Structural insights into heme-detoxification by an ABC-type efflux pump of gram-positive bacteria

Hiro NAKAMURA

RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research 1–7–22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230–0045, Japan

Abstract Gram-positive pathogenic bacteria acquire hemoglobin-derived heme as an iron source to proliferate in the host blood. In addition, they employ an ABC transporter, HrtBA to extrude excess of free heme because the free heme is extremely cytotoxic. Here we show the crystal structures of HrtBA in the apo, heme-bound and nucleotide-bound states along with the biochemical properties. HrtBA consists of two ATPase subunits (HrtA) and two permease subunits (HrtB). HrtB dimer contains one heme molecule within the 4-transmembrane helix bundle with glutamate ligation. The hemebinding site is located at the level of the surface of the outer leaflet of the cytoplasmic membrane bilayers, which is consistent with the lateral access of heme from the membrane. The nucleotidebound state contains the squeezed 4-helix bundle with no heme accommodation while the apo state has the glutamate residues exposed to the lipid environments. These data suggest the molecular mechanism of the lateral access of heme from the outer leaflet of the membrane to the heme-binding site and the concomitant heme release upon ATP binding to the nucleotide-binding site of HrtBA.